

**Vanessa Moresco**

**ESTABILIDADE TÉRMICA DE VÍRUS ENTÉRICOS EM  
ÁGUAS DE SUPERFÍCIE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de doutora em Biotecnologia e Biociências. Área de Concentração: Microbiologia e Parasitologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Célia Regina Monte Barardi

**Florianópolis**

**2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moresco, Vanessa

Estabilidade térmica de vírus entéricos em águas de superfície / Vanessa Moresco ; orientadora, Célia Regina Monte Barardi - Florianópolis, SC, 2016.

156 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. vírus entéricos. 3. águas de superfície. 4. temperatura. 5. estabilidade. I. Monte Barardi, Célia Regina. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**“Estabilidade térmica de vírus entéricos em águas de superfície”**

Por

**Vanessa Moresco**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (03/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



---

Prof(a). Dr(a). Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



---

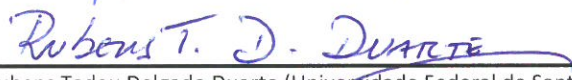
Dr(a) Célia Regina Monte Barardi (Universidade Federal de Santa Catarina)

Orientador(a)



---

Dr(a) Mário Steindel (Universidade Federal de Santa Catarina)



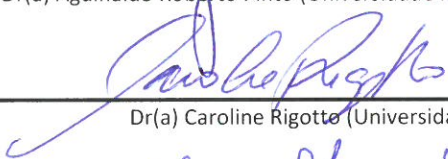
---

Dr(a) Rubens Tadeu Delgado Duarte (Universidade Federal de Santa Catarina)



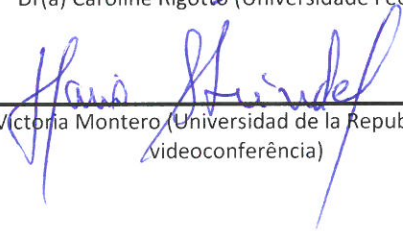
---

Dr(a) Aguinaldo Roberto Pinto (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr(a) Caroline Rigotto (Universidade Feevale)



---

Dr(a) Matias Victoria Montero (Universidad de la Republica Regional Norte -  
videoconferência)

Florianópolis, 18 de fevereiro de 2016.



## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Ana Maria e ao meu irmão Daniel pelo amor, apoio e confiança que sempre depositaram em mim.

Ao meu namorado Daniel pelo carinho e incentivo durante esta importante etapa da minha vida.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Célia Regina Monte Barardi, pelos ensinamentos e amizade ao longo de todos esses anos de convivência, fundamentais para minha formação acadêmica.

À Prof<sup>a</sup> Dra Cláudia Maria de Oliveira Simões pelas sugestões ao longo de toda minha vida acadêmica.

Aos membros da banca avaliadora: Prof. Dr. Mário Steindel, Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto, Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte, Prof. Dr. Matias Victoria Montero, Prof<sup>a</sup>. Dra. Caroline Rigotto, Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana de Abreu Corrêa e Dra. Maria Elisa Magri pela disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki da Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, por ceder a cepa vacinal do rotavírus utilizada no presente trabalho.

À Natália Damazo por toda a ajuda e aprendizado mútuo durante o período em que pude orientá-la como Iniciação Científica.

À amiga e ex colega de laboratório, Mariana de Almeida do Nascimento, pelo auxílio nas coletas das amostras de água e análise dos parâmetros físico-químicos.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Virologia Aplicada pela amizade e companheirismo ao longo desses anos: Ana, Ana Carolina, Ariadne, Camila, Clarissa, Carlos, Débora, Doris, Elisabet, Gislaine, Henrique, Izabella, Lara, Laurita, Lucas Garcia, Lucas Maróstica, Mahdy, Maria Elisa, Mariana Pilotto, Naira, Natália, Paula e Vitor.

À minha co-orientadora Dra. Marylynn Yates da Universidade de Califórnia, Riverside por todo o apoio durante meu estágio de doutorado sanduíche em Riverside e aos meus colegas de laboratório, Dane, Katie e Daniel por toda a ajuda e amizade.

Aos técnicos do LAMEB - UFSC: Bibiana Sgorla, Dênis Dall Agnolo e Vanessa da Silva pelo auxílio nas análises no citômetro de fluxo.

Aos demais colegas dos laboratórios do 3º andar do MIP pelas conversas de corredor e auxílio na utilização de equipamentos.

Aos amigos de todos os momentos, os que estão perto e os que estão longe, sempre incentivando.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro à pesquisa e concessão da bolsa durante todo meu período de doutoramento e também a bolsa PDSE durante o estágio de doutorado sanduíche.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, na figura de seus coordenadores, professores e servidores.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A temperatura é considerada o fator que mais afeta a estabilidade viral no meio ambiente aquático, porém, outros fatores como a irradiação pela luz ultravioleta (U.V.), variações na salinidade e de pH e presença de outros micro-organismos podem também contribuir na diminuição da estabilidade viral. A presença e persistência viral no ambiente aquático deve ser monitorada para assegurar a qualidade da água, entretanto, em análises que envolvem uma grande quantidade de amostras, necessita-se a estocagem das amostras previamente às análises e muitas dúvidas existem em relação à estabilidade térmica dos patógenos virais em diferentes temperaturas de estocagem (22, 4, -20 e -80 °C). O objetivo da presente tese de doutoramento foi avaliar a estabilidade térmica de diferentes vírus entéricos: adenovírus humano tipo 2 (HAdV2), norovírus murino (MNV-1) e rotavírus humano (RV) cepa vacinal RotaTeq em amostras de água de superfície. Os resultados são aqui apresentados em quatro capítulos: **Capítulo I:** Otimização das técnicas baseadas em cultura celular: ensaio de placa de lise (PL), citometria de fluxo (CF) e ICC-et-RT-qPCR (qPCR precedido por cultura celular, tratamento enzimático e transcrição reversa) para determinar o limite de detecção de HAdV2 em amostras de água da Lagoa do Peri. Foi possível verificar que a composição da água não interferiu na detecção HAdV2 infecciosos e que o método de PL apresentou maior limite de detecção em relação à CF e ao ICC-et-RT-qPCR. As diferenças nos limites de detecção obtidos deveram-se à diferenças inerentes a cada metodologia sendo as três adotadas para avaliar a estabilidade térmica do HAdV2 realizada no Capítulo II. **Capítulo II:** Avaliação da estabilidade térmica do HAdV2 e MNV-1 semeados em amostras de água de superfície provenientes da Lagoa do Peri e estocadas a temperaturas de 22, 4, -20 e -80 °C. A infecciosidade do HAdV2 foi avaliada pelo período de 230 dias utilizando as técnicas citadas acima e para o MNV-1 pelo período de 180 dias utilizando PL e RT-qPCR. O HAdV2 independentemente da técnica utilizada demonstrou um perfil de decaimento em relação às temperaturas de: -80<-20<4<22 °C, sendo que, com exceção das amostras estocadas a 22 °C, o HAdV2 presente nas amostras permaneceu potencialmente infeccioso por um período acima de 230 dias de análise. O MNV-1 mostrou um perfil de decaimento diferente, em relação à técnica de PL: -80<4<-20<22 °C e o mesmo perfil apresentado pelo HAdV2 quando as amostras foram analisadas por RT-qPCR. O modelo de regressão linear estimou o tempo de inativação necessário para o decaimento de 1log<sub>10</sub>

( $T_{90}$ ), de 50 e 33 dias respectivamente para o HAdV2 e MNV-1 quando estocados a 22 °C e avaliado por PL. Sugere-se a estocagem de amostras ambientais a 4 °C pelo período de 48 h e a -80 °C para longos períodos de estocagem. **Capítulo III:** Avaliação da estabilidade térmica do RV cepa vacinal nas temperaturas de 22 e 4 °C em amostras de água de manancial (Lagoa do Peri), água salobra (Lagoa da Conceição) e água de consumo não clorada durante 180 dias por PL e RT-qPCR. A estabilidade da partícula viral e do genoma foi maior quando as amostras foram estocadas a 4 °C do que a 22 °C, sendo que as amostras de água salobra apresentaram os maiores valores de decaimento em ambas as temperaturas e técnicas utilizadas, seguidas pela água da Lagoa do Peri e água de consumo. Além da ação da temperatura na inativação viral, as características físico-químicas, como a salinidade e a presença de outros micro-organismos nas amostras da Lagoa da Conceição podem ter influenciado no maior decaimento viral observado. Os valores de  $T_{90}$  foram de 18, 55 e 58 dias a 22 °C e 68, 155 e 240 dias a 4 °C respectivamente para as amostras da Lagoa da Conceição, Lagoa do Peri e água de consumo. A estabilidade das partículas infecciosas do RV indica a potencial transmissão horizontal da cepa vacinal. Entretanto, devido ao caráter atenuado da vacina, o monitoramento da presença de cepas vacinais e de possíveis rearranjos gênicos entre as cepas selvagens e vacinais deve ser avaliado para garantir a segurança das vacinas disponíveis, a verificação da presença de novos genótipos, auxiliando futuros estudos epidemiológicos. **Capítulo IV:** A padronização da metodologia de hibridização por sonda *Molecular Beacon* (MB) para monitorar a estabilidade do HAdV2 em águas fez parte do projeto de doutorado sanduíche realizado na Universidade da Califórnia, Riverside, EUA. O uso da sonda MB na detecção de HAdV2 foi padronizado utilizando a metodologia de conjugação ao peptídeo TAT (MB/TAT) e método de fixação e permeabilização celular comparando os resultados com a metodologia de imunofluorescência indireta (IFI). Pelo método MB/TAT foi possível visualizar o aparecimento de células fluorescentes após 6 h de infecção, com incremento da fluorescência após 8 h e, ao final de 24 h, a observação de células fluorescentes nas diferentes concentrações virais testadas. A metodologia de IFI permitiu, assim como na MB/TAT, o acompanhamento da infecção viral iniciando-se após 6 h de infecção, culminando no tempo de 24 h com um grande número de células infectadas e efeito citopático aparente. O uso da metodologia MB/TAT padronizada eliminou inúmeros passos de incubação e lavagens



necessários para a IFI, entretanto precisará ser ajustada em relação à quantificação de células fluorescentes e tempos de incubação para sua posterior aplicação em amostras de águas.

**Palavras-chave:** HAdV2. MNV-1. rotavírus. vacinal. estabilidade. temperatura. infecciosidade.



## ABSTRACT

The temperature is considered the main factor affecting viral stability in the aquatic environment, however, other factors such as ultra violet light irradiation (U.V.), salt concentration, pH variations and the presence of other microorganisms can also contribute to the loss of viral infectivity. Viruses presence and persistence should be monitored in the aquatic environment regarding water quality; however, extensive sampling schedules may require sample storage prior analyses. Currently, there is a lack of studies evaluating the thermal stability of viral pathogens when subjected to different storage temperatures (22, 4, -20 e -80 °C). The aim of this PhD thesis was to evaluate the thermal stability of different enteric viruses: human adenovirus type 2 (HAdV2), murine norovirus (MNV-1) and human rotavirus (RV) RotaTeq vaccine strain in surface water samples. The results are presented in four chapters: **Chapter I:** Optimization of the cell culture based-methods: plaque assay (PA), flow cytometry (FC) and ICC-et-RT-qPCR (qPCR preceded by cell culture, enzymatic treatment, and reverse transcription) to determine the detection limit of HAdV2 in water samples from Lagoa do Peri. The results showed that the water composition did not affect the detection of infectious HAdV2, being the detection limit higher by PA in comparison to FC and ICC-et-RT-qPCR methods. These differences are inherent according each methodology, and thus, the three methods were employed to evaluate the thermal stability of HAdV2 performed in Chapter II. **Chapter II:** The thermal stability of HAdV2 and MNV-1 seeded in surface freshwater from Lagoa do Peri and stored at temperatures of 22, 4, -20 and -80 °C was evaluated up to 230 days for the HAdV2 by the three methods mentioned above and over 180 days period for the MNV-1 using PA and RT-qPCR. Regardless the methodology employed, the HAdV2 demonstrated a viral decay profile according the temperatures as follows: -80<-20<4<22 °C, and, except for samples stored at 22 °C, HAdV2 present in the samples remained potentially viable for a period up to 230 days of analysis. The MNV-1 showed a different decay profile in relation to the PA technique, as follows: -80<4<-20<22 °C and the same profile presented by HAdV2 when the samples were analyzed by RT-qPCR. The T<sub>90</sub> values (time required to 1log<sub>10</sub> inactivation) estimated by linear regression model, were 50 and 33 days respectively for HAdV2 and MNV-1 when stored at 22 °C and evaluated by PA. These findings suggest the sample storage prior

analyses at 4 °C for a short period (48 h) and -80 °C for long term storage periods. **Chapter III:** Evaluation of the thermal stability of RV vaccine strain stored at the temperatures of 22 and 4 °C in different water matrices: surface freshwater (Lagoa do Peri), brackish water (Lagoa da Conceição) and non-chlorinated drinking water over a 180 days period by PA and RT-qPCR. Regardless the storage temperature the viral particle stability was more affected than the genomic stability, highlighting the highest decay obtained for the brackish water samples in both temperatures, followed by Lagoa do Peri and drinking water samples. The highest reduction on the virus titer obtained in this water sample is probably due to the action of the temperature and physicochemical characteristics, such as salinity concentration and also, the presence of other microorganisms in this environment, that may contribute on the virus loss due to predation. The samples stored at 22 °C showed the lowest T<sub>90</sub> values 18, 55 and 58 days and at 4 °C the T<sub>90</sub> values were 68, 155 and 240 days respectively for samples from Lagoa da Conceição, Lagoa do Peri and drinking water. The stability of infectious RV vaccine strain particles shows the potential horizontal transmission of the vaccine. Due to its attenuated nature, the presence of vaccine strains and the possible occurrence of gene reassortments between wild and vaccine strains should be monitored regarding vaccine safety, circulation of new genotypes, as well, further epidemiological studies. **Chapter IV:** The validation of the HAdV2 detection by using a Molecular Beacon (MB) hybridization methodology to evaluate HAdV2 stability in water samples was part of the sandwich PhD project performed at the University of California, Riverside, USA. Two different approaches were employed in order to HAdV2 detection using MB probe: MB conjugated with TAT peptide (MB/TAT) and a cell fixation and permeabilization method. Both methodologies were compared with the Indirect Immunofluorescence (IFA). By applying the MB/TAT method it was possible to observe fluorescent cells, indicating the beginning of viral replication within 6 h post infection. The fluorescence signals increased after 8 and 24 h post infection showing differences between the virus concentrations over time. The IFA methodology, as observed in MB/TAT, allowed monitoring the virus infection over the period analyzed, which the first fluorescence signals starting at 6 h post infection, ending the period of 24 h with a large number of infected cells and apparent cytopathic effect. The MB/TAT methodology standardized is more rapid and effective than IFA because avoid several steps of incubation and

washes, however, it must be adjusted in relation to the quantification of fluorescent cells and incubation times for further application in water samples .

**Key-words:** HAdV2. MNV-1. rotavirus. vaccine. stability. temperature. infectivity.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Diversidade de adenovírus humano. Análise filogenética completa dos sorotipos de adenovírus humanos, incluindo os novos sorotipos identificados.....	34
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da estrutura do adenovírus.....	35
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática da estrutura do norovírus.....	37
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da estrutura do capsídeo do rotavírus mostrando as três camadas protéicas que envolvem o material genético e constituem o vírion.....	39
<b>Figura 5</b> - Estrutura clássica de uma sonda do tipo <i>Molecular Beacon</i> .....	51
<b>Figura 6</b> - Ilustração esquemática de três diferentes métodos de conjugação do peptídeo a sonda <i>Molecular Beacon</i> .....	52
<b>Figura 7</b> - Placa de lise do adenovírus tipo 2.....	64
<b>Figura 8</b> - Detecção de HAdV2 infecciosos em amostras de água e em PBS utilizando a técnica de formação de placa de lise.....	64
<b>Figura 9</b> - Detecção de HAdV2 infecciosos em amostras de água e em PBS utilizando a técnica de citometria de fluxo.....	65
<b>Figura 10</b> - Limite de detecção de HAdV2 infecciosos em amostras de água de superfície (Lagoa do Peri) utilizando diferentes metodologias: placa de lise, citometria de fluxo e ICC-et-RT-qPCR.....	67
<b>Figura 11</b> - Desenho experimental dos ensaios de estabilidade viral realizado em amostras de água de superfície.....	77
<b>Figura 12a</b> - Redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do HAdV2 avaliada por placa de lise em amostras água de superfície (Lagoa do Peri).....	83
<b>Figura 12b</b> - Redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do HAdV2 avaliada por citometria de fluxo em amostras água de superfície (Lagoa do Peri).....	84
<b>Figura 12c</b> - Redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do HAdV2 avaliada por ICC-et-RT-qPCR em amostras água de superfície (Lagoa do Peri).....	85
<b>Figura 13</b> - Redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) do MNV-1 semeado em amostras de água de superfície. <b>a)</b> placa de lise (PL); <b>b)</b> RT-qPCR.....	87

<b>Figura 14</b> - Limite de detecção do RV cepa vacinal em diferentes matrizes aquáticas por meio da técnica de placa de lise.....	106
<b>Figura 15</b> - Redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do RV cepa vacinal em diferentes amostras de água avaliada por ensaio de placa de lise. <b>a)</b> 22 °C; <b>b)</b> 4 °C.....	108
<b>Figura 16</b> - Redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) do genoma do RV cepa vacinal em diferentes amostras de água avaliada por ensaio de RT-qPCR. <b>a)</b> 22 °C; <b>b)</b> 4 °C.....	111
<b>Figura 17</b> - Representação esquemática da sonda MB desenhada no presente trabalho.....	118
<b>Figura 18</b> - Progressão da infecção do HAdV2 utilizando a sonda MB conjugada com o peptídeo TAT pelo período de 6 h pós infecção.....	122
<b>Figura 19</b> - Progressão da infecção do HAdV2 utilizando a sonda MB conjugada com o peptídeo TAT pelo período de 8 h pós infecção.....	123
<b>Figura 20</b> - Progressão da infecção do HAdV2 utilizando a sonda MB conjugada com o peptídeo TAT pelo período de 24 h pós infecção.....	124
<b>Figura 21</b> - Progressão da infecção do HAdV2 utilizando a sonda MB pela metodologia de fixação e permeabilização.....	125
<b>Figura 22</b> - Progressão da infecção do HAdV2 avaliado por imunofluorescência indireta (IFI).....	126



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Comparação entre as médias gerais nos valores obtidos para a titulação do HAdV2 nos diferentes tipos de matrizes utilizadas e pelas técnicas de placa de lise e citometria de fluxo.....	66
<b>Tabela 2</b> - Parâmetros físico-químicos e presença de coliformes totais e <i>E. coli</i> em amostra de água de superfície da Lagoa do Peri.....	75
<b>Tabela 3</b> - Valores finais de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do HAdV2 semeado em água de superfície quando avaliadas distintas temperaturas e tempos de estocagem ao final de 230 dias, utilizando diferentes metodologias: placa de lise, citometria de fluxo e ICC-et-RT-qPCR.....	86
<b>Tabela 4</b> - Valores finais de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) do MNV-1 semeado em água de superfície quando avaliadas em distintas temperaturas e tempos de estocagem pelo período total de 180 dias.....	89
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros e tempos de inativação ( $T_{90}$ ) do HAdV2 e MNV-1 semeado em amostras de água de superfície e avaliado por diferentes técnicas de cultura celular analisados por modelo de regressão linear.....	90
<b>Tabela 6</b> - Parâmetros físico-químicos das amostras de águas da Lagoa do Peri, Lagoa da Conceição e água de consumo.....	103
<b>Tabela 7</b> - $T_{90}$ e taxas de inativação ( $k$ ) referentes a infecciosidade do rotavírus cepa vacinal obtidos pelo modelo de regressão linear em amostras de água estocadas a 22 e 4 °C e avaliadas por placa de lise.....	109
<b>Tabela 8</b> - $T_{90}$ e taxas de inativação ( $k$ ) do genoma do rotavírus cepa vacinal obtidos pelo modelo de regressão linear em amostras de água estocadas a 22 e 4 °C e avaliadas por RT-qPCR.....	112



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Tipos de matrizes identificadas de acordo com a complexidade da sua composição e usualmente utilizadas na avaliação da estabilidade térmica de vírus entéricos.....	43
<b>Quadro 2</b> - Métodos utilizados na avaliação da infecciosidade viral em diferentes matrizes.....	47
<b>Quadro 3</b> - Sequências de iniciadores e sonda utilizados na reação qPCR para o HAdV2.....	61
<b>Quadro 4</b> - Sequências de iniciadores e sonda utilizados na reação de RT-qPCR para o MNV-1.....	81
<b>Quadro 5</b> - Sequências de iniciadores e sonda utilizados na reação de RT-qPCR para o RV.....	105



## LISTA DE ABREVIÇÕES

°C	Graus centígrados
μL	Microlitros
μM	Micromolar
A549	Células epiteliais de carcinoma de pulmão humano
cDNA	DNA complementar
CG	Cópias genômicas
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Agência Norte Americana de Proteção Ambiental
HAdV2	Adenovírus humano tipo 2
HAV	Vírus da hepatite A
HID <sub>50</sub>	<i>50% human infectious dose</i>
ICC-et-RT-qPCR	<i>Integrated cell culture preceded by enzymatic treatment (et) and reverse transcriptase quantitative PCR</i>
MEM	Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's
MNV-1	Norovírus murino tipo 1
MS	Ministério da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RAW264.7	Macrófagos transformados derivados de <i>Mus musculus</i>
RT	Transcriptase reversa
SFB	Soro fetal bovino
TAT	<i>trans-activating transcriptional activator</i>
TCID <sub>50</sub>	<i>50% Tissue Culture Infective Dose</i>
UNG	Uracil-N-glicosilase
UFP	Unidades formadoras de placa

## Sumário

1 Introdução .....	27
2 Revisão Bibliográfica .....	31
2.1 Contaminação do ambiente aquático.....	31
2.2 Os vírus entéricos .....	33
2.2.1 Os adenovírus humanos.....	34
2.2.2 Norovírus humano e o norovírus murino.....	36
2.2.3 Os rotavírus .....	38
2.3 Tipos de amostras ambientais e considerações sobre a inativação viral.....	41
2.4 Metodologias disponíveis para a avaliação da infecciosidade viral em amostras ambientais.....	46
2.5 Estimativa dos tempos e parâmetros da inativação viral pela ação da temperatura .....	52
3 Objetivos.....	54
3.1 Objetivo Geral .....	54
4 Estrutura organizacional da tese .....	54
<i>Capítulo I</i> .....	55
1 Objetivo geral.....	55
1.1 Objetivos específicos.....	55
2 Materiais e métodos .....	55
2.1 Produção e titulação dos estoques virais de HAdV2 .....	55
2.2 Avaliação da influência da composição da água de superfície na detecção de adenovírus humano tipo 2.....	56
2.3 Limite de detecção de HAdV2 infecciosos em água de superfície.....	59
3. Resultados.....	63
3.1 Avaliação da influência da composição da matriz aquática na detecção de adenovírus infecciosos .....	63
3.2 Avaliação do limite de detecção em amostras de água da Lagoa do Peri.....	66
4 Discussão.....	67
<i>Capítulo II</i> .....	73
1 Objetivo geral.....	73
1.1 Objetivos específicos.....	73
2 Materiais e métodos .....	73
2.1 Produção e titulação dos estoques virais de HAdV2 e MNV-1..	73
2.2 Matriz aquática e desenho experimental .....	75

2.3 Ensaio de estabilidade para o HAdV2.....	77
2.4 Ensaio de estabilidade para o MNV-1.....	78
2.5 Análises estatísticas.....	81
3 Resultados .....	81
3.1 Estabilidade térmica e temporal do HAdV2.....	81
3.2 Estabilidade térmica e temporal do MNV-1.....	86
3.3 $T_{90}$ e parâmetros de inativação do HAdV2 e MNV-1 analisados pelo modelo de regressão linear .....	89
4 Discussão.....	91
<i>Capítulo III</i> .....	101
1 Objetivo geral .....	101
1.1 Objetivos específicos .....	101
2 Materiais e métodos .....	101
2.1 Produção do estoque viral de rotavírus cepa vacinal e padronização do ensaio de formação de placa de lise.....	101
2.2 Limite de detecção do ensaio de formação de placa de lise ....	103
2.3 Desenho experimental dos estudos de estabilidade do RVA-Teq103	
2.4 Extração do RNA e RT-qPCR.....	104
2.5 Análise dos dados.....	105
3 Resultados .....	105
3.1 Limite de detecção do ensaio de placa de lise.....	105
3.2 Estabilidade do RVA-Teq pelo ensaio de placa de lise.....	106
3.3 Estabilidade do genoma do RVA-Teq.....	110
4 Discussão .....	113
<i>Capítulo IV</i> .....	117
1 Objetivo geral .....	117
1.1 Objetivos específicos .....	117
2 Materiais e métodos .....	117
2.1 Desenho da sonda MB.....	117
2.2 Padronização do ensaio de hidridização molecular utilizando o peptídeo TAT.....	118
2.3 Padronização do ensaio de hibridização por sonda MB e metodologia de fixação e permeabilização celular .....	119
2.4 Imunofluorescência Indireta.....	120
3 Resultados .....	121
3.1 Padronização da técnica de hibridização utilizando sonda MB conjugada ao peptídeo TAT.....	121



<i>3.2 Padronização da técnica de hibridização por sonda MB pelo método de fixação e permeabilização celular</i> .....	124
<i>3.3 Uso da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a detecção de HAdV2</i> .....	125
4 Discussão .....	127
5 Conclusões gerais .....	131
REFERÊNCIAS.....	133
<i>Apêndices:</i> .....	155
Apêndice A: Artigo aceito para publicação referente aos resultados dos Capítulos I e II. ....	155
Apêndice B: Artigo aceito para publicação referente aos resultados do Capítulo III. ....	156



## 1 Introdução

Nas últimas décadas, a avaliação da infecciosidade dos vírus no meio ambiente tem sido pesquisada em diferentes estudos, como na avaliação da dose infecciosa mínima, estudos de persistência e resistência do vírus no ambiente, avaliação do nível de contaminação de águas e outras matrizes ambientais, em estudos para a avaliação da eficácia de inativação viral por diferentes tratamentos de águas e efluentes, sendo que a principal ferramenta disponível para esta avaliação é o cultivo celular (GASSILLOUD et al. 2003).

A infecciosidade viral é caracterizada pela capacidade das partículas virais transportarem seu genoma de uma célula permissiva infectada para outra célula permissiva não infectada, liberando seu material genético no citoplasma ou núcleo celular para que a replicação ocorra com sucesso. O processo de replicação envolve diversos passos essenciais, como adsorção viral a receptores específicos na superfície celular, processos de sinalização celular, endocitose, penetração, desnudamento, síntese do ácido nucleico e proteínas, maturação e espalhamento para as células vizinhas não infectadas (HELENIUS 2007).

Apesar de ser uma metodologia clássica, o uso do cultivo celular com o objetivo de verificar a infecciosidade dos vírus contaminantes de uma amostra ambiental apresenta certas desvantagens, como o fato de possuir custos mais elevados, requerer laboratórios mais equipados e, em alguns casos, não ser factível devido ao fato de alguns vírus contaminantes do ambiente aquático não serem adaptados ao cultivo celular *in vitro* (YEH et al. 2009).

Como alternativa à detecção dos vírus em amostras ambientais utilizando cultura celular, técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações já estão bem estabelecidas e, quando comparadas com os métodos que utilizam somente a infecção *in vitro*, são de mais rápida execução, sendo comumente utilizadas na identificação e detecção de sequências gênicas específicas de diferentes tipos de contaminantes do meio ambiente (WATZINGER et al. 2006). Apesar de rápidas e sensíveis, as técnicas moleculares clássicas e dissociadas da cultura celular não fornecem resultados referentes à infecciosidade dos patógenos virais contaminantes das amostras sendo, desta forma, ferramentas que não podem prever o risco de desenvolver uma doença associada àquela amostra contaminada (CHARLES et al. 2009).

Dentre os vírus humanos de transmissão fecal-oral e que podem contaminar o meio ambiente aquático destacam-se os adenovírus, poliovírus, norovírus, rotavírus e vírus da hepatite A. Esses são comumente excretados em altas concentrações nas fezes e/ou outras secreções de humanos infectados (na ordem de  $10^8$  a  $10^{11}$  partículas virais por grama de fezes), sendo capazes de contaminar direta ou indiretamente águas destinadas ao consumo humano, águas do mar que recebem esgoto e moluscos bivalves cultivados em águas oceânicas impactadas por esgoto doméstico, sobrevivendo no ambiente com relativa estabilidade e ocasionando surtos de doenças em indivíduos susceptíveis (WYN-JONES, SELLWOOD 2001; ASHBOLT 2004; BOSCH et al. 2008; HAMZA et al. 2009).

Atualmente, a pesquisa de vírus contaminantes de diferentes matrizes ambientais apresenta grande destaque no mundo e tem se destacado também no Brasil com grupos desenvolvendo projetos de pesquisa avaliando a presença de vírus em águas de consumo, residuais, lodos, água do mar bem como na carne de moluscos bivalves produzidos nestas águas (DE PAULA et al. 2007; MIAGOSTOVICH et al. 2008; RIGOTTO et al. 2010; SCHLINDWEIN et al. 2010; VECCHIA et al. 2015; XAVIER et al. 2015). Entretanto, poucos grupos de pesquisa tanto no Brasil quanto em outros países têm dedicado a devida atenção ao estudo da infecciosidade de vírus contaminantes do meio ambiente aquático.

Crescem no Brasil e no mundo laboratórios especializados, tanto ligados a agências governamentais quanto privadas, que avaliam os tratamentos e proteção da água no que se refere à patógenos virais causadores de doenças. Esse tipo de abordagem também tem crescido nos ambientes acadêmicos e Institutos de Pesquisa, que têm se dedicado à análise da presença de vírus nos ambientes aquáticos. Muitas dúvidas têm surgido quanto a períodos de tempo e temperaturas de estocagem das amostras coletadas, sendo que é importante avaliar-se e chegar-se a um consenso das influências desses parâmetros nos resultados obtidos pelos laboratórios.

Com base no acima descrito, o projeto desenvolvido e apresentado na presente tese de doutoramento, contribuiu para o desenvolvimento de metodologias de detecção e verificação da viabilidade e estabilidade térmica de patógenos virais entéricos em diferentes matrizes aquáticas, fornecendo subsídios para um melhor entendimento acerca do comportamento destes patógenos e contribuindo também na elaboração de futuras regulamentações acerca

dos procedimentos em relação a estocagem e análise de amostras aquáticas o que refletirá em posteriores estudos de avaliação de riscos no desenvolvimento de doenças veiculadas pelo contato ou ingestão de água e alimentos contaminados por estes patógenos.

O presente trabalho teve como hipótese o fato de que os vírus entéricos avaliados possuem graus distintos de estabilidade quando submetidos às mesmas condições de estocagem e temperatura.



## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Contaminação do ambiente aquático

Apesar dos progressos atuais acerca do tratamento de água e esgoto, doenças relacionadas com a contaminação do ambiente aquático por diferentes patógenos continuam sendo um problema de saúde pública, com implicações socioeconômicas em países desenvolvidos ou em desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), 780 milhões de pessoas ainda não têm acesso a fontes seguras de água e 2,5 bilhões de pessoas ainda vivem em baixas condições de saneamento e higiene, sendo acometidas por episódios fatais e não fatais de doenças diarreicas (WHO 2012).

Dentre os patógenos contaminantes do ambiente aquático destacam-se os vírus entéricos, bactérias e protozoários introduzidos nos mais diferentes tipos de ambientes, como águas de superfície, mananciais, águas de rios, lagos e mares, chegando a contaminar muitas vezes águas subterrâneas (MENA, GERBA 2008; MORGA et al. 2009; OGORZALY et al. 2010). Dentre estes agentes patogênicos, o impacto causado pela contaminação por vírus entéricos é menos estudado do que o ocasionado por bactérias e protozoários, principalmente devido à dificuldade em se detectar estes agentes em águas ambientais (WYN-JONES, SELLWOOD 2001).

Os vírus entéricos podem ser introduzidos nos diferentes ambientes aquáticos por meio de várias atividades humanas e animais, como despejo indireto ou direto de esgoto não tratado ou inadequadamente tratado; o uso incorreto de sistemas de fossas sépticas; pela presença de resíduos de atividades urbanas, industriais e agrícolas; pelo despejo de esgoto não tratado em águas estuarinas, pelo uso de emissários marinhos; ou pelo despejo em águas de rios (FONG, LIPP 2005).

Em relação aos controles de qualidade da água, a Organização Mundial da Saúde disponibiliza, desde 1983, um guia que trata da qualidade da água para o consumo humano (*Guidelines for Drinking Water Quality*) onde indica a *Escherichia coli* ou, alternativamente, coliformes termotolerantes, como o micro-organismo indicador de qualidade de água de consumo (ausência em 100 mL de água), devido ao fato de que a presença de *E. coli* indica contaminação recente da água por matéria fecal. Em situações específicas, como em surtos de doenças causadas pelo consumo de água, a avaliação de outros

patógenos pode ser exigida, como bacteriófagos ou esporos de bactérias. Entretanto, de modo geral, a definição de limites para a detecção de outros patógenos não pode ser mandatória, pois deve levar em consideração o contexto local, ou seja, a condição ambiental, sócio-econômica e cultural do local (WHO 2011).

No Brasil a Portaria do Ministério da Saúde - MS 2.914/2011 dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade requer a ausência dos micro-organismos indicadores coliformes totais e *E. coli* em 100 mL de água. Esta portaria ainda recomenda a inclusão do monitoramento de vírus entéricos no(s) ponto(s) de captação de água proveniente(s) de manancial(is) superficial(is) de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico (BRASIL 2011). Já a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA n° 274/2000, que dispõe sobre a qualidade das águas destinadas às atividades de natação e mergulho (contato primário), prediz que a presença de coliformes termotolerantes não poderá exceder 250 UFC em 100 mL (Unidades Formadoras de Colônias) (CONAMA 2000).

A pesquisa de vírus em águas de superfície tratadas ou não tratadas, bem como em amostras de águas subterrâneas, ou em outros tipos de amostras ambientais, como moluscos bivalves ou águas residuais constitui uma relevante linha de investigação, visando a garantia da qualidade da água de uso e consumo para a população. A inclusão da análise viral para atestar a qualidade das águas pode contribuir para que os vírus entéricos sejam um requerimento obrigatório na avaliação da contaminação dos diferentes tipos de ambientes aquáticos.

Devido à diversidade de ambientes aquáticos no Brasil e tendo em vista que segundo a Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui 168.870 m<sup>3</sup> de recursos hídricos superficiais, o que representa 50% do total dos recursos hídricos da América do Sul e 11% dos recursos hídricos mundiais (IBGE 2008). A avaliação da presença, e mais precisamente da infecciosidade dos patógenos virais presentes em amostras de águas ambientais reveste-se de grande importância, podendo contribuir em um segundo momento, para a tomada de decisões quanto à relevância em se avaliar de forma rotineira a presença destes micro-organismos nos diferentes tipos de águas, usadas para distintas finalidades, bem como na determinação de



um tratamento adequado dos efluentes visando a eliminação destes patógenos.

## **2.2 Os vírus entéricos**

Os vírus entéricos são conhecidos por causarem um grande número de doenças, veiculadas principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados. Dentre essas doenças destacam-se surtos de gastroenterites, otites, doenças do trato respiratório, meningites virais, hepatites entre outras (GRIFFIN et al. 2003). Os vírus entéricos são formados por um único capsídeo externo e uma ou mais camadas proteicas (*layers*) sendo a mais interna, a que envolve o material genético, denominada nucleocapsídeo e desprovidos de envelope bilipídico. O capsídeo possui a função de promover a interação vírus-célula hospedeira necessária para a infecção, evocar a resposta imune no hospedeiro pelo reconhecimento das proteínas virais pelo sistema imune e também de proteger o material genético da degradação por nucleases entre outros fatores, tornando-os desta forma, mais resistentes à inativação (HARRISON 2013).

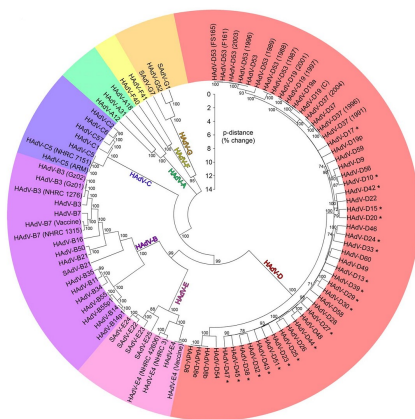
Estão descritos cerca de 140 tipos diferentes de vírus entéricos humanos e dentre estes destacam-se os vírus de genoma RNA fita simples: calicivírus, enterovírus, vírus da hepatite A e E; vírus de genoma RNA fita dupla: rotavírus e picobirnavírus; e de genoma DNA fita dupla: adenovírus (LE GUYADER et al. 2000; GERBA 2005). Estes vírus são altamente estáveis no ambiente aquático, possuem certa resistência aos agentes físicos e químicos de inativação, como umidade, pH, temperatura, radiação ultravioleta e cloro, podendo permanecer viáveis ou potencialmente infecciosos durante meses na água, resistindo a condições ambientais adversas e a processos de tratamento de água e esgoto normalmente destinados ao controle bacteriano. Além disso, podem agregar-se a partículas sólidas do meio aquático, ganhando maior estabilidade (LECLERC et al. 2002; TREE et al. 2003; SKRABER et al. 2004). Devido à relevância em torno da estabilidade dos vírus entéricos no meio ambiente aquático e da importância dos mesmos no desenvolvimento de doenças ligadas ao consumo de água contaminada, elegeu-se os seguintes vírus para estudos de estabilidade e viabilidade em águas de superfície: adenovírus humano, rotavírus humano cepa vacinal (RotaTeq) e norovírus murino, este último, como representante do norovírus humano.

### 2.2.1 Os adenovírus humanos

Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem à família Adenoviridae, gênero *Mastadenovirus* e até o presente momento, mais de 60 sorotipos já foram identificados (ROBINSON et al. 2013) (Figura 1). Atualmente, há um grande esforço na identificação de novos sorotipos devido ao aparecimento de infecções por adenovírus altamente virulentos e com tropismo por diferentes tecidos. Os sorotipos descritos estão agora distribuídos em sete espécies (A-G), sendo que a maioria recentemente descrita está agrupada dentro da espécie D, incluindo um grande número de sorotipos isolados e identificados durante as primeiras duas décadas da epidemia da AIDS (ROBINSON et al. 2013).

Na maioria dos casos, os diferentes sorotipos são distinguidos pela resistência a neutralização por antissoros de outro sorotipo conhecido, por padrões de hemoaglutinação e por sequenciamento do genoma (ALBINANA-GIMENEZ et al. 2009; NEMEROW et al. 2009; BERK 2013).

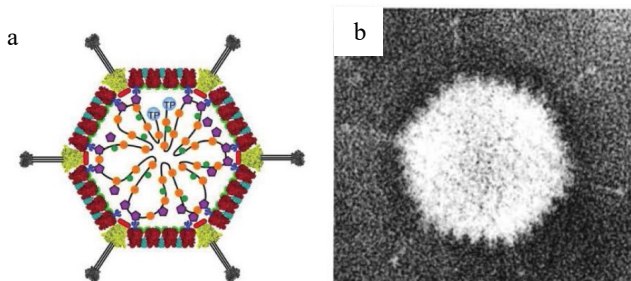
**Figura 1** - Diversidade de adenovírus humano. Análise filogenética completa dos sorotipos de adenovírus humanos, incluindo os novos sorotipos identificados. As diferentes cores representam as sete famílias de HAdV descritas até o momento, sendo verde espécie A (HAdV-A), roxo HAdV-B, azul HAdV-C, salmão HAdV-D, rosa HAdV-E, amarelo fraco HAdV-F e amarelo escuro HAdV-G.



Fonte: adaptado de Robinson et al. 2013.

Como características estruturais os adenovírus possuem seu genoma formado por DNA linear fita dupla (dsDNA) variando de 26 a 45 Kb, ausência de envelope bilipídico. O vírus possui diâmetro médio de 70 a 100 nm e o seu capsídeo possui formato icosaédrico sendo composto por 252 capsômeros, sendo 240 *hexons* e 12 *pentons* e em cada *penton* há a projeção de uma única fibra, que varia de tamanho e de acordo com os sorotipos. A exceção são os sorotipos entéricos, HAdV-40 e 41 (espécie F) que possuem duas fibras projetadas em cada *penton*. Estas fibras são importantes no processo de adsorção às células hospedeiras interagindo com receptores na superfície celular (Figura 2) (MENA, GERBA 2008; BERK 2013).

**Figura 2 - a)** Representação esquemática da estrutura do adenovírus com a localização das proteínas do capsídeo viral, sendo as proteínas majoritárias *hexon* (em vermelho), *penton* (em amarelo) e as fibras (em cinza); **b)** Imagem de uma microscopia de transmissão eletrônica com a visualização do capsídeo do adenovírus e a localização das fibras que atuam no processo de adsorção viral à célula hospedeira.



Fonte: adaptado de Fields Virology, 6ª edição, 2013.

Os adenovírus são relatados por serem resistentes a desinfecção por diferentes tipos de agentes químicos e físicos e até mesmo a extremos de pH (MENA, GERBA 2008). Estudos evidenciam que o adenovírus é até 60 vezes mais resistente a danos no DNA provocados pela incidência de luz ultravioleta (U.V.) do que outros vírus que possuem material genético de RNA, como o vírus da hepatite A e enterovírus, isto porque uma das fitas de DNA não danificadas pela exposição à luz U.V. pode servir como molde para o reparo da outra fita, usando enzimas da célula hospedeira para a realização deste reparo (FONG, LIPP 2005; SIRIKANCHANA et al. 2008).

Surtos de gastroenterites ou outras enfermidades causadas pelos adenovírus vêm sendo relatadas e possuem em comum a veiculação do vírus pelo ambiente aquático, como por exemplo, em águas utilizadas para recreação, água do mar, piscinas e rios; água de superfície; água de consumo tratada ou não tratada; águas subterrâneas e águas residuais (XAGORARAKI et al. 2007; LAMBERTINI et al. 2008; SIRIKANCHANA et al. 2008).

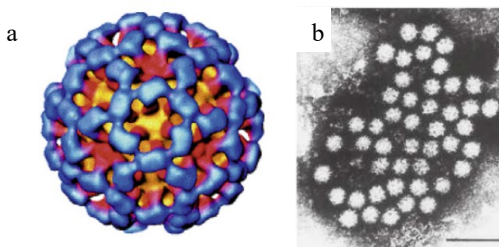
A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA) elabora desde 1998 uma lista com os principais micro-organismos indicadores de contaminação em amostras de água de consumo (*Contaminant Candidate List – CCL*) e os adenovírus figuram nesta lista desde sua primeira concepção até a última publicada, em 2009 (CCL 3) (USEPA 2009).

Os sorotipos 2, 5 (espécie C) e 40 e 41 (espécie F), são os modelos virais mais utilizados em estudos de inativação viral devido, no caso dos sorotipos 2 e 5, à fácil infecção de células permissivas *in vitro* e posterior detecção por métodos como ensaio de placa de lise e TCID<sub>50</sub>. Os sorotipos entéricos 40 e 41, apesar de apresentarem crescimento fastidioso em cultura celular, são considerados os principais causadores de gastroenterites graves em crianças depois do rotavírus, além de serem muito relatados pela alta resistência aos processos de desinfecção de água (GERBA et al. 2003; EISCHEID et al. 2009; RIGOTTO et al. 2011).

### **2.2.2 *Norovírus humano e o norovírus murino***

O gênero *Norovírus*, (NoVs) membro da família Caliciviridae, é um vírus não envelopado de formato icosaédrico com cerca de 27-40 nm de diâmetro (Figura 3). Apresenta genoma formado por RNA linear fita simples de senso positivo (ssRNA) com cauda poliadenilada e tamanho aproximado de 7,5 a 7,7 Kb organizado em três ORFs (*open reading frames*) (GREEN 2013). Estima-se que 5 a 31% das hospitalizações por gastroenterites são causadas por infecções pelo norovírus sendo considerado o principal causador de gastroenterites não bacterianas em todo o mundo, com média de 19 a 21 milhões de casos e 570 a 800 mortes por ano nos Estados Unidos da América, sendo a causa mais comum de diarreia em adultos e o segunda em crianças (GLASS et al. 2009; HALL et al. 2013).

**Figura 3 - a)** Representação esquemática da estrutura do capsídeo do norovírus com as características estruturas em formato de cálice devido aos arranjos das proteínas VP1 do capsídeo viral; **b)** Partículas de norovírus isoladas de fezes e visualizadas por imunomicroscopia eletrônica.



Fonte: adaptado de Scipioni et al. 2008 e Fields Virology, 6ª edição, 2013.

O principal modo de transmissão do norovírus é pela via fecal-oral, entretanto, devido a características do vírus como a elevada estabilidade no meio ambiente, resistência a fatores inativantes como o cloro e altas temperaturas (60 °C) sendo a dose necessária para desencadear infecção em humanos ( $HID_{50}$ ) estimada entre 1.320 a 2.800 gEq (equivalente em genomas), entretanto, existe também a possibilidade de transmissão por gotículas, fômites, contato com pessoas infectadas e contaminação do ambiente (PATEL et al. 2008; TEUNIS et al. 2008; GLASS et al. 2009; ATMAR et al. 2014).

Os norovírus são capazes de causar infecções em diversos animais, como infecções no trato digestivo de humanos, suínos, bovinos e caninos; infecções no trato respiratório superior, em gatos e doenças hemorrágicas em coelhos (SCIPIONI et al. 2008). O sequenciamento completo do genoma referente ao capsídeo viral permitiu e estabeleceu a classificação dos NoVs em seis genogrupos (GI a GVI) e um novo genogrupo proposto (GVII). GI, II e IV são responsáveis pela maioria dos casos de infecção em humanos, GIII em bovinos, GV em murinos, GII em porcinos e GIV em felinos. Devido à grande taxa de recombinação durante o processo de replicação e à inexistência de um consenso classificatório dentro da divisão de cada genogrupo, foi proposta por Zheng et al. (2006) uma subdivisão abaixo do nível de gênero, onde dentro dos cinco genogrupos foram identificados outros 33 genotipos (9 para o GI; 22 para o GII; 2 para o GIII, 2 para o GIV e

um para o GV), baseados nas sequências aminoacídicas da proteína VP1 do capsídeo (ATMAR 2010; VINJÉ 2015).

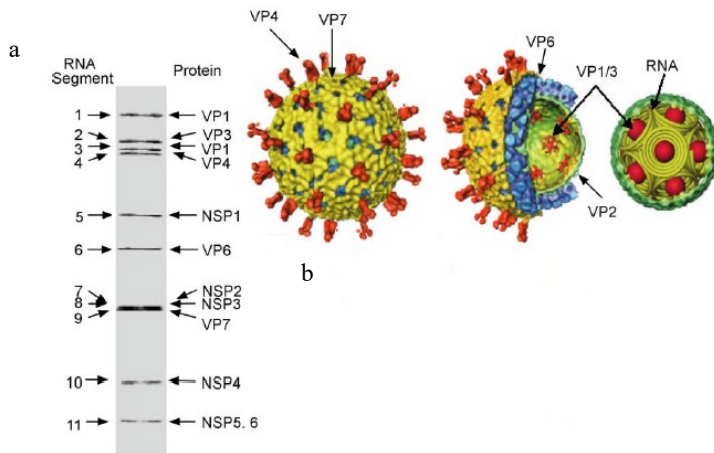
Dos genogrupos existentes, o norovírus murino (MNV-1) foi o único que apresentou capacidade de replicação *in vitro* em cultura de células (WOBUS et al. 2006). Esta cepa de norovírus é apontada como um modelo para inferir as características dos norovírus humanos (que até recentemente não eram adaptados ao cultivo *in vitro*) para estudos de estabilidade e quantificação utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7 (BAERT et al. 2008). Do ponto de vista molecular, MNV-1 compartilha muitas características genéticas com os genogrupos humanos e até mesmo com relação à patogenia, sendo o MNV-1 também capaz de se disseminar pela via fecal-oral e altas concentrações de partículas virais são encontradas nas fezes do animal infectado (WOBUS et al. 2006).

Recentemente, Jones et al. (2014) demonstraram a capacidade de replicação *in vitro* do HuNoV em linfócitos humanos do tipo B na presença de enterobactérias específicas ou antígenos HBGAs do sangue. Porém esta abordagem ainda é pouco utilizada sendo que a maioria dos estudos vêm usando o MNV-1 como modelo viral para estudos de desinfecção e estabilidade do norovírus humano, por agentes como ozônio, cloro e temperatura (HEWITT et al. 2009; LIM et al. 2010; VERHAELLEN et al. 2012).

### **2.2.3 Os rotavírus**

Os rotavírus (RV) são vírus icosaédricos, não envelopados e pertencem à família Reoviridae, gênero *Rotavirus*. A partícula viral mede aproximadamente 70-90 nm de diâmetro e é constituída por 3 camadas proteicas e um genoma com 11 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA). Das proteínas codificadas por esses segmentos, seis são estruturais (VP1 a VP7) e seis são não estruturais (NSP1 a NSP5/6) (Figura 4) (ESTES, GREENBERG 2013).

**Figura 4 - a)** Ilustração de um gel de poliácridamida mostrando os 11 segmentos do genoma do rotavírus; os segmentos dos genes estão numerados à esquerda e as proteínas traduzidas por estes segmentos indicadas à direita; **b)** Representação esquemática da estrutura do capsídeo do rotavírus mostrando as três camadas protéicas (VP7/VP4, VP6 e VP2) que envolvem o material genético e constituem o vírion.



Fonte: adaptado de Jayaram et al. 2004.

Os RV são sorologicamente classificados em sete grupos distintos (A - G) baseados na antigenicidade da proteína estrutural VP6, sendo recentemente proposta a inclusão de um oitavo grupo H. Os RV pertencentes ao grupo A são responsáveis pela maioria das gastroenterites graves que acometem crianças com idade de até 5 anos (JAYARAM et al. 2004; MATTHIJNSSENS et al. 2012; ESTES, GREENBERG 2013).

A classificação binária é designada pela especificidade de anticorpos neutralizantes contra epítomos das proteínas da camada mais externa do capsídeo viral (VP7 e VP4), definindo os sorotipos denominados G, pois a VP7 é uma glicoproteína e sorotipos P, pois a VP4 é uma proteína susceptível à clivagem por proteases presentes no intestino que promovem sua adsorção aos vilos intestinais (JAYARAM et al. 2004). Diferentes combinações entre os sorotipos G-P podem ocorrer devido a rearranjos durante a coinfeção por diferentes sorotipos (GENTSCH et al. 2005; ESTES, GREENBERG 2013). Mais recentemente, Matthijnssens et al. (2008) estabeleceram um novo sistema de classificação onde genótipos específicos são designados

baseando-se nas sequências nucleotídicas de cada um dos 11 segmentos do genoma do RV.

Os rotavírus são os principais agentes etiológicos causadores de gastroenterites agudas, sendo relacionados, no ano de 2011, com cerca de 192.700 ou 27,1% de todos os casos de mortes por diarreia em crianças menores de 5 anos de idade. Dos episódios de diarreia grave, 56% foram identificados em quinze países, Afeganistão, Angola, Burkina Faso, China, República Democrática do Congo, Etiópia, Índia, Indonésia, Quênia, Mali, Niger, Nigéria, Paquistão, Tanzânia e Uganda. Nas Américas, são estimadas 11.000 mortes relacionadas com eventos de diarreia, sendo 2.600 (23,4%) delas ocasionadas pelo rotavírus (WALKER et al. 2013).

Destes episódios de diarreia ocasionadas por infecções pelo RV, cinco combinações de genótipos foram identificadas como causadoras da maioria dos surtos ao redor do mundo: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (SANTOS, HOSHINO 2005; GURGEL et al. 2008). No Brasil, alguns casos de diarreia causada pelos sorotipos G9 e G5 já foram relatados (ARAÚJO et al. 2002; LINHARES et al. 2006). Além de casos esporádicos causados por sorotipos não usuais ocasionando sempre diarreias severas em crianças (KIRKWOOD 2010).

Baseado nesses genótipos circulantes, duas vacinas atenuadas estão atualmente disponíveis: Rotarix (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) e RotaTeq (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA). Rotarix é uma vacina monovalente, composta pelo genótipo G1P[8] do rotavírus introduzida desde 2006 no Plano Nacional de Imunização (PNI) brasileiro. RotaTeq é uma vacina pentavalente, contendo cinco genótipos humanos e um bovino, onde o genótipo bovino (WC3) foi reestruturado para apresentar as proteínas de superfície dos sorotipos virais humanos G1, G2, G3, G4 e P[8]) (RUIZ-PALACIOS et al. 2006; VESIKARI et al. 2006). O impacto positivo da introdução desta vacina já foi demonstrado em alguns países europeus, africanos e americanos (CARVALHO-COSTA et al. 2011). Contudo ainda não se tem estudos sobre o impacto negativo da vacinação, frente à problemática de recombinações e rearranjos do RV vacinal no ambiente, já que este também é liberado nas fezes humanas de indivíduos vacinados por tratar-se de uma vacina composta por vírus atenuados e, portanto, não indicada a crianças imunodeficientes (SANTOS, HOSHINO 2005).

Dentre todos os mecanismos que podem aumentar a diversidade dos sorotipos do rotavírus, está a possibilidade de rearranjos



dos segmentos do genoma viral que pode ocorrer naturalmente durante uma co-infecção do hospedeiro com sorotipos selvagens e/ou vacinais (ITURRIZA-GÓMARA et al. 2001). Alguns estudos já demonstraram a excreção dos sorotipos que compõem a vacina pentavalente RotaTeq em fezes de crianças vacinadas após a primeira ou segunda dose, além de casos de gastroenterites em crianças causados por sorotipos derivados da vacina e que sofreram rearranjos (PATEL et al. 2010; YEN et al. 2011; DONATO et al. 2012). Estes estudos evidenciam a transmissão horizontal da vacinal atenuada do RV e a possível contaminação do ambiente aquático por cepas que sofreram rearranjos, ocasionando a ocorrência de novas infecções.

Estudos de pós-implantação da vacina em países onde a Rotarix<sup>®</sup> foi adotada, como o Brasil, mostraram um aumento significativo na detecção dos genótipos G2 e G9. Vale ressaltar que tal imunizante é do tipo G1P[8], o qual apesar de promover proteção cruzada contra os demais tipos usuais de RVA, não possui tipos G2 e G9 na sua composição (CARVALHO-COSTA et al. 2009).

A transmissão dos RV, especialmente os RVA, se dá principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminados por meio de contaminação do ambiente por dejetos humanos (SANTOS, HOSHINO 2005). A veiculação de RVA pela água já tem sido evidenciada durante todas as estações do ano, porém com uma maior frequência no inverno (BORCHARDT et al. 2003; FONGARO et al. 2012).

Estudos demonstram que a persistência do rotavírus e sua infecciosidade no meio ambiente variam de acordo com o tipo de água que é analisada, apresentando valores diferentes em análises de água de superfície e de águas subterrâneas, sendo as primeiras as que apresentam maior contaminação, uma vez que este tipo de água favorece o agregamento viral às partículas sólidas em suspensão (ARIAS et al. 2008; ESPINOSA et al. 2008).

### ***2.3 Tipos de amostras ambientais e considerações sobre a inativação viral***

O interesse em se avaliar a estabilidade viral em diferentes amostras, incluindo amostras provenientes de ambientes aquáticos vem crescendo à medida que estudos demonstram a grande presença e persistência dos vírus entéricos como contaminantes, principalmente do meio ambiente aquático, e a correlação desta contaminação com o surgimento de surtos devido à exposição de indivíduos às fontes

contaminadas (LE GUYADER et al. 2006; BEGIER et al. 2008; PRADO et al. 2010; ASLAN et al. 2011).

Diversos trabalhos apontam que diferentes micro-organismos, entre eles os vírus entéricos, se comportam diferentemente quanto à sua estabilidade, seja ela genômica ou infecciosa, nos distintos tipos de matrizes, sejam estas matrizes aquáticas das mais variadas origens, alimentos ou solo (HURST, GERBA 1980; FONG, LIPP 2005; TULADHAR et al. 2012; CARRATALÀ et al. 2013a).

O estabelecimento de um perfil de inativação viral varia de acordo com o tipo de matriz ambiental avaliada, tipos e características estruturais do vírus (família, gênero, espécie), métodos de detecção utilizados (cultura celular ou molecular) e fatores que interferem na estabilidade viral. Em relação ao tipo de matriz ambiental, Bertrand et al. (2012), compilou dados referentes à 76 trabalhos publicados que avaliaram o impacto da temperatura na inativação de diferentes vírus entéricos em matrizes aquáticas e em alimentos e dividiu os resultados obtidos de acordo com o tipo de matriz envolvida no estudo. O Quadro 1 resume os tipos de matrizes em relação ao seu perfil de complexidade, que permite avaliar como se dá a estabilidade viral em relação à ação da temperatura.

**Quadro 1** - Tipos de matrizes identificadas usualmente utilizadas na avaliação da estabilidade térmica de vírus entéricos de acordo com a complexidade da sua composição.

	<b>Tipos de matrizes</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Simple</b>	<i>Sintética</i>	Tampão fosfato, meio de cultura celular (esterilizado, sem partículas em suspensão)
	<i>Água de consumo</i>	Água de torneira (sem cloro), água mineral engarrafada, água destilada
	<i>Água subterrânea</i>	Água subterrânea filtrada ou não filtrada, água de poço
<b>Complexa</b>	<i>Água de superfície</i>	Água de rios, lagos, lagoas
	<i>Água do mar</i>	Água do mar e estuário
	<i>Esgoto</i>	Água de esgoto primário e secundário
	<i>Solo</i>	Solo
	<i>Laticínios</i>	Leite, cremes a base de leite, queijo
	<i>Alimentos</i>	Vegetais, frutas, moluscos, carne
	<i>Urina</i>	Utilizada como proposta de reuso na agricultura

Fonte: adaptado de Bertrand et al. 2012.

Sabe-se que além da temperatura, outros fatores, como a susceptibilidade à inativação pela radiação solar (U.V.), variação de pH, turbidez, composição orgânica, presença de micro-organismos predadores, agregação dos vírus às partículas sólidas em suspensão, podem influenciar positiva ou negativamente na estabilidade e consequente manutenção da infecciosidade viral (HURST, GERBA 1980; FONG, LIPP 2005; JOHN, ROSE 2005; WIGGINTON et al. 2012).

A temperatura é considerada o fator mais importante envolvido na inativação dos vírus presentes no ambiente aquático, bem como em outras matrizes (WARD et al. 1986; BERTRAND et al. 2012). Altas temperaturas podem danificar o capsídeo viral ou os ácidos nucleicos, podendo impedir ou dificultar a adsorção viral às células hospedeiras ou inativar enzimas virais requeridas no processo de replicação (FONG, LIPP 2005).

Diversos trabalhos têm avaliado o comportamento dos vírus entéricos quanto à sua estabilidade térmica destacando inclusive a importância em distinguir a diferença entre a estabilidade de vírus infecciosos (viáveis) *versus* a presença do genoma viral (GASSILLOUD et al. 2003; DE RODA HUSMAN et al. 2009).

Usualmente a escolha das temperaturas na avaliação da estabilidade viral é realizada utilizando valores que mimetizam a temperatura ambiental de um determinado local ou região do país; podem ser também definidos valores de acordo com a matriz, no caso de alimentos, as temperaturas normalmente utilizadas nos processos de cozimento ou pasteurização (TULADHAR et al. 2012; CARRATALÀ et al. 2013a). Entretanto, poucos trabalhos têm se dedicado à avaliação da estabilidade viral em temperaturas normalmente utilizadas para a estocagem de amostras contendo vírus em laboratório, como temperaturas a 4, -20 e -80 °C (MENG et al. 1987; ALLWOOD et al. 2003; OLSON et al. 2004) e isso reveste-se de importância pois os laudos de sanidade ou projetos de pesquisa podem ter resultados equivocados devido ao comportamento dos vírus durante sua estocagem e processamento.

Os trabalhos disponíveis na literatura que avaliaram a ação da temperatura na diminuição da estabilidade de vírus entéricos, estejam eles presentes em amostras ambientais ou não, demonstram diferentes padrões na preservação da viabilidade viral em relação ao modelo viral utilizado, técnica e amostra ambiental.

Muitos estudos avaliando o efeito da temperatura na inativação viral utilizam como modelo o poliovírus tipo 1 (PV1) em diferentes tipos de amostras de água. Isto se deve basicamente ao fato de o PV1 ser um vírus bem adaptado ao cultivo celular, permitindo a realização de ensaios de infecciosidade viral e também ensaios moleculares. Em amostras de água mineral, Gassilloud et al. (2003) demonstraram que o PV1 permaneceu viável por até 262 dias a 10 °C e que a elevação da temperatura para 35 °C promoveu a inativação de 3,5 log<sub>10</sub> em apenas 16 dias. Entretanto a Organização Mundial da Saúde tem realizado fortes campanhas entre os pesquisadores para que se eliminem dos laboratórios todos os estoques de poliovírus, mesmo as cepas vacinais, para evitar-se ao máximo a possibilidade de entrada desses vírus no meio ambiente uma vez que até abril de 2016 a vacina atenuada trivalente será substituída por uma vacina bivalente, contendo apenas os sorotipos 1 e 3 (WHO 2015).

Em outro estudo, Enriquez et al. (1995), demonstraram que a estabilidade do adenovírus entérico tipo 41 (HAdV41), foi muito mais elevada em comparação ao HAV e ao PV1 utilizando água de torneira estocada a 4 °C e que o tempo necessário para o decaimento de 2 log<sub>10</sub> (T<sub>99</sub>) foi de 304, 56 e 41 dias para os vírus citados respectivamente.

Quando se comparou a estabilidade de vírus entéricos em amostras de água de superfície e água subterrânea estocadas a 25 °C, Bae et al. (2008) demonstraram que a infecciosidade dos vírus decaía mais rapidamente na água de superfície quando comparada com a água subterrânea. Espinosa et al. (2008) também comparando a persistência da infecciosidade de rotavírus e astrovírus em amostras de água de superfície e água subterrânea, demonstraram o mesmo perfil de inativação, onde os vírus permaneceram viáveis por mais tempo nas amostras de água subterrânea.

Estudos que avaliaram a estabilidade viral em amostras de água do mar demonstraram que vírus de genoma RNA presentes neste tipo de água podem permanecer viáveis por um período de até 60 dias a temperaturas médias de 23 °C. Porém quando esta temperatura se eleva para cerca de 30 °C a infecciosidade não dura mais do que 30 dias (MENA, GERBA 2008). Outros autores já demonstraram que HAV e poliovírus permaneceram viáveis por períodos de até 617 dias em amostras de água do mar estocadas a 4 °C. Já quando se elevam a temperaturas para 25 °C, 90% dos vírus foram inativados em apenas 25 dias (GANTZER et al. 1998). Outro trabalho demonstrou que dois dias de incubação a 22 ou 30 °C foram suficientes para inativar 90% de poliovírus semeado em água do mar natural, e que após quatro dias já não foi mais possível detectar-se vírus infecciosos (WETZ et al. 2004).

Um dos fatores que podem atuar em conjunto com a ação da temperatura e, justificam em parte, os mecanismos envolvidos na inativação viral mais rápida pela ação desta, é a presença de diferentes micro-organismos, característicos de acordo com cada tipo de matriz aquática e que atuam na inativação dos vírus por meio de predação ou ação virucida (FONG, LIPP 2005). Wetz et al. (2004) demonstraram que a viabilidade dos enterovírus foi consideravelmente afetada em temperaturas de 22 e 30 °C em amostras de água do mar natural não filtrada em comparação com amostras de água do mar artificial filtrada. Ward et al. (1986) conduziram experimentos a temperatura constante de 27 °C em diferentes amostras de água de superfície e concluíram que a presença de micro-organismos distintos em cada tipo de amostra são, em conjunto com a temperatura, responsáveis por uma maior inativação do echovirus tipo 12, devido a ação de enzimas proteolíticas bacterianas podem atuar nas proteínas do capsídeo viral clivando-as e expondo o RNA viral à degradação por RNases presentes no meio.

A agregação viral é, atualmente, um fator muito discutido em trabalhos que tentam desenvolver processos eficientes de inativação

viral e está diretamente relacionada com a capacidade do vírus se disseminar pelo ambiente aquático e consequentemente resistir à ação de fatores inativantes presentes no meio ou em processos de tratamento de água, como a filtração (DIKA et al. 2011).

O decaimento no número de partículas virais no meio ambiente aquático está ligado basicamente a dois processos: inativação ou adesão-agregação. Ambos levam a redução do número de partículas no meio, entretanto, esta redução pode ser real (inativação) ou aparente (adesão-agregação). A redução aparente é devida ao fato que os vírus não estão mais presentes na fase líquida, e sim agregados uns aos outro ou às partículas sólidas do meio (GASSILLOUD, GANTZER 2005).

A capacidade das partículas virais se agregarem varia de acordo com o sorotipo viral, e está intimamente relacionada com as propriedades de superfície do vírus, como a carga iônica. Estas são diretamente afetadas pelo pH do meio, pela força iônica e pela presença de matéria orgânica na matriz aquática ou no meio onde se encontram. Quanto maior é o ponto isoelétrico de um vírus, mais negativa será sua carga e maior será a probabilidade de agregação. Já a adesão está diretamente associada com a carga da superfície e hidrofobicidade (GASSILLOUD, GANTZER 2005; DIKA et al. 2011).

Poucos estudos de inativação viral levam em consideração a possibilidade do fenômeno da adesão e agregação, isto pode levar a uma superestimação dos processos de inativação. A constatação de que este fenômeno possa estar interferindo na superestimação da inativação viral, pode ser visualizado de acordo com o modelo estatístico utilizado para a análise dos dados de inativação.

#### ***2.4 Metodologias disponíveis para a avaliação da infecciosidade viral em amostras ambientais***

Como citado anteriormente, a presença de pequenas quantidades de partículas virais intactas no meio ambiente aquático já pode ser suficiente para o desencadeamento de uma infecção, sendo assim, há a necessidade de se desenvolver métodos rápidos, capazes de identificar pequenas quantidades de partículas virais infecciosas em amostras ambientais (HAMZA et al. 2011). Existem diferentes metodologias que podem ser empregadas na avaliação da viabilidade viral em amostras ambientais, sendo divididas em dois grandes grupos: as que utilizam somente cultura de células e as que utilizam cultura de células acoplada a outros métodos de detecção, como a PCR ou ensaios imunológicos. Todos os ensaios descritos na atualidade possuem

vantagens, como alta sensibilidade, especificidade e rapidez e/ou desvantagens como custo elevado, serem suscetíveis a toxicidade dos componentes presentes na matriz ambiental, a componentes inibitórios das reações enzimáticas e tempo elevado para a detecção (RODRÍGUEZ et al. 2009).

O Quadro 2 resume alguns dos principais métodos utilizados na avaliação da viabilidade viral em diferentes tipos de amostras.

**Quadro 2** - Métodos utilizados na avaliação da infeciosidade viral em diferentes matrizes.

Método	Variações
Cultura celular	Placa de lise
	TCID <sub>50</sub>
	ECP (efeito citopático)
	MNP (número mais provável)
Cultura celular acoplada a métodos moleculares	ICC-PCR (RT, <i>nested</i> )
	ICC-qPCR/ ICC-RT-qPCR/ ICC-RT-et-qPCR
	Citometria de fluxo
	<i>Molecular beacon</i>
Reação em cadeia da polimerase- PCR	Imunofluorescência indireta
	Tratamento enzimático
	Amplificação de longo fragmento
	Tratamento com corantes
	Imunoseparação magnética

Fonte: adaptado de Rodríguez et al. 2009 e Hamza et al. 2011.

### - Ensaio de formação de placas de lise (PL)

A partir da inoculação de uma monocamada celular com diferentes diluições do vírus, a infecção é monitorada pela imobilização parcial da dispersão viral por meio do emprego de meio espesso ou semi-sólido para delimitar a replicação viral e lise celular. O método demonstra que a formação de placas de lise isoladas contadas na maior diluição viral, é devida a infecção inicial de uma célula por uma partícula viral. Esta conclusão, é claro, deve levar em consideração que a partir de uma célula infectada há a produção de inúmeras novas partículas virais, sendo subjetiva a estimativa da dose inicial de vírus inoculada nas células (TEUNIS et al. 2005).

### - Cultura celular integrada a PCR e variações (ICC-PCR)

O método de cultura celular integrada a PCR (ICC-PCR) foi inicialmente desenvolvido para contornar as desvantagens que muitas vezes os dois métodos apresentam em separado, como a demorada replicação de vírus fastidiosos em cultura celular, a presença de

inibidores de reações enzimáticas da PCR e a baixa sensibilidade devido à presença de poucas partículas virais na amostra (RODRÍGUEZ et al. 2009).

Inicialmente, o método baseava-se na inoculação das amostras em monocamada celular, seguido da extração do material genético liberado no sobrenadante da cultura. As reações moleculares variavam de acordo com o material genético do vírus, podendo ser uma PCR (para vírus de genoma DNA), ou uma RT-PCR (para vírus de genoma RNA). Em alguns casos, onde havia a necessidade de aumento de sensibilidade, podia-se ainda, prosseguir com uma reação de *nested-PCR* ou *semi-nested-PCR* após a primeira reação de amplificação (CHAPRON et al. 2000; REYNOLDS 2004). Com o advento da reação de PCR em tempo real (qPCR), passou-se a utilizar a técnica de ICC seguida da amplificação por qPCR ou RT-qPCR, empregando tanto sondas de hidrólise, tipo TaqMan quanto marcação por SYBR Green utilizando curvas de desnaturação de produtos amplificados (LAMBERTINI et al. 2008; LI et al. 2010). Entretanto esses métodos são criticados, pois ainda podem amplificar vírus não infecciosos que permaneceram adsorvidos à superfície celular.

Nos últimos anos, alguns aperfeiçoamentos da metodologia têm sido realizados com o intuito de aprimorar a sensibilidade do método e assegurar que as cópias genômicas detectadas nos ensaios de qPCR referem-se com exatidão ao número de genomas provenientes de vírus infecciosos, que infectaram as células. Estas mudanças vão desde a extração do material genético diretamente da monocamada celular e não mais do sobrenadante, ou a extração do mRNA (quando tratar-se de vírus de genoma DNA), sendo este mRNA proveniente de vírus viáveis cujo DNA está sendo transcrito a mRNA durante a replicação. Ainda, é possível após a extração, tratar o RNA extraído com a enzima DNase I, a fim de eliminar qualquer DNA proveniente de vírus não viáveis e que poderiam superestimar os valores de cópias genômicas detectados (KO et al. 2005b; FONGARO et al. 2013).

#### **- Tratamento enzimático da amostra previamente a reação de PCR**

Vírus que, por algum motivo, tiveram seu capsídeo danificado, perdem a capacidade de se replicar, pois não conseguem seguir os passos de adsorção e penetração às células hospedeiras. Sabe-se, entretanto, que muitas vezes a integridade do genoma viral permanece inalterada, e a detecção do genoma viral realizada pela PCR não é capaz (na maioria das vezes) de distinguir entre genomas provenientes de



vírus viáveis e genomas provenientes de vírus não viáveis, podendo assim, fornecer resultados superestimados. Esse problema pode ser minimizado pelo tratamento prévio das amostras, previamente à extração do material genético, com nucleases (DNase e RNase), dessa forma o material genético viral é degradado e somente o material genético proveniente de vírus íntegros é amplificado (BOFFIL-MAS et al. 2006; RODRÍGUEZ et al. 2009; HAMZA et al. 2011). Esse método não elimina a possibilidade de se amplificar genomas de vírus que tenham capsídeos danificados (sem capacidade infecciosa), mas que ainda tem o seu genoma protegido e, portanto passível de amplificação.

### **- Citometria de Fluxo e Imunofluorescência Indireta**

A citometria de fluxo e a imunofluorescência indireta são métodos baseados na detecção de células infectadas por determinado vírus utilizando anticorpos específicos marcados com fluorocromos, ou até mesmo o uso de células e/ou vírus modificados geneticamente e que expressem, durante a infecção, uma proteína fluorescente, como por exemplo, a GFP (proteína verde fluorescente), permitindo dessa forma, a visualização da infecção viral. Os passos dos métodos normalmente envolvem a infecção de células permissivas com a amostra e da detecção seguindo passos de fixação, permeabilização e incubação com anticorpos específicos. A detecção é realizada em citômetro de fluxo que permite a contagem do número de eventos (células infectadas/fluorescentes) ou em microscópio de fluorescência (no caso da imunofluorescência), indicando dessa forma o número de vírus viáveis na amostra (ABAD et al. 1998; CANTERA et al. 2010).

### **- Amplificação de longo fragmento**

Normalmente, as reações de PCR utilizam iniciadores que flanqueiam uma pequena região alvo do genoma viral que compreende poucos pares de bases. A amplificação de um longo fragmento do genoma resulta em uma melhor correlação entre a detecção de genoma e infecciosidade. No caso de vírus de genoma RNA, como por exemplo, o poliovírus, é possível a realização da reação de transcrição reversa utilizando um iniciador cauda poli (T), que permitirá que a transcrição reversa do RNA a cDNA ocorra à partir do início do genoma (cauda poli (A) do poliovírus). Assim, se o RNA do vírus tiver sofrido algum dano, a síntese do cDNA será interrompida (SIMONET, GANTZER 2006).

O mesmo princípio pode ser utilizado para vírus de genoma DNA, onde a região alvo a ser amplificada precisa ter um tamanho ideal para que somente genomas intactos (não degradados) sejam amplificados, permitindo a detecção de vírus potencialmente viáveis (RODRÍGUEZ et al. 2009).

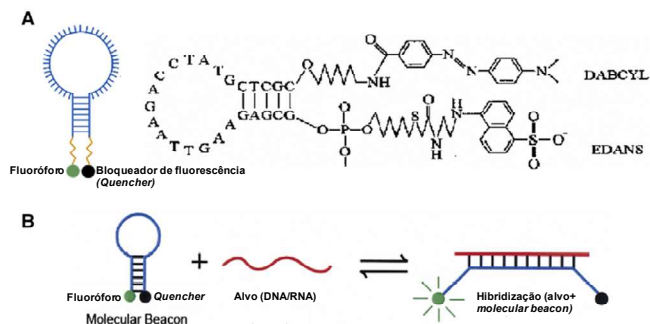
### - Hibridização por sonda do tipo *Molecular Beacon*

*Molecular Beacon* (MB) consiste de uma sonda molecular marcada por fluoróforo composta por uma sequência de oligonucleotídeos simples fita desenhados de forma a apresentar complementaridade a um determinado material genético alvo. Normalmente é desenhada de modo a conter 20-35 nucleotídeos em uma conformação estrutural em forma de *stem-loop* (TYAGI, KRAMER 1996; LI et al. 2008). A região que está em forma de *loop* contém a sequência gênica específica e complementar ao alvo e a região *stem*, geralmente composta de 5-6 nucleotídeos, hidridiza-se nela mesma na ausência da molécula alvo permitindo que a sonda mantenha sua conformação em formato de grampo (*hairpin*). Na extremidade 5' está ligado o fluoróforo e na extremidade 3' está ligado um bloqueador de fluorescência (*quencher*) (HUANG, MARTÍ 2012) (Figura 5a).

Quando a sonda não está hibridizada com a sequência alvo, a proximidade física entre o fluoróforo e o bloqueador impede a emissão de fluorescência pela formação da transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) onde a fluorescência emitida pelo fluoróforo é quase totalmente absorvida pelo bloqueador. Em condições experimentais, quando a sonda consegue hibridizar-se na sequência alvo, há uma separação das duas extremidades e a perda da estrutura conformacional, resultando no distanciamento entre o fluoróforo e o bloqueador, desfazendo a FRET e permitindo a emissão de sinais fluorescentes (Figura 5b).

Devido a sua alta especificidade, a sonda MB vem sendo utilizada em diferentes ensaios moleculares, como PCR em tempo real e também em ensaios *in vitro*, como por exemplo, a visualização em tempo real da replicação do adenovírus, hepatite A e echovírus (MCKILLEN et al. 2007; YEH et al. 2008; DUNAMS et al. 2012).

**Figura 5 - a)** Estrutura clássica de uma sonda do tipo *Molecular Beacon*; **b)** Como o método funciona.



Fonte: adaptado de Li et al. 2008.

Existem diferentes estratégias para a entrada da sonda na célula permitindo assim a hibridização da sonda à região gênica complementar do vírus durante sua replicação intracelular.

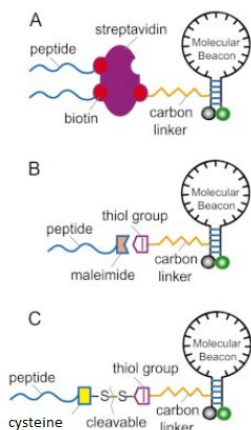
Dentre os primeiros métodos destacam-se o uso de carreadores como os lipossomos, permeabilização da membrana celular pelo uso de estreptolisina O (SLO), microinjeção e eletroporação. Todas essas abordagens apresentam vantagens (como baixo custo e, em alguns casos, rapidez), e, desvantagens (algumas são invasivas, demoradas ou passíveis de resultados falso positivos) (MARRAS 2006).

Recentemente, tem-se descrito o uso de sondas ligadas (conjugadas) a peptídeos (*cell penetrating peptides* – CPPs) que permitem dessa forma a passagem da sonda através da membrana celular (MARRAS 2006).

Diferentes peptídeos têm sido descritos (TAT, R9, HR9, HRS, entre outros) e também diferentes estratégias de conjugação dos mesmos às sondas, normalmente baseadas em ligações covalentes com grupos tiol ou não covalentes via biotina-estreptoavidina (Figura 6). As vantagens do uso de peptídeos conjugados a sonda MB vão desde a possibilidade de entrada direta pela membrana celular (evitando a via endocítica e com isso o confinamento da sonda nessas vesículas); o aumento da resistência a degradação por nucleases (diminuindo ou até mesmo impedindo a ocorrência de resultados falso positivos por degradação da sonda ou decorrente da auto-hibridização) e aumento da estabilidade da sonda no ambiente citoplasmático (NITIN NITIN et al. 2004; MARRAS 2006; LIU et al. 2011).

A escolha dos peptídeos assim como do melhor método de conjugação é um dos pontos cruciais no desenho e padronização do uso de sondas MB para a detecção de vírus utilizando esta técnica.

**Figura 6** - Ilustração esquemática de três diferentes métodos de conjugação do peptídeo a sonda *Molecular Beacon* para permitir a entrada da sonda na célula. **a)** Ligação estreptoavidina-biotina; **b)** Ligação grupo tiol e maleimida; **c)** Clivagem de ponte dissulfídica.



Fonte: adaptado de Nitin Nitin et al. 2004.

### 2.5 Estimativa dos tempos e parâmetros da inativação viral pela ação da temperatura

Para a análise da influência da temperatura na inativação viral, é necessária a avaliação do número de partículas virais que perderam a capacidade de se replicar, ou seja, perderam sua infecciosidade. Esta avaliação é realizada utilizando normalmente ensaios em cultura celular.

A partir de uma quantidade conhecida do vírus a ser avaliado, pode-se ao longo do período de análise, avaliar o decaimento na concentração dos vírus viáveis presentes no início da avaliação.

Os trabalhos pioneiros na avaliação da inativação viral pela ação da temperatura, costumam expressar os valores de decaimento viral em valores de decaimento logarítmico utilizando a equação  $[\log_{10}(Nt/N0)]$ , sendo  $Nt$  a concentração viral em determinado tempo ( $t$ ) de análise e  $N0$  a concentração viral inicial. Este tipo de análise fornece dados acerca do decaimento viral em relação ao tempo de análise, sendo

expressos (quando há decaimento) em valores de  $\log_{10}$  negativos, por exemplo,  $-3,0 \log_{10}$ , significa que em determinadas condições (tempo e tratamento), determinado vírus apresentou 3  $\log_{10}$  de redução (99,9%).

Mais recentemente, os trabalhos avaliando a estabilidade de vírus entéricos em amostras ambientais, vêm utilizando modelos matemáticos para prever o comportamento viral em determinada situação/tratamento (DE RODA HUSMAN et al. 2009; BERTRAND et al. 2012; TULADHAR et al. 2012; CARRATALÀ et al. 2013a).

A partir dos valores de redução logarítmica, como citado acima, pode-se analisar os dados de acordo com o padrão de redução apresentado.

Em um padrão de redução mais simplista, onde a inativação viral ocorre a uma taxa constante- linear (também chamado de modelo monofásico), em relação ao tempo, é possível realizar uma regressão linear e com isso obter os valores de  $T_{90}$ ,  $T_{99}$ ,  $T_{99,9}$  e  $T_{99,99}$ , que são respectivamente, os tempos necessários para o decaimento de 1, 2, 3 e 4  $\log_{10}$ . Alguns trabalhos trazem esta nomenclatura um pouco diferente, sendo TFL (*time to first log value*) (BERTRAND et al. 2012; TULADHAR et al. 2012).

O modelo bifásico, descrito por De Roda Husman et al. (2009) pode ser aplicado se o decaimento não ocorrer de forma linear ou se as amostras forem avaliadas em diferentes condições experimentais, sendo que cada fração das amostras se comporte de forma diferente, com taxas de decaimento diferentes para cada tempo.

Alternativamente, se os valores obtidos para as taxas de decaimento não forem constantes, porém for observado um decaimento ao longo do período experimental, então se pode aplicar o modelo de Weibull (VAN BOEKEL 2002; TULADHAR et al. 2012).

Os modelos mais elaborados (bifásico ou Weibull) permitem uma melhor avaliação e visualização em caso de inativação viral aparente, devido ao fenômeno de adesão-agregação citado anteriormente, pois normalmente a curva de decaimento mostra-se de forma inicialmente linear e ao longo do tempo deixa de apresentar linearidade.

### 3 Objetivos

#### 3.1 *Objetivo Geral*

Avaliar a estabilidade térmica e temporal em águas de superfície e de consumo dos seguintes patógenos entéricos virais: adenovírus humano (HAdV), rotavírus humano (RV), cepa vacinal e norovírus murino (MNV-1).

### 4 Estrutura organizacional da tese

Os objetivos específicos da presente tese foram organizados em capítulos, com suas respectivas metodologias, resultados e discussão, objetivando uma melhor compreensão das etapas realizadas.

**-Capítulo I:** Otimização das metodologias e avaliação dos limites de detecção das técnicas baseadas em cultura celular para a avaliação da estabilidade de adenovírus humano.

**-Capítulo II:** Avaliação da estabilidade térmica e temporal do adenovírus humano e norovírus murino em água de superfície.

**-Capítulo III:** Avaliação da estabilidade térmica do rotavírus humano cepa vacinal (RotaTeq) em diferentes amostras de água de superfície.

**-Capítulo IV:** Desenho e padronização de sonda tipo *Molecular Beacon* para a detecção de adenovírus humanos infecciosos (doutorado sanduíche no exterior).

## Capítulo I

### Otimização das metodologias e avaliação dos limites de detecção das técnicas baseadas em cultura celular para a avaliação da estabilidade de adenovírus humano

#### 1 Objetivo geral

Otimização e determinação dos limites de detecção de técnicas baseadas em cultivo celular *in vitro* na avaliação da infecciosidade do HAdV2.

#### 1.1 Objetivos específicos

- Produzir e titular as suspensões estoques do adenovírus humano tipo 2 (HAdV2);
- Avaliar a influência da composição de diferentes águas de superfície na detecção de HAdV2;
- Determinar os limites de detecção das técnicas utilizadas na avaliação da infecciosidade do HAdV2: ensaio de formação de placa de lise (PL), citometria de fluxo (CF) e cultura celular integrada a RT-PCR em tempo real e precedida por tratamento enzimático (ICC-et-RT-qPCR);

#### 2 Materiais e métodos

##### 2.1 Produção e titulação dos estoques virais de HAdV2

Para a produção do estoque viral de adenovírus utilizado no trabalho foram utilizadas células da linhagem A549 (células epiteliais derivadas de carcinoma de pulmão humano) permissivas à infecção *in vitro* pelo adenovírus humano tipo 2.

O crescimento e manutenção das células foram realizados em garrafas de cultura celular utilizando como meio de crescimento DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (Gibco-BRL, Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) contendo alta concentração de glicose (4,500 mg L<sup>-1</sup> D-glicose), suplementado com 5% de soro fetal bovino [(SFB) (Gibco)] e 1% de antibióticos e antifúngico [PSA (penicilina G 100 U mL<sup>-1</sup>; sulfato de estreptomicina 100 µg mL<sup>-1</sup>; anfotericina B 0,25 µg mL<sup>-1</sup>) (Cultilab)]. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

A produção do estoque do fluido viral de HAdV2 foi possível pela infecção *in vitro* de uma monocamada confluyente de células A549 cultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> pela adição de 1 mL do fluido viral original (estocado a -80 °C). A infecção viral foi monitorada em microscópio óptico invertido (Olympus IT75). A partir da visualização dos efeitos citopáticos (ECP), que são as mudanças morfológicas ocorridas nas células devido à infecção viral e lise celular, em cerca de 80% da monocamada celular, as garrafas foram congeladas (-80 °C) e descongeladas três vezes para a liberação dos vírus intracelulares. O fluido viral foi centrifugado (350 ×g, 5 min) para remoção dos restos celulares, aliquotado e congelado (-80 °C).

A determinação do título infeccioso do estoque de HAdV2 produzido foi realizada por meio do ensaio de formação de placa de lise, de acordo com Cromeans et al. (2008), e descrita em maiores detalhes no item 2.2.1 deste capítulo. Os valores obtidos foram expressos em Unidades Formadoras de Placas por mL (UFP mL<sup>-1</sup>).

O título do HAdV2 produzido na presente etapa do trabalho foi de 2,0 x 10<sup>7</sup> UFP mL<sup>-1</sup>.

## ***2.2 Avaliação da influência da composição da água de superfície na detecção de adenovírus humano tipo 2***

Como já citado, a complexidade dos tipos de amostras de água a serem analisados podem influenciar negativamente na detecção de vírus entéricos viáveis, dependendo do tipo de método empregado (BERTRAND et al. 2012). Visando a avaliação desta influência foram escolhidos dois diferentes tipos de amostras de água: água de superfície (manancial Lagoa do Peri), sendo esta considerada uma matriz complexa; água de consumo (bebedouro), sendo esta uma matriz menos complexa e uma matriz laboratorial (neutra) consistindo de solução salina PBS (pH 7,5). A influência da composição destas matrizes na detecção de adenovírus infecciosos foi realizada por dois métodos: formação de placa de lise (PL) e citometria de fluxo (CF).

O local de coleta da água de superfície foi na Lagoa do Peri (principal manancial de água doce no sul da Ilha de Santa Catarina e coletada para tratamento e distribuída pela companhia de abastecimento CASAN – Companhia Catarinense de Águas e Saneamento). A água de consumo consistiu de água do bebedouro, coletada no corredor do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Vale ressaltar que a água de superfície não possuía nenhum tratamento, sendo coletada na forma



bruta e que a água de consumo, esta sim clorada, foi previamente tratada com  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) para a inativação do cloro.

A avaliação da influência da composição das matrizes aquáticas na detecção de adenovírus infecciosos foi realizada a partir da adição de 1 mL do fluido viral de HAdV2 em 9 mL de cada uma das matrizes selecionadas [PBS, água de superfície (Lagoa do Peri) e água de consumo]. Em seguida, diluições não citotóxicas na base 10 ( $10^{-1}$  até  $10^{-9}$ ) foram utilizadas para os ensaios de formação de placas de lise (PL) e citometria de fluxo (CF), descritos nos itens abaixo.

### ***2.2.1 Ensaio de formação de placa de lise (PL)***

O ensaio de formação de placa de lise para avaliar a presença de HAdV2 infecciosos foi realizado de acordo com o descrito por Cromeans et al. (2008) com algumas modificações. Células A549 foram semeadas na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  em placas de seis cavidades e após atingirem confluência (24 h) foram infectadas (250  $\mu\text{L}$  por cavidade) com as diluições (em meio MEM) das matrizes de água ou PBS, em triplicata, e incubadas por 1 h  $37^\circ\text{C}$  para a adsorção viral. Em seguida, o inóculo foi removido e a monocamada celular foi recoberta com uma camada contendo 0,6% de Bacto Ágar (LGC Biotecnologia) diluída em meio DMEM com alta concentração de glicose  $2\times$  concentrado, suplementado com 2% de SFB, 0.1 mM piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), 1% de antibióticos e antifúngico [PSA (penicilina G  $100 \text{ U mL}^{-1}$ ; sulfato de estreptomicina  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; anfotericina B  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Cultilab)] e 26 mM de  $\text{MgCl}_2$ . As amostras foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  pelo período de 6-7 dias. Durante esse período as placas foram monitoradas diariamente em microscópio óptico invertido para a avaliação da formação das placas de lise. Após este período, a camada de bacto ágar foi removida e as monocamadas celulares foram coradas com cristal violeta (0,4%). As placas formadas foram contadas macroscopicamente sendo os valores de HAdV2 infecciosos expressos em Unidades Formadoras de Placas por mL (UFP  $\text{mL}^{-1}$ ), utilizando a fórmula abaixo:

$$UFP = \frac{\text{Médian}^\circ \text{ placas} \times \text{reciproca da diluição}}{\text{inóculo inicial semeado da amostra}(0,25 \text{ mL})}$$

### 2.2.2 Citometria de fluxo (CF)

A detecção de HAdV2 infecciosos por citometria de fluxo foi realizada de acordo com o descrito por Barardi et al. (1998) e Corrêa et al. (2012b) com algumas modificações. Células A549 foram semeadas em placas de 24 cavidades na concentração de  $2,0 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  e após atingirem confluência (24 h) foram inoculadas com as matrizes aquáticas e/ou a matriz neutra (PBS) utilizando as mesmas diluições citadas no item acima. Seguiu-se um período de incubação a  $37^\circ \text{C}$  por 1 h para que a adsorção viral ocorresse e após este período, o inóculo foi removido e adicionou-se às células meio de manutenção (MEM 1 $\times$ , 2% SFB e 1% de PSA), seguido de incubação por 48 h (tempo já determinado em trabalhos anteriores). Em seguida, o meio de manutenção foi removido e as células foram coletadas pela adição de 150  $\mu\text{L}$  de solução de tripsina ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). As células tripsinizadas foram ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de solução de bloqueio-SB (PBS 1 $\times$ , 1% soroalbumina bovina-BSA, 0,05% de Tween-20 e  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$  de EDTA) e fixadas com 800  $\mu\text{L}$  de metanol puro gelado por 5 min. Em seguida, as células foram centrifugadas ( $350 \times g$ , 4 min) para descarte do sobrenadante e novamente ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de solução de bloqueio, seguido de incubação por 30 min a temperatura ambiente (T.A.) para bloqueio de possíveis ligações inespecíficas durante a incubação com o anticorpo.

As células foram incubadas com 100  $\mu\text{L}$  de anticorpo monoclonal (MAb8052 Nihon Millipore™, Tóquio, Japão) diluído 1:400 em SB por 1 h,  $37^\circ \text{C}$  sob agitação. Seguiu-se com três lavagens sucessivas com 300  $\mu\text{L}$  de solução bloqueadora por 5 min sob agitação para remoção do excesso de anticorpo não ligado ao epítipo de interesse seguido de incubação por 15 min em T.A., sob o abrigo da luz e sob agitação com anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) diluído 1:100 em SB.

A detecção de células fluorescentes (infectadas com HAdV2) foi verificada e analisada em citômetro de fluxo BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) (10.000 eventos por

amostra) e os resultados foram expressos em *Green Fluorescent Units* por mL (GFU mL<sup>-1</sup>) de acordo com o descrito por Gueret et al. (2002) e utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{GFU} = \frac{\% \text{ células infectadas} \times n^{\circ} \text{ total de células} \times \text{diluição}}{100 \times \text{volume inóculo (0,5 mL)}}$$

### **2.3 Limite de detecção de HAdV2 infecciosos em água de superfície**

A determinação do limite de detecção das técnicas utilizadas para a avaliação de adenovírus infecciosos foi realizada utilizando como matriz selecionada a água de superfície da Lagoa do Peri, devido à importância deste manancial de água doce. Foram empregados três diferentes métodos de cultura celular: ensaio de formação de placa de lise (PL), citometria de fluxo (CF), descritos nos itens acima, e cultura celular integrada a RT-PCR em tempo real precedida por tratamento enzimático (ICC-et-RT-qPCR) visando a comparação dos limites de detecção de HAdV2 infecciosos pelas diferentes técnicas.

Previamente a realização dos ensaios, HAdV2 na concentração de  $2,8 \times 10^8$  UFP mL<sup>-1</sup> foi semeado em 10 mL da água de superfície da Lagoa do Peri e então diluições não citotóxicas na base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) foram usadas para a avaliação do limite de detecção das técnicas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **2.3.1 Cultura celular integrada a RT-PCR em tempo real (ICC-et-RT-qPCR)**

O objetivo desta metodologia baseia-se na amplificação do RNA de vírus infecciosos, permitindo desta forma a quantificação de genomas de HAdV2 viáveis, ou seja, que tiveram a capacidade de se replicar. O protocolo empregado foi baseado em trabalhos já descritos, realizando-se algumas modificações (KO et al. 2005b; FONGARO et al. 2013).

Resumidamente, células A549 foram semeadas em placas de 24 cavidades na concentração de  $2,0 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> e incubadas (24 h) a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> para a obtenção de uma monocamada confluenta. Em seguida, as células foram infectadas (250 µL por cavidade) em duplicata, com as amostras de água semeadas com

HAdV2 diluídas em MEM e incubadas a 37 °C por 1 h para a adsorção viral. Após este período, o inóculo foi removido e a monocamada celular foi lavada duas vezes com PBS 1×, para remoção dos vírus não viáveis e que não adsorveram nas células, seguido da adição de meio de manutenção sem SFB. As células foram incubadas durante 24 h (período definido de acordo com o ciclo de replicação do adenovírus e sem o aparecimento de ECP). Após este período, o sobrenadante foi removido e a monocamada celular foi lavada novamente com PBS 1×. A extração do RNA foi realizada diretamente da monocamada celular utilizando kit comercial RNeasy-MinElute Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

Para eliminar uma possível contaminação com DNA presente na amostra e advindo de vírus não viáveis, o RNA foi tratado com 2 U da enzima DNase I (Sigma-Aldrich) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, previamente à reação de qPCR para o HAdV2, foi realizada uma reação de transcrição reversa (RT), utilizando-se iniciadores randômicos para a síntese do DNA complementar (cDNA). Partindo-se de 5 µL do RNA purificado, em uma reação de volume final de 25 µL, o RNA foi primeiramente desnaturado a 97 °C por 5 min, resfriado por 2 min em gelo e adicionado à mistura da reação contendo 20 pmoL de iniciadores randômicos (Promega), 100 U µL<sup>-1</sup> da enzima transcriptase reversa (MMLV-Promega), 20 U de inibidor de RNase (RNasin-Promega), em condições salinas adequadas e incubação a 37 °C por 60 min em termociclador.

A quantificação do genoma de HAdV2 infecciosos foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Hernroth et al. (2002), utilizando uma reação de 25 µL de volume final, sendo este constituído por 12,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2× concentrada (Applied Biosystems), mistura essa que contém os reativos necessários para a reação de PCR, como a enzima Taq DNA Polimerase, oligonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) além das condições salinas adequadas. O volume final foi completado pela adição dos iniciadores específicos ADF e ADR na concentração final de 0,9 µM e da sonda do tipo hidrólise ADP1 (TaqMan - Applied Biosystems) na concentração final de 0,225 µM.

Os ensaios foram realizados em duplicata em placa de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems), contendo além das amostras de cDNA tratadas previamente com DNase I, as amostras do RNA extraído tratadas com DNase I porém sem a reação de transcrição reversa e as amostras de RNA extraídas e não tratadas, que podiam

apresentar contaminação por DNA. A cada reação foram também adicionados controles negativos, consistindo apenas dos reagentes sem a adição de ácidos nucleicos provenientes das amostras. Todas as reações de qPCR foram preparadas em sala livre de DNA e em outra sala foram adicionadas as amostras de cDNA ou RNA (10  $\mu$ L), totalizando o volume final de reação (25  $\mu$ L).

Em outro ambiente, destinado à manipulação com plasmídeos, foram adicionados às cavidades previamente estipuladas, onde não haviam sido adicionadas amostras de cDNA, 10  $\mu$ L dos DNAs padrões (*standards*) sintetizados a partir do HAdV41 (gene *hexon* do capsídeo viral) clonados em plasmídeo pBR322 (gentilmente cedido pela Dra. Rosina Gironès, da Universidade de Barcelona, Espanha) e foram usados como controles de amplificação para gerar uma curva padrão.

Em seguida, a placa foi devidamente selada com filme óptico (Applied Biosystems) e inserida no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O perfil de temperaturas utilizado no qPCR foi de 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C para a ativação e inativação respectivamente da enzima Uracil N Glicosilase (UNG) que serviu para inativar amplicons contaminantes provenientes de reações anteriores, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, e anelamento dos iniciadores e sonda, e extensão ambos a 60 °C por 1 min. As sequências dos iniciadores e sonda utilizados na reação de qPCR para o HAdV são apresentados no Quadro 3.

Os valores obtidos foram expressos em cópias genômicas por mL (CG mL<sup>-1</sup>) de adenovírus infecciosos.

**Quadro 3** - Sequência de iniciadores e sonda utilizados na reação de qPCR para HAdV

Iniciadores e sonda	Sequência 5'-3'	Referência
ADF	CWTACATGCACATCKCSGG	Hemroth, et al., 2002
ADR	CRCGGGCRAAYTGCACCAG	
Sonda ADP1	FAM- CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCC T-TAMRA	



### 3. Resultados

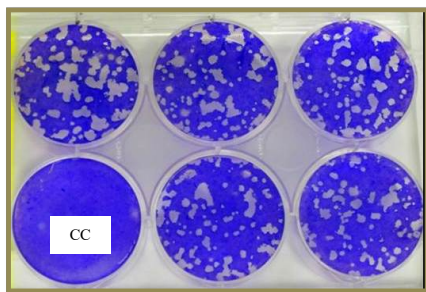
#### *3.1 Avaliação da influência da composição da matriz aquática na detecção de adenovírus infecciosos*

A Figura 7 ilustra o resultado obtido pela técnica de PL, por meio da infecção de células A549 com o adenovírus tipo 2. Nesta figura é possível observar as placas formadas (halos incolores), locais onde houve lise celular devido à replicação viral.

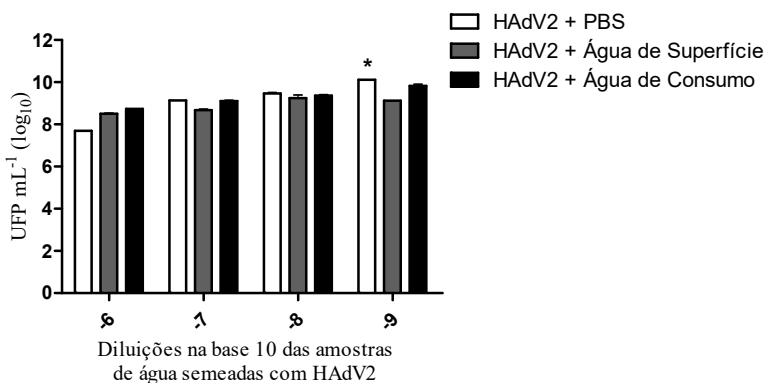
A Figura 8 apresenta os resultados obtidos na avaliação da influência da composição das matrizes aquáticas em comparação com a matriz neutra (PBS) na detecção de HAdV2 infecciosos pela técnica de PL. Foram utilizadas diluições na base 10, iniciando na diluição  $10^{-1}$  até  $10^{-9}$ . As diluições iniciais (maior concentração viral) não foram contabilizadas, visto que nestas diluições não foi possível visualizar a formação de placas de lise, devido à lise total da monocamada celular pela replicação viral (infecção célula-célula). Deste modo, os resultados obtidos referem-se às diluições  $10^{-6}$  até  $10^{-9}$ .

Os valores foram expressos em UFP  $\text{mL}^{-1}$  com a respectiva correção da diluição, utilizando a fórmula citada no item 2.2.1. Pode-se concluir que a composição da matriz, quando comparamos água de superfície, com água de consumo (bebedouro) e PBS, não interferiu significativamente na detecção de adenovírus infecciosos ( $p > 0,05$ ), com exceção dos valores obtidos na maior diluição utilizada,  $10^{-9}$ , onde os valores obtidos na amostra neutra PBS foram estatisticamente diferentes dos obtidos para as outras duas matrizes, água de superfície e água de consumo ( $p < 0,001$ ). Os valores obtidos na detecção de adenovírus infecciosos por placa de lise variaram entre  $3,25 \times 10^8$  a  $1,30 \times 10^{10}$  UFP  $\text{mL}^{-1}$ .

**Figura 7** - Imagem das placas de lise obtidas pelo ensaio de formação de placa de lise (PL) pela infecção de células A549 pelo adenovírus tipo 2. CC: controle celular



**Figura 8** - Detecção de HAdV2 infecciosos em amostras de água de superfície (Lagoa do Peri), água de consumo e em PBS utilizando a técnica de formação de placa de lise (PL).



\*  $p < 0,001$

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos para a avaliação da infecciosidade do HAdV2 nas matrizes aquáticas e em PBS utilizando como técnica a citometria de fluxo. As diluições analisadas compreendem os valores entre  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$ . A quantificação das células fluorescentes (infectadas) foi realizada utilizando o *software* livre *Flowing*<sup>®</sup>, e os valores finais foram expressos em *Green Fluorescent Units* (GFU mL<sup>-1</sup>) utilizando a fórmula citada do item 2.2.2.

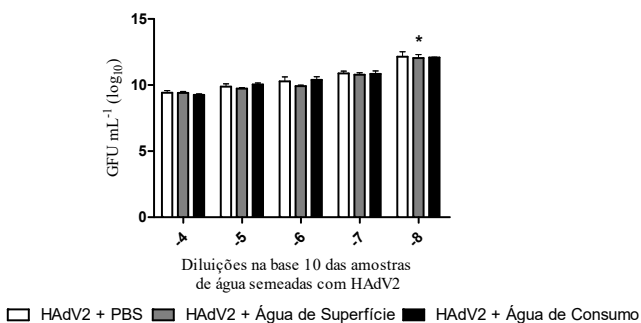
Os resultados demonstram que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) quando se comparou os valores obtidos na detecção de



HAdV2 infecciosos nas diferentes matrizes aquáticas e o PBS, sendo que os valores de detecção variaram entre  $1,49 \times 10^9$  a  $3,60 \times 10^{12}$  GFU mL<sup>-1</sup>.

Quando se comparou a diferença entre os valores obtidos nas diferentes matrizes em relação às diluições utilizadas, os resultados de detecção de adenovírus infecciosos por CF foram diferentes estatisticamente ( $p = 0,0004$ ) demonstrando que a diluição (concentração viral) influenciou na detecção.

**Figura 9** - Detecção de HAdV2 infecciosos em amostras de água de superfície (Lagoa do Peri), água de consumo e em PBS utilizando a técnica de citometria de fluxo (CF).



\* p = 0,004

A Tabela 1 apresenta as médias gerais para os valores obtidos na titulação dos HAdV2 nas diferentes matrizes. Apesar de os valores apresentados na titulação do vírus por PL nas amostras de água de superfície e água de consumo terem sido inferiores aos detectados em PBS, esta diferença não foi significativa ( $p = 0,3690$ ). Assim como a diferença entre as médias gerais detectadas comparando-se as diferentes técnicas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1** - Comparação entre as médias gerais nos valores obtidos para a titulação do HAdV2 nos diferentes tipos de matrizes utilizadas pelas técnicas de placa de lise e citometria de fluxo.

<b>Método</b>	<b>PBS</b>	<b>Água superfície</b>	<b>Água consumo</b>
Placa de lise (UFP mL <sup>-1</sup> )	1,45 x 10 <sup>10</sup> (1,39 x 10 <sup>10</sup> )*	9,56 x 10 <sup>8</sup> (6,61 x 10 <sup>8</sup> )	2,69 x 10 <sup>9</sup> (2,75 x 10 <sup>9</sup> )
Citometria de fluxo (GFU mL <sup>-1</sup> )	3,0 x 10 <sup>11</sup> (9,19 x 10 <sup>11</sup> )	2,36 x 10 <sup>11</sup> (5,68 x 10 <sup>11</sup> )	2,03 x 10 <sup>11</sup> (4,41 x 10 <sup>11</sup> )

\* desvio padrão

A partir da determinação da não interferência significativa da composição da matriz na detecção de HAdV2 infecciosos, optou-se por avaliar o limite de detecção das técnicas frente a um único tipo de água de superfície, focando desta forma o trabalho na detecção de adenovírus infecciosos por diferentes metodologias.

### **3.2 Avaliação do limite de detecção em amostras de água da Lagoa do Peri**

Devido a necessidade em se desenvolver métodos que avaliassem a infecciosidade viral e a aplicação destes em estudos de estabilidade viral em matrizes aquáticas, optou-se por direcionar o trabalho avaliando a estabilidade do HAdV2 em amostras de água de superfície (Lagoa do Peri), já que este é um importante manancial de água potável para o município de Florianópolis.

Neste caso, além dos métodos de detecção já mencionados acima, a metodologia de ICC-et-RT-qPCR (previamente padronizada no laboratório) foi acrescentada, visando à avaliação da estabilidade viral em água de superfície por diferentes métodos, baseado em cultura celular.

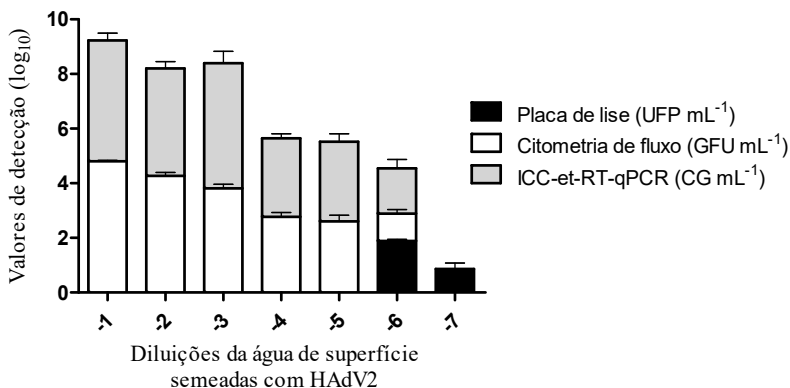
A Figura 10 mostra os resultados obtidos para os valores de limite de detecção utilizando três diferentes métodos de cultura celular na detecção de HAdV2 infecciosos: placa de lise (PL), citometria de fluxo (CF) e ICC-et-RT-qPCR.

Os resultados obtidos nestes experimentos não foram corrigidos em relação às diluições utilizadas, sendo apresentados os valores absolutos detectados nas diferentes diluições. Nota-se que, dentre as

diluições elegidas, foi necessária a adição de uma diluição extra ( $10^{-7}$ ) para a realização dos experimentos de placa de lise, visto que nas diluições mais baixas não foi possível a contagem do número de placas devido à total destruição da monocamada celular pela infecção viral e lise celular.

Quando se comparam os valores obtidos em cada método utilizado analisando a mesma diluição ( $10^{-6}$ ), têm-se os valores médios de detecção de  $7,73 \times 10^1$  (UFP  $\text{mL}^{-1}$ ),  $3,45 \times 10^4$  (CG  $\text{mL}^{-1}$ ) e  $6,93 \times 10^2$  (GFU  $\text{mL}^{-1}$ ), respectivamente para placa de lise, ICC-et-RT-qPCR e CF.

**Figura 10** - Limite de detecção de HAdV2 infecciosos em amostras de água de superfície (Lagoa do Peri) utilizando diferentes metodologias baseadas em cultura celular: placa de lise, citometria de fluxo e ICC-et-RT-qPCR.



Quando se avaliou a correlação entre os resultados obtidos pelas diferentes técnicas, (Correlação de Pearson), obteve-se uma forte correlação entre os resultados obtidos nos ensaios de CF e ICC-et-RT-qPCR ( $r = 0,977$  e  $p = 0,0008$ ), levando-se em consideração as diferenças nos limites de detecção. Os resultados entre as duas técnicas mostraram uma diferença média de detecção de  $3\log_{10}$ .

#### 4 Discussão

A complexidade da matriz aquática pode interferir negativamente na detecção de vírus entéricos independentemente do uso de métodos de cultura celular ou métodos moleculares. Diferentes tipos de amostras de águas do ambiente podem apresentar

concentrações variadas de componentes tóxicos, como ácidos húmicos e fúlvicos e metais tóxicos, que são os principais inibidores de reações moleculares e também compostos que apresentam elevados graus de toxicidade às células (JIANG 2006; BERTRAND et al. 2012).

O monitoramento da contaminação do ambiente aquático por vírus entéricos segue basicamente dois passos: concentração e detecção. A concentração da amostra a ser analisada é um passo imprescindível, visto que os vírus estão dispersos no meio ambiente aquático e estão presentes, na maioria das vezes, em baixas concentrações, sendo necessária desta forma a concentração viral em um volume final menor da amostra, permitindo a detecção do vírus (JIANG 2006; HAMZA et al. 2011). Este processo de concentração, além de concentrar os vírus, acaba por concentrar muitas substâncias tóxicas presentes na matriz, contribuindo negativamente tanto na detecção molecular (inibição das reações de PCR, por exemplo), como na elevada toxicidade das amostras quando utilizadas em cultura de células, levando a resultados falso positivos ou falso negativos (JULIAN, SCHWAB 2012).

No presente estudo, vale ressaltar que o passo de concentração viral não foi realizado, devido ao fato de que uma grande quantidade de HAdV2 foi artificialmente semeada nas amostras de água. Os valores adotados no uso das diferentes diluições não citotóxicas foram baseados em trabalhos anteriores que utilizaram os mesmos tipos de amostras de água, que mostraram baixa citotoxicidade mesmo após os procedimentos de concentração (RIGOTTO et al. 2010; FONGARO et al. 2012).

Os resultados obtidos na detecção de HAdV2 infecciosos pelos dois métodos mostraram que não houve influência significativa da composição da matriz aquática na detecção dos vírus. Um dos fatores que pode justificar este resultado é o fato de que, devido às amostras não terem passado pelo processo de concentração, a toxicidade foi considerada nula, uma vez que os valores detectados tanto por placa de lise quando por citometria de fluxo nas águas não foram significativamente diferentes daqueles encontrados no PBS.

O ensaio de formação de placa de lise é considerado o método padrão “ouro” na avaliação da infecciosidade de muitos tipos de vírus entéricos, porém há desvantagens quando se utiliza este método na avaliação da presença de vírus em amostras de água, devido ao fato de que nem todos os vírus presentes no ambiente são adaptados ao cultivo celular e, se adaptados, muitas vezes não possuem a capacidade de formar placas (TEUNIS et al. 2005; JIANG 2006). Entretanto, em

estudos de avaliação da estabilidade viral é uma boa escolha visto que amostras avaliadas são semeadas com um vírus adaptado à cultura celular e com capacidade de formar placa de lise.

Em relação a citometria de fluxo, seu emprego na virologia ambiental é ainda muito limitado, os poucos trabalhos citados na literatura envolvem a detecção de vírus em amostras clínicas ou amostras semeadas com vírus (ABAD et al. 1998; BARARDI et al. 1998). Alguns fatores podem interferir na eficiência da detecção viral por CF, como especificidade do anticorpo, tempo de incubação das amostras em cultura celular, concentração viral na amostra. No presente trabalho, o anticorpo utilizado é dirigido contra a proteína *hexon* do capsídeo do adenovírus, proteína altamente conservada em todos os sorotipos descritos e que já se mostrou sensível na detecção de adenovírus viáveis utilizando como técnica a imunofluorescência indireta (CORRÊA et al. 2007; CALGUA et al. 2011).

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o número de adenovírus infecciosos detectados por CF e as diluições utilizadas, demonstrando que a razão vírus/célula é importante e pode interferir na replicação e detecção viral (GUERET et al. 2002).

Quando analisados de forma conjunta, os dois métodos mostraram diferenças nos valores de detecção quando se comparam as mesmas diluições analisadas. Isto se deve às características de cada método, enquanto a placa de lise requer de 6 a 7 dias para que todos os processos que envolvem infecção, replicação, lise celular, seguido pela infecção célula-célula (*cell to cell spread*) ocorram, a citometria de fluxo requer dois dias de infecção, pois não depende da finalização do ciclo lítico do adenovírus (HITT et al. 2000).

Em relação aos limites de detecção avaliados para os três diferentes métodos de cultura celular, vale destacar que poucos trabalhos avaliando a contaminação viral em diversos tipos de amostras (água, alimentos, fômites) discutem a respeito do limite de detecção das técnicas utilizadas. Sem a discussão sobre os limites de detecção não se pode garantir que a ausência de contaminação na amostra represente ausência de risco de infecção. Esta limitação, presente em muitos trabalhos, dificulta a comparação entre diferentes métodos de detecção e a escolha do método adequado para cada propósito (JULIAN, SCHWAB 2012).

No presente trabalho, o método de formação de placa de lise apresentou o maior limite de sensibilidade, onde na diluição mais elevada, ou seja, com a menor concentração de vírus, foi possível a

detecção de  $7,3 \text{ UFP mL}^{-1}$ . A escolha desta metodologia para a avaliação de estabilidade térmica do adenovírus mostra-se promissora visto que permitirá o acompanhamento do decaimento viral ao longo do tempo e nas condições experimentais delineadas.

O ensaio de ICC-PCR e suas variações, já vem sendo utilizado há algum tempo como uma alternativa promissora quando comparada a outras técnicas clássicas de cultura celular (placa de lise, TCID<sub>50</sub>, MNP) ou técnicas moleculares, como reação em cadeia da polimerase (PCR, RT-PCR, qPCR) (KO et al. 2003; REYNOLDS 2004; KO et al. 2005a; RIGOTTO et al. 2005; LI et al. 2009). Dentre as vantagens, permite a detecção de vírus viáveis fastidiosos e/ou que não apresentam efeito citopático, aumentando a sensibilidade dos ensaios moleculares, evitando resultados falsos negativos devido à diminuição da presença de inibidores das reações enzimáticas (HAMZA et al. 2011).

O emprego do ICC-et-RT-qPCR permitiu a detecção de adenovírus viáveis ( $3,45 \times 10^4 \text{ CG mL}^{-1}$ ) na maior diluição utilizada ( $10^{-6}$ ), mostrando diferentes limites de detecção em relação ao ensaio de placa de lise, que nesta mesma diluição detectou valores de  $7,73 \times 10^1 \text{ UFP mL}^{-1}$ . Fongaro et al. (2013) avaliando adenovírus humano em amostras de águas encontrou diferença média de  $3,4 \log_{10}$  de detecção entre as técnicas de PL e ICC-et-RT-qPCR. Estas diferenças entre os valores de detecção observados refletem às diferenças metodológicas, inerentes a cada método.

A maioria dos trabalhos que utilizam a técnica de ICC-PCR comparam os valores obtidos com os valores de cópias genômicas totais, assim pode-se comprovar que o valor obtido na quantificação do genoma viral em uma amostra, não reflete o número de partículas viáveis, além de ser uma técnica muito utilizada em estudos de inativação viral, pois permite a comparação entre a viabilidade viral de vírus tratado com diferentes agentes inativantes como cloro, luz U.V. e temperatura com vírus não tratados (REYNOLDS 2004; LI et al. 2009).

As vantagens do método utilizado vão desde o tratamento das amostras de RNA com DNase I assegurando que os genomas detectados refletem a amplificação somente do material genético advindo de partículas virais íntegras e viáveis; o tempo de incubação ser de apenas 24 h; e a extração do material genético ser realizada diretamente da monocamada celular. Outros trabalhos com variações de ICC-PCR que omitem essas etapas podem superestimar os valores de cópias genômicas pela presença de material genético advindo de vírus inativados, degradação de material genético durante o processo de

liberação do vírus intracelular pelo congelamento e descongelamento das células onde os vírus estavam se replicando, além de maior período de incubação.

Foi possível observar uma correlação entre os resultados obtidos para o limite de detecção das técnicas de CF ( $6,93 \times 10^2$  GFU mL<sup>-1</sup>) e de ICC-et-RT-qPCR, apresentando tempo de incubação menores quando comparados ao ensaio de placa de lise (24 h para o ICC-et-RT-qPCR e 48 h para a CF).

Apesar do limite de detecção ter sido diferente entre as técnicas avaliadas, optou-se por continuar utilizando-se as três técnicas na continuidade do presente trabalho (Capítulo II), onde a estabilidade térmica do adenovírus em amostras de água de superfície foi avaliada, a fim de que a comparação entre as sensibilidades dos métodos continuassem a ser exploradas.





## Capítulo II

### Avaliação da estabilidade térmica e temporal do adenovírus humano e norovírus murino em água de superfície

#### 1 Objetivo geral

Verificar o perfil de estabilidade térmica do adenovírus humano e norovírus murino em amostras de água de superfície (Lagoa do Peri).

#### 1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade térmica do adenovírus humano, usando como modelo o adenovírus humano tipo 2 (HAdV2) em amostras de água de superfície submetidas a diferentes temperaturas de estocagem e utilizando diferentes técnicas baseadas em cultura celular;
- Avaliar a estabilidade térmica do norovírus murino (MNV-1) como modelo viral do norovírus humano em diferentes temperaturas de estocagem e comparar a estabilidade infecciosa *versus* a estabilidade genômica;
- Determinar os valores de  $T_{90}$  (tempo estimado para o decaimento de  $1 \log_{10}$ ) do HAdV2 e MNV-1 por meio do modelo de regressão linear;

#### 2 Materiais e métodos

##### 2.1 Produção e titulação dos estoques virais de HAdV2 e MNV-1

Os estoques virais utilizados nas sementeiras das amostras de água previamente à estocagem foram obtidos pela infecção *in vitro* das células permissivas partindo dos estoques virais originais de HAdV2 e MNV-1.

A produção e titulação do HAdV2 foi realizada de acordo com o descrito no Capítulo I, respectivamente nos itens 2.1 e 2.2.1, sendo obtido o título viral para esta etapa do trabalho de  $6,8 \times 10^8$  UFP mL<sup>-1</sup>.

Para a produção do estoque viral do MNV-1, foram utilizados macrófagos da linhagem RAW 264.7 (*Mus musculus*) permissivos à infecção pelo norovírus murino.

O crescimento e manutenção dos macrófagos RAW 264.7 foi realizado em garrafas de cultura celular com tamanho de 75 cm<sup>2</sup> utilizando meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), suplementado com 10% SFB, L-glutamina 2 mM a 1%, HEPES 1 M, 1,5%, aminoácidos não essenciais (1×) (Sigma) e 1% de antibióticos e antifúngico [(PSA (penicilina G 100 U mL<sup>-1</sup>, sulfato de estreptomicina 100 µg mL<sup>-1</sup>, anfotericina B 0,25 µg mL<sup>-1</sup>) Cultilab]. Durante o cultivo as células foram mantidas em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a produção do estoque viral, após atingir confluência, uma monocamada de RAW 264.7 foi infectada com 1,0 mL do estoque original de MNV-1, seguido por incubação durante 1 h, a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para que ocorresse a adsorção viral. Em seguida, o inóculo viral foi removido e adicionou-se meio de manutenção (DMEM), que consistiu dos mesmos reagentes citados acima, diferenciando-se apenas pela adição de SFB na concentração final de 2%.

As células foram mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e observadas diariamente em microscópio óptico invertido (Olympus IT75) para a visualização da replicação viral, devido a observação do aparecimento de efeito citopático (ECP), evidenciando-se assim mudanças na morfologia das células, caracterizando os efeitos da replicação viral e tendo como controle negativo, culturas de células não infectadas. O tempo de replicação médio observado para a produção dos estoques de MNV-1 foi de 48 h.

Quando se observou uma destruição de 80% da monocamada celular, as células foram congeladas a -80 °C e descongeladas a 37 °C por três vezes, a fim de promover a lise de células ainda intactas pela infecção viral e liberar os vírus intracelulares. A suspensão foi transferida para um tubo de 50 mL de capacidade e centrifugada a 350×g por 20 minutos à 4 °C, para remoção dos restos celulares e então o fluido viral foi titulado, aliquotado e armazenado a -80 °C para posterior utilização nos ensaios estabilidade viral. O ensaio de formação de placa de lise utilizado para a titulação do fluido viral de MNV-1 produzido está descrito no item 2.4.1 abaixo.

## 2.2 Matriz aquática e desenho experimental

Como citado no capítulo anterior, a partir da verificação da ausência da interferência direta da matriz aquática proveniente da Lagoa do Peri (água de superfície) em relação aos métodos de detecção testados, esta foi selecionada como matriz para os estudos de estabilidade térmica do HAdV2 e do MNV-1.

A amostra de água de superfície proveniente da Lagoa do Peri foi coletada, transportada ao laboratório e mantida a 4 °C até o início dos ensaios de estabilidade viral. No momento da coleta, alguns parâmetros físico-químicos como, temperatura da amostra, pH, demanda de oxigênio, condutividade e salinidade foram coletados utilizando sonda multiparâmetros YSI-85 (gentilmente cedida pelo Prof. Maurício Petrúcio do Laboratório de Águas Continentais, Depto ECZ/UFSC) e no laboratório de Virologia Aplicada foi avaliada a presença de coliformes totais e/ou *E. coli* utilizando kit comercial Aquatest M (Laborclin, Brasil) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Parâmetros físico-químicos e presença de coliformes totais e *E. coli* em amostra de água de superfície, coletada na Lagoa do Peri, Florianópolis.

Parâmetros avaliados	
Temperatura (°C)	25
pH	6,09
Demanda de O <sub>2</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )	7,0 (83%)
Condutividade (µS cm <sup>-1</sup> )	2,5
Salinidade (ppt)	0
Coliformes totais e <i>E. coli</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )	>8,0

**Legenda:** µS (micro Siemens); ppt (partes por trilhão); NMP (número mais provável)

A escolha dos modelos de vírus entéricos baseou-se no fato de que, apesar destes compartilharem algumas características, diferem em outras, como na constituição genômica, sendo DNA dupla fita para o HAdV2 e RNA simples fita senso positivo para MNV-1, tamanho, estratégia de replicação, HAdV (nuclear), MNV-1 (citoplasmática), entre outras, sendo o MNV-1 o modelo viral mais utilizado como substituto dos norovírus humanos, estes não adaptados ao cultivo celular (WOBUS et al. 2006).

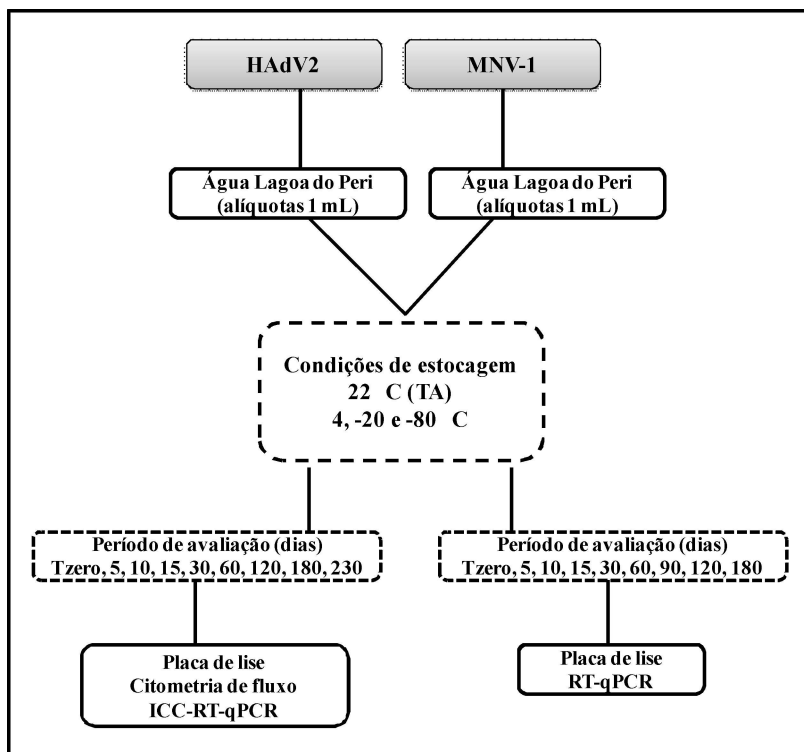
De acordo com o título dos estoques virais produzidos, realizou-se a semeadura de uma quantidade conhecida dos mesmos em um volume de amostra de água de superfície que permitisse a realização

dos ensaios de estabilidade viral e o acompanhamento do decaimento logarítmico em relação à perda da infecciosidade ou estabilidade pela ação da temperatura. Após a semeadura dos vírus nas amostras de água, foram realizadas alíquotas em tubos de 1 mL (polipropileno) e as mesmas foram acondicionadas em diferentes temperaturas de estocagem: temperatura ambiente (TA) 22, 4, -20 e -80 °C sob o abrigo da luz. A escolha das temperaturas foi baseada na quase inexistência de trabalhos que avaliem a estabilidade viral em amostras ambientais estocadas em condições laboratoriais, previamente às análises, ou seja, 4, -20 e -80 °C. Já a estocagem na temperatura de 22 °C procurou mimetizar a temperatura média ambiental. Segundo dados obtidos do CIRAM/EPAGRI (Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina) a média da temperatura anual (2013) foi de 21,38 °C, dados coletados em uma estação meteorológica próxima da Lagoa do Peri.

Uma alíquota de água foi retirada imediatamente após a semeadura viral (tempo zero) para se conhecer a quantidade real de vírus inoculado nas amostras e as demais análises foram realizadas nos tempos de 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 e 230 dias para o HAdV2 e 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 para o MNV-1. A escolha de um tempo de análise a mais para a avaliação da estabilidade do HAdV2 (230 dias) foi realizada em função da já descrita elevada estabilidade deste vírus em matrizes ambientais.

A Figura 11 resume o desenho experimental utilizado nos ensaios para o estudo da estabilidade térmica destes dois vírus em amostras de água de superfície.

**Figura 11** - Desenho experimental dos ensaios de estabilidade viral realizado em amostras de água de superfície



Para o HAdV2 foram elegidas somente técnicas baseadas na avaliação da infecciosidade viral, ou seja, técnicas associadas a cultura celular: placa de lise, citometria de fluxo e ICC-et-RT-qPCR, realizadas em triplicata. Já para o MNV-1, foi escolhida uma técnica que avaliasse a infecciosidade por cultura celular (placa de lise) e um método que avaliasse somente a estabilidade genômica (RT-qPCR), sendo os experimentos realizados em duplicata.

### **2.3 Ensaios de estabilidade para o HAdV2**

A avaliação da estabilidade térmica nas amostras semeadas com HAdV2 foi realizada por diferentes ensaios envolvendo cultura celular e já descritos em maiores detalhes no Capítulo I desta tese,

sendo eles: placa de lise (item 2.2.1); citometria de fluxo (item 2.2.2) e ICC-et-RT-qPCR (item 2.3.1).

Vale ressaltar que para cada método utilizado, as amostras estocadas em diferentes temperaturas e ao longo do período de análise, foram utilizadas em diferentes diluições, de acordo com os limites de detecção avaliados no Capítulo I, entretanto, os resultados finais expressos, foram corrigidos quanto às diluições utilizadas, podendo dessa forma ser comparados em relação às técnicas.

## **2.4 Ensaios de estabilidade para o MNV-1**

### **2.4.1 Ensaio de formação de placa de lise**

O ensaio de placa de lise foi utilizado para a titulação do estoque viral produzido bem como na verificação da infecciosidade do MNV-1 nos ensaios de estabilidade viral e foi realizado de acordo com o descrito por Bae et al. (2008) com algumas modificações.

Resumidamente, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados na densidade de  $2,0 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  em placas de seis cavidades. Quando se observou uma confluência celular de 80 a 90%, as células foram lavadas com PBS 1 $\times$  e infectadas em duplicata com 400  $\mu\text{L}$  de diluições entre  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  do fluido de MNV-1 produzido e diluído em meio DMEM ou no caso dos experimentos de estabilidade viral, com diluições não citotóxicas das amostras de água semeadas com o MNV-1. Após o período de 1 h a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  para a adsorção viral, o inóculo foi removido e adicionou-se uma camada (2 mL) de agarose de baixo ponto de fusão (*Sea Plaque*, Sigma), na concentração 1,5% preparada em PBS e diluída em meio de manutenção completo 2 $\times$  concentrado (MEM), suplementado da mesma forma que para o cultivo e manutenção das células. A adição dessa camada de agarose tem por objetivo a delimitação dos locais onde houve replicação viral e lise celular.

Após aproximadamente 10 min para a solidificação da agarose, as células foram incubadas a 37 °C em estufa e observadas durante aproximadamente 36 h, que corresponde ao ciclo de replicação viral. Após este período, as células foram coradas pela adição de 2 mL de uma solução de vermelho neutro (Sigma) na concentração final de 0,01% preparado em PBS para permitir a visualização das placas de lise formadas. As placas foram mantidas na estufa pelo período de 1 a 3 h para que o corante permeasse pela camada de agarose, em seguida o

excesso do mesmo foi removido por aspiração e as placas formadas foram contadas sendo que o número destas na maior diluição viral permitiu a estimativa do título viral em UFP mL<sup>-1</sup> (Unidades Formadoras de Placa mL<sup>-1</sup>) utilizando a fórmula descrita no item 2.2.1.

No presente trabalho, a titulação do estoque de MNV-1 produzido foi de  $3,5 \times 10^6$  UFP mL<sup>-1</sup>.

Para os ensaios de estabilidade viral, o mesmo protocolo foi seguido, variando somente os valores das diluições utilizadas, específicas para cada condição experimental (tempo de estocagem ou temperatura).

#### ***2.4.2 Extração do material genético das amostras semeadas com MNV-1***

Para a realização dos ensaios de RT-qPCR do MNV-1 na avaliação da estabilidade genômica do vírus semeado nas amostras de água e estocadas em diferentes temperaturas foi realizada a extração do material genético utilizando o kit comercial QIAmp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Este kit é baseado na metodologia descrita por Boom et al. (1990), com algumas modificações e baseia-se na retenção iônica dos ácidos nucleicos a uma matriz constituída por sílica positivamente carregada. Para tanto, partiu-se de um volume de 200 µL de amostra obtendo-se ao final da extração, o ácido nucleico contido num volume de 60 µL. Este kit permite a extração de diversas amostras ao mesmo tempo, com o mínimo de manipulação entre elas, diminuindo possíveis contaminações cruzadas entre amostras distintas. Ao final da extração, os ácidos nucleicos das amostras foram diluídos na base 10 (10<sup>-1</sup>) para a redução de possíveis inibidores das reações de RT-qPCR.

#### ***2.4.3 Reação de RT-qPCR para a avaliação da estabilidade genômica do MNV-1***

Nos ensaios de estabilidade viral, foi verificada, além da estabilidade das partículas infecciosas pelo ensaio de formação de placa de lise, a estabilidade genômica, a fim de comparar o modo como a temperatura interfere nas diferentes estruturas virais: capsídeo e material genético (RNA).

Para a verificação da estabilidade genômica foi utilizado o protocolo de RT-qPCR já descrito na literatura e previamente padronizado no Laboratório de Virologia Aplicada (BAERT et al. 2008).

Foi utilizado o kit QuantiTect Probe RT-PCR (Qiagen), que contém além da transcriptase reversa (RT), necessária para que ocorra a transcrição do RNA das amostras para cDNA, uma mistura dos reativos: *HotStartTaq* DNA Polimerase, oligonucleotídeos (dNTPs) e condições salinas adequadas. Este kit permite a realização da amplificação em apenas um passo (*one step*), ou seja, primeiramente as amostras são submetidas a uma temperatura específica, onde ocorre a ativação da enzima RT e a realização do processo de transcrição reversa e após esse processo, as amostras, já constituídas de cDNA, seguem com o ciclo normal de amplificação gênica.

A reação de RT-qPCR para o MNV-1 consistiu basicamente da adição de 12,5  $\mu\text{L}$  da mistura dos reativos do kit ( $2\times$  concentrado), mais a adição dos iniciadores MNV-F e MNV-R na concentração final de 0,2  $\mu\text{M}$  e sonda MNV-P do tipo hidrólise (TaqMan) na concentração final de 0,2  $\mu\text{M}$  e após, adição da amostra de RNA (10  $\mu\text{L}$ ), totalizando um volume final de 25  $\mu\text{L}$  (Quadro 4).

O perfil de temperaturas utilizado na reação de RT-qPCR foi de uma temperatura inicial de 50 °C por 30 min para a realização da RT, seguido da ativação da enzima DNA polimerase (*HotStart*) a 95 °C por 10 min e 40 ciclos de amplificação iniciando a 95 °C por 15 s para desnaturação do DNA e 60 °C por 1 min para o anelamento dos iniciadores e sonda, e extensão do DNA.

A reação foi realizada em sala livre de DNA e RNA em placa de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems) e em outra sala adicionaram-se as amostras de RNA. Transportou-se a placa até uma sala própria para a manipulação de plasmídeos (curva padrão) que possuem uma sequência gênica (junção ORF1/ORF2) clonada do MNV-1 e já haviam sido preparados e utilizados anteriormente no Laboratório de Virologia Aplicada, e estes foram adicionados (10  $\mu\text{L}$  em distintas diluições) contendo quantidades conhecidas de cópias de genomas. Em seguida procedeu-se a inclusão da placa no aparelho, como citado no item acima 2.3.1.

Os valores obtidos nas reações de RT-qPCR foram expressos em cópias genômicas por mL ( $\text{CG mL}^{-1}$ ).



**Quadro 4** - Iniciadores e sonda utilizados na reação de RT-qPCR para o MNV-1

Iniciadores e sonda	Sequência 5' - 3'	Referência
MNV-F MNV-R	CACGCCACCGATCTGTTCTG GCGCTGCGCCATCACTC	Baert, et al., 2009
Sonda MNVP	FAM-CGCTTTGGAACAATG- MGBNFQ	

### 2.5 Análises estatísticas

Os valores obtidos nas diferentes metodologias utilizadas na avaliação da estabilidade e/ou inativação viral em relação às diferentes temperaturas e tempos de estocagem foram expressos através de redução logarítmica, e comparados com os valores obtidos nas amostras inoculadas (tempo zero) aplicando a seguinte equação matemática:  $[\log_{10} (Nt/N0)]$ , sendo  $Nt$  a concentração viral em determinado tempo ( $t$ ) de análise e  $N0$  a concentração viral inicial (tempo zero). As médias de redução logarítmica obtidas em cada um dos experimentos foram plotadas para a construção das curvas de decaimento viral, sendo estes dados avaliados aplicando-se teste de análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, foi realizado um pós-teste Bonferroni.

O modelo de regressão linear foi utilizado para obter uma correlação entre o decaimento viral em relação ao tempo ( $R^2$ ), sendo os valores do coeficiente de inativação  $-k$  obtidos pelo *slope* fornecido pela equação da reta, permitindo desta forma o cálculo dos valores de  $T_{90}$  que correspondem ao tempo necessário para o decaimento de 1  $\log_{10}$ .

Todas as análises estatísticas usaram nível de confiança de 5% e foram realizadas em *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## 3 Resultados

### 3.1 Estabilidade térmica e temporal do HAdV2

As Figuras 12 a, b e c apresentam os resultados obtidos, expressos em valores de redução logarítmica, na avaliação da estabilidade do HAdV2 semeado em água de superfície pelas técnicas de formação de placa de lise (PL), citometria de fluxo (CF) e ICC-et-RT-qPCR respectivamente. As análises ocorreram durante o período de

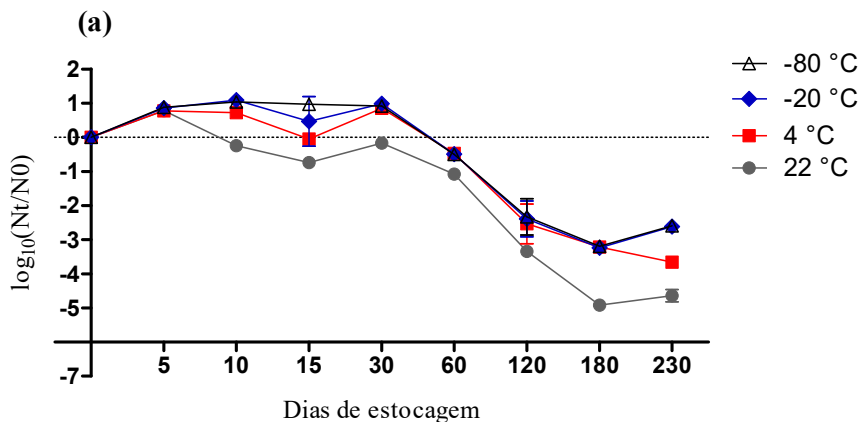
230 dias onde as amostras permaneceram estocadas nas temperaturas de 22, 4, -20 e -80 °C.

De maneira geral, a infecciosidade viral foi mais afetada nas amostras estocadas à temperatura de 22 °C onde, desde os primeiros tempos analisados, foi possível observar um decaimento no número de HAdV2 infecciosos independentemente da técnica utilizada.

Os resultados de decaimento da infecciosidade viral obtidos pelo ensaio de placa de lise (PL) demonstraram, como esperado, uma maior redução nos títulos virais nas amostras estocadas à temperatura de 22 °C. Já nas demais temperaturas analisadas (4, -20 e -80 °C) leves flutuações nos valores de redução do título viral foram observados até o dia 60 de estocagem, porém estes valores de redução observados não foram estatisticamente significantivos em relação aos valores de não redução ( $p > 0,05$ ). Quando se observa a curva de decaimento, pode-se notar que os vírus se comportaram de forma semelhante, quanto ao seu padrão de perda da infecciosidade, sendo que para todas as temperaturas avaliadas, houve um maior decaimento a partir de 120 dias de estocagem onde, para todas as amostras, observou-se uma redução viral em torno de 2  $\log_{10}$  (Figura 12a). Ao final de 230 dias de análise, os valores totais de redução logarítmica foram: 4,64  $\log_{10}$  para as amostras estocadas a 22 °C, 3,16  $\log_{10}$  (4 °C), 2,61  $\log_{10}$  (-20 °C) e 2,59  $\log_{10}$  (-80 °C) (Tabela 3).

As maiores diferenças observadas foram em relação ao decaimento viral nas amostras estocadas à temperatura de 22 °C em relação às demais temperaturas ( $p < 0,0001$ ).

**Figura 12a** - Redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do HAdV2 avaliada por placa de lise em amostras água de superfície (Lagoa do Peri) submetidas a diferentes temperaturas e tempos de estocagem pelo período total de 230 dias. Cada ponto da curva refere-se à média de três experimentos independentes.

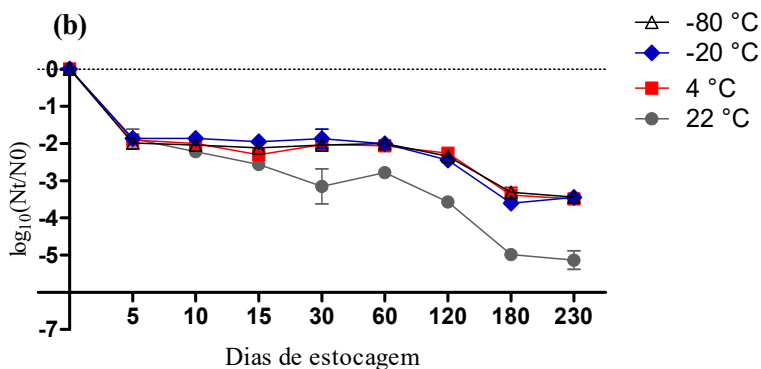


Os resultados obtidos na avaliação da infecciosidade do HAdV2 utilizando o método de citometria de fluxo estão apresentados abaixo (Figura 12b). Diferentemente do observado nas análises realizadas por PL, os resultados obtidos em valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) nas amostras analisadas por citometria de fluxo apresentaram valores de decaimento viral já no primeiro tempo de análise (5 dias), onde as amostras estocadas nas diferentes temperaturas mostraram uma média de decaimento viral de 2  $\log_{10}$ . Nos tempos subsequentes de análise, 10 e 15 dias, o decaimento permaneceu estável, com diferença estatística somente quando se comparou o decaimento ocorrido nas temperaturas de 22 e -20 °C ( $p < 0,05$ ). Entretanto, a partir do tempo 60 dias de estocagem houve um decaimento mais pronunciado nas amostras estocadas a 22 °C (3,15  $\log_{10}$ ) enquanto que para as demais temperaturas, o decaimento permaneceu estável (média de 2  $\log_{10}$ ) ( $p < 0,001$ ).

Até o período final das análises (230 dias), as amostras estocadas a 22 °C continuaram apresentando um decaimento gradual e ao final do período analisado observaram-se valores de redução logarítmica de 5,13  $\log_{10}$ . Já para as demais temperaturas, observou-se um decaimento mais pronunciado no tempo de avaliação 180 dias (em

média 1  $\log_{10}$ , com curva de decaimento semelhante à apresentada para as amostras estocadas a 22 °C) (Figura 12b). Ao final de 230 dias de análise, observou-se um valor de decaimento viral de 3,49  $\log_{10}$  para as amostras estocadas a 4 °C; 3,44  $\log_{10}$  para as amostras estocadas a -20 °C e 3,43  $\log_{10}$  para as amostras estocadas a -80 °C (Tabela 3).

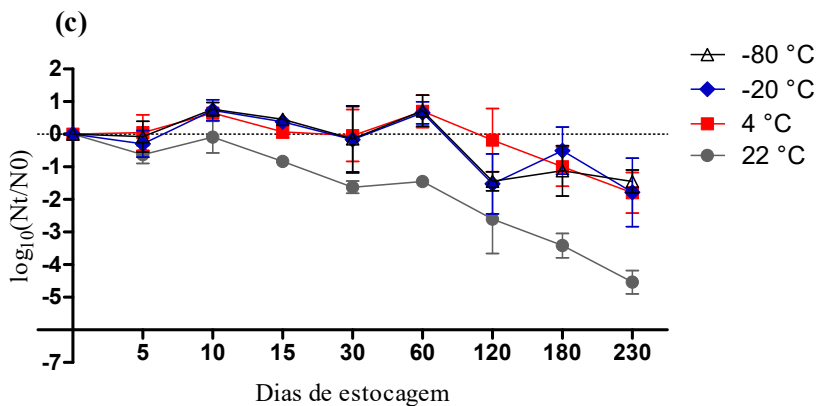
**Figura 12b** - Redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do HAdV2 avaliada por citometria de fluxo em amostras água de superfície (Lagoa do Peri) submetidas a diferentes temperaturas e tempos de estocagem pelo período total de 230 dias. Cada ponto da curva refere-se à média de três experimentos independentes.



Com exceção das amostras estocadas a 22 °C que mostraram um decaimento viral já nos primeiros períodos de análise, chegando ao final de 60 dias com um decaimento de 0,71  $\log_{10}$ , as amostras estocadas nas demais temperaturas apresentaram baixos valores de redução nos títulos virais do HAdV2 dentro dos primeiros 60 dias de estocagem quando avaliado por ICC-et-RT-qPCR (Figura 12c). A partir de 60 dias, os vírus, antes estáveis nas temperaturas de estocagem de 4, -20 e -80 °C, iniciaram um processo de perda da sua infecciosidade, com aparente redução logarítmica (Figura 12c). Tanto para estas amostras quanto para as estocadas a 22 °C foi observada uma redução gradual até o período final de análise 230 dias, onde os valores finais de redução foram: 4,53  $\log_{10}$  (amostras a 22 °C); 1,79  $\log_{10}$  para as amostras a 4 °C; 1,78  $\log_{10}$  para as amostras a -20 °C e 1,45  $\log_{10}$  para as amostras estocadas a -80 °C (Tabela 3).

As diferenças observadas em relação aos tempos de estocagem e temperaturas não foram estatisticamente significativas até o tempo de 60 dias de análise, onde a partir deste período os valores obtidos nas temperaturas de 22 °C diferiram estatisticamente em relação às demais temperaturas ( $p < 0,01$ ), sendo a maior diferença observada em relação às temperaturas de 4 e -20 °C nos períodos de análise de 180 e 230 dias ( $p < 0,0001$ ).

**Figura 12c** - Redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do HAdV2 avaliada por ICC-et-RT-qPCR em amostras água de superfície (Lagoa do Peri) submetidas a diferentes temperaturas e tempos de estocagem pelo período total de 230 dias. Cada ponto da curva refere-se à média de três experimentos independentes.



A Tabela 3 resume os valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) obtidos ao final do período de estocagem (230 dias) para cada técnica empregada. Pode-se concluir que a temperatura de estocagem de 22 °C foi a responsável pelo maior decaimento viral, sendo estes valores apresentados em ordem decrescente de: 22>4>-20>-80 °C.

**Tabela 3** - Valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do HAdV2 semeado em água de superfície quando avaliadas distintas temperaturas e tempos de estocagem ao final de 230 dias. Os resultados foram obtidos por meio da utilização de diferentes metodologias que avaliam a infecciosidade viral: placa de lise, citometria de fluxo e ICC-et-RT-qPCR.

Temperatura (°C)	Placa de lise	Citometria de fluxo	ICC-et-RT-qPCR
22	-4,64	-5,13	-4,53
4	-3,16	-3,49	-1,79
-20	-2,61	-3,44	-1,78
-80	-2,59	-3,43	-1,45

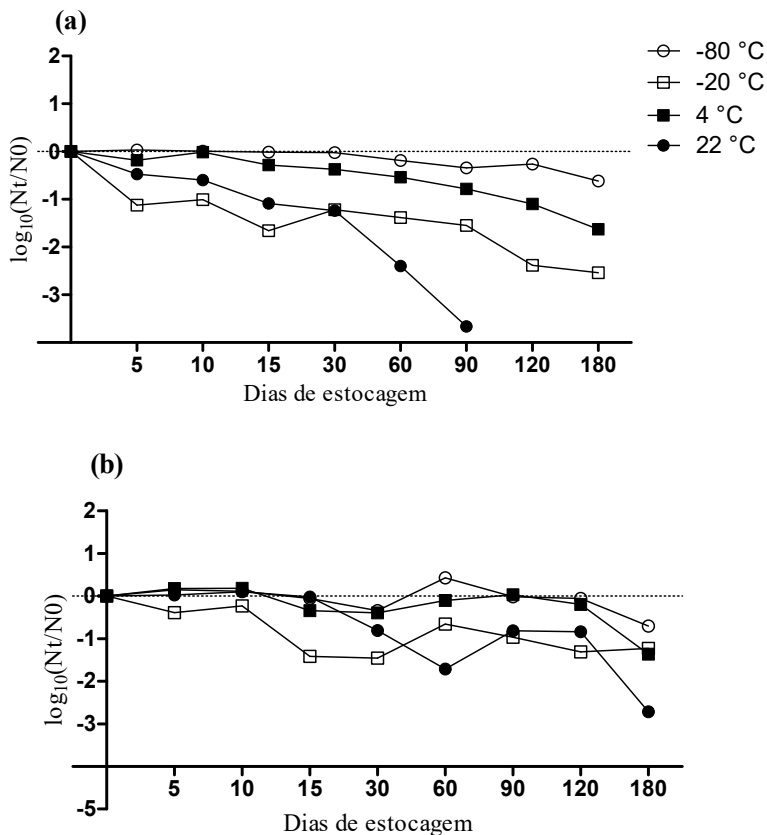
### 3.2 Estabilidade térmica e temporal do MNV-1

Amostras de água de superfície (Lagoa do Peri) foram semeadas com norovírus murino tipo 1 (MNV-1) e estocadas a temperaturas que mimetizam tanto o ambiente natural (22 °C) quanto as temperaturas de estocagem normalmente utilizadas pelos laboratórios previamente à análise (4, -20 e -80 °C). Nos períodos imediatamente após a semeadura (tempo zero) e nos períodos de 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 dias, as amostras foram analisadas quanto a sua infecciosidade pelo ensaio de placa de lise e quanto à persistência e estabilidade genômica por RT-qPCR.

A Figura 13 apresenta os resultados obtidos em relação aos valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) nas amostras de água de superfície semeadas com MNV-1 e avaliadas por placa de lise e RT-qPCR. De maneira geral pode-se observar que as amostras avaliadas quanto à perda da infecciosidade do MNV-1 tiveram uma média de decaimento viral maior quando comparadas às avaliadas para a permanência do genoma (Figuras 13a e b), sendo o decaimento da infecciosidade mais pronunciado nas amostras estocadas a 22 e -20 °C quando comparadas com as demais temperaturas de estocagem 4 e -80 °C. Enquanto o decaimento observado nas amostras analisadas por placa de lise mostrou-se linear em relação ao tempo, o decaimento promovido pela temperatura sobre a estabilidade do genoma, não foi linear apresentando pequenas flutuações ao longo do tempo analisado.

A análise de variância demonstrou que não houve uma interação significativa entre os valores de redução logarítmica obtidos ( $p > 0,05$ ) quando se comparou as variáveis temperatura e tempo de estocagem, independentemente do método de avaliação utilizado (PL ou RT-qPCR).

**Figura 13** - Valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) referente à infecciosidade do MNV-1 semeado em amostras de água de superfície e submetido à diferentes temperaturas e tempos de estocagem pelo período total de 180 dias. **a)** placa de lise (PL); **b)** estabilidade genômica pelo ensaio da RT-qPCR. Cada ponto da curva refere-se à média de dois experimentos independentes.



Conforme esperado, os vírus estocados a 22 °C em comparação com as demais temperaturas foram os que apresentaram os maiores

valores de redução logarítmica, tanto na avaliação da infecciosidade quanto em relação à persistência do genoma. Já nos primeiros períodos de análise (5 e 10 dias) houve um decaimento da infecciosidade viral, enquanto a presença do genoma manteve-se constante até o período de 15 dias de análise. A partir deste período, a infecciosidade viral foi consideravelmente afetada, apresentando decaimento médio de  $1,08 \log_{10}$  sendo este decaimento gradual até a completa inativação viral, onde no tempo de 90 dias não foi mais possível a detecção de vírus infecciosos pelo ensaio de placa de lise (redução de  $3,66 \log_{10}$ ). Em contrapartida, pode-se observar que a presença do genoma pode ser detectada pelo ensaio de RT-qPCR até o último período analisado (180 dias), com uma redução logarítmica média de  $2,77 \log_{10}$  (Figura 13b e Tabela 4).

As amostras estocadas a  $4^{\circ}\text{C}$  apresentaram um comportamento diferente em relação às amostras estocadas a temperatura de  $22^{\circ}\text{C}$  onde foi possível observar uma diminuição linear da infecciosidade a partir dos 15 dias de estocagem culminando com  $1,62 \log_{10}$  de redução no último período analisado (180 dias). Já em relação à estabilidade genômica, esta permaneceu sem diminuição significativa até os 180 dias quando foi observado  $1,36 \log_{10}$  de redução (Tabela 4).

Em relação às amostras estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  pode-se observar que as mesmas tiveram um comportamento mais similar com as amostras estocadas à  $22^{\circ}\text{C}$  do que com as demais temperaturas de estocagem. Ambas as metodologias possibilitaram verificar um decaimento inicial da estabilidade, tanto da infecciosidade quanto do genoma, observado até o dia 15 ( $0,44 \log_{10}$  e  $0,67 \log_{10}$  respectivamente). Entre os tempos de 30 e 60 dias de estocagem as amostras permaneceram estáveis e a partir de 90 dias apresentaram uma redução gradual, sendo que ao final de 180 dias de análise observou-se um decaimento médio de  $2,53 \log_{10}$  na infecciosidade e  $1,22 \log_{10}$  na estabilidade genômica (Tabela 4).

Conforme esperado, as amostras estocadas na temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  foram as que apresentaram os menores valores de redução logarítmica ao longo do período analisado, tanto em relação à infecciosidade quanto da estabilidade genômica. A influência da temperatura na infecciosidade mostrou-se relevante somente a partir do dia 60 de estocagem, onde foi observado um decaimento gradual, chegando a  $0,61 \log_{10}$  no último dia de análise (180 dias). Já em relação a estabilidade genômica, esta demonstrou uma pequena redução ( $0,33$



$\log_{10}$ ) no dia 30 de análise, apresentando um total de decaimento da presença do genoma de 0,70  $\log_{10}$  ao final dos 180 dias de análise (Tabela 4).

Resumidamente, pode-se comprovar que a influência da temperatura foi importante na diminuição da infecciosidade viral, enquanto que a estabilidade genômica mostrou-se menos afetada, apesar de a quantificação do genoma ter sofrido redução significativa quando estocado nas temperaturas 22 e -20 °C.

A Tabela 4 resume os valores de redução logarítmica obtidos ao final do período de análise (180 dias) de estocagem, tanto na avaliação da perda da infecciosidade pelo ensaio de placa de lise, quanto na avaliação da estabilidade genômica utilizando o ensaio de RT-qPCR.

**Tabela 4** - Valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) do MNV-1 semeado em água de superfície quando avaliadas em distintas temperaturas e tempos de estocagem pelo período total de 180 dias. Os resultados foram obtidos por meio da avaliação de infecciosidade (placa de lise) e de quantificação genômica (RT-qPCR).

Temperatura (°C)	Placa de lise	RT-qPCR
22	-3,66*	-2,77
4	-1,62	-1,36
-20	-2,53	-1,22
-80	-0,61	-0,70

**Legenda:** \*: as amostras estocadas a temperatura de 22 °C foram avaliadas até o período de 90 dias de estocagem, onde a partir deste, não foi mais possível a detecção de MNV-1 viáveis.

### ***3.3 $T_{90}$ e parâmetros de inativação do HAdV2 e MNV-1 analisados pelo modelo de regressão linear***

A Tabela 5 apresenta os valores obtidos para o  $T_{90}$  (tempo estimado para o decaimento de 1  $\log_{10}$ ), taxas de inativação ( $-k$ ) do HAdV2 e MNV-1 obtidos pelo modelo de regressão linear.

Para o HAdV2 os valores de  $T_{90}$  variaram entre as técnicas de cultura celular utilizadas. Para o método de placa de lise os valores de  $T_{90}$  foram mais baixos em comparação com os demais métodos, para as temperaturas de 22 e 4 °C (50 dias) ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, CF e

ICC-et-RT-qPCR apresentaram valores de  $T_{90}$  similares independente da temperatura de estocagem. Entretanto vale ressaltar que para a CF as amostras estocadas a 4 °C exibiram os maiores valores de  $T_{90}$  (166 dias) em comparação com as demais técnicas, isso pode ser devido ao baixo valor de  $R^2$  obtido (Tabela 5).

**Tabela 5** - Parâmetros e tempos de inativação ( $T_{90}$ ) do HAdV2 e MNV-1 semeado em amostras de água de superfície e avaliado por diferentes técnicas de cultura celular analisados por modelo de regressão linear

Vírus	Método	Temp (°C)	$R^2$	Taxa de inativação (-k)	$T_{90}$ (dias)
HAdV2	Placa de lise *	22	0,89	0,02	50
		4	0,93	0,02	50
		-20	0,81	0,01	100
		-80	0,82	0,01	100
	Citometria de fluxo *	22	0,90	0,01	100
			NS		
		-20	0,90	0,009	111
		-80	0,91	0,008	125
	ICC-et-RT-qPCR †	22	0,92	0,01	100
		4	0,81	0,008	125
		-20	0,81	0,009	111
		-80	0,83	0,009	111
MNV-1	Placa de lise ‡	22	0,97	0,03	33
		4	0,96	0,009	111
		-20	0,92	0,01	100
		-80	0,80	0,003	333

\* regressão linear entre os tempos de 30 a 230 dias de estocagem

† regressão linear entre os tempos de 10 a 230 dias de estocagem

‡ regressão linear entre os tempos de 0 a 180 dias de estocagem

NS: valores de  $R^2$  não estatisticamente significativos

O MNV-1 quando avaliado por placa de lise apresentou os menores valores de  $T_{90}$  para as amostras estocadas a temperatura ambiente de 22 °C (33 dias) quando comparado com as outras temperaturas de estocagem. Os resultados obtidos para o MNV-1 por PL exibiram os melhores valores de correlação linear ( $R^2$ ) ao longo dos 180 dias de estocagem, com exceção das amostras estocadas a -80 °C. Entretanto, para o HAdV2 essa linearidade ocorreu entre os dias 30 e 230 de estocagem quando analisado por PL e CF e entre os dias 10 e 230 quando analisado por ICC-et-RT-qPCR (Tabela 5).

#### 4 Discussão

A atual situação dos mananciais de água de superfície, mais precisamente os destinados a coleta, tratamento e distribuição da água para o consumo é preocupante, visto os inúmeros trabalhos relatam a contaminação destes reservatórios de água por diferentes tipos de patógenos, destacando-se a contaminação por vírus entéricos (BORCHARDT et al. 2003; HARAMOTO et al. 2007; BEGIER et al. 2008; MIAGOSTOVICH et al. 2008; RIGOTTO et al. 2010; FONGARO et al. 2012).

No meio ambiente aquático, os vírus entéricos podem permanecer estáveis resistindo a várias condições adversas, preservando assim, sua capacidade infecciosa. Sabe-se que nesses ambientes, a temperatura é considerada o fator mais importante no processo de inativação viral no meio ambiente (YATES et al. 1985; BERTRAND et al. 2012).

A avaliação da influência da temperatura na estabilidade viral é usualmente realizada utilizando métodos associados à cultura celular para inferir sobre a infecciosidade do vírus, uma vez que métodos que avaliam somente a presença do genoma, como a PCR, não conseguem distinguir entre a presença de partículas virais infecciosas de não infecciosas (GASSILLOUD et al. 2003; DE RODA HUSMAN et al. 2009).

Os resultados obtidos no presente capítulo são referentes a avaliação da estabilidade térmica do adenovírus humano tipo 2 (HAdV2) e do norovírus murino (MNV-1) semeados em amostras de água de superfície e submetidos a diferentes temperaturas e tempos de estocagem. Para ambos os modelos virais, foram escolhidas as temperaturas de 22, 4, -20 e -80 °C, sendo que os tempos de estocagem, bem como as técnicas utilizadas variaram de acordo com o vírus.

Na avaliação da estabilidade do HAdV2 os resultados mostraram que o decaimento da infecciosidade viral variou em relação às temperaturas analisadas e também em relação às técnicas utilizadas, esta última, devido às diferenças de sensibilidade das mesmas ou mesmo à diferenças amostrais intrínsecas discutidas abaixo. Os resultados obtidos pelo ensaio de citometria de fluxo (CF) foram os que mostraram os maiores valores de redução logarítmica em relação às temperaturas analisadas, seguido pelos resultados de redução obtidos pela técnica de placa de lise (PL) e por último por ICC-et-RT-qPCR (Tabela 3).

O maior decaimento viral nas amostras analisadas pela citometria de fluxo em relação às demais técnicas deve-se principalmente à ocorrência de um decaimento inicial (dia 5) de  $2 \log_{10}$  em relação ao tempo zero (logo após a semeadura) observado em todas as temperaturas de estocagem, o que não ocorreu nos valores obtidos pelas técnicas de PL e ICC-et-RT-qPCR, onde as concentrações virais apresentaram pequenas flutuações nos primeiros tempos de análise (Figuras 12a e b e c). Esse decaimento inicial demonstra que pode ter ocorrido a superestimação dos valores de decaimento viral detectados pela CF, possivelmente promovidos pelo fenômeno da agregação viral (GASSILLOUD, GANTZER 2005; TULADHAR et al. 2012). Esse fenômeno não foi detectado pelas demais técnicas empregadas devido provavelmente às diferenças metodológicas e de limites de sensibilidade.

Fatores como o maior tempo de incubação necessário para o método de placa de lise ou os diferentes passos para a realização do ensaio de ICC-et-RT-qPCR podem ter subestimado os valores de decaimento viral aparente (devido à agregação) nos primeiros períodos analisados. Por exemplo, para PL, são necessários entre 6-7 dias para permitir o espalhamento viral às células vizinhas e assim observar-se o aparecimento de efeito citopático e conseqüente lise celular com a formação dos halos não corados. (LANGLET et al. 2007). Por outro lado, a técnica de ICC-et-RT-qPCR requer a obtenção do RNA durante o processo de extração diretamente da monocamada celular resultando em incertezas quanto ao número de partículas virais que estavam viáveis no início da infecção. Já o uso de anticorpos específicos marcados com fluoróforos utilizado na CF, seguido de curtos períodos de incubação e análise de uma única célula fluorescente (infectada) no citômetro de fluxo pode evitar alguns desses problemas e fornecer

dados acerca do número de partículas infecciosas de forma mais precisa (LANGLET et al. 2007; HAMZA et al. 2011).

Outro fator a ser considerado em relação ao maior decaimento viral observado na detecção pela técnica de CF é que o processo de semeadura do inóculo viral na amostra de água expõe de forma abrupta as partículas virais à possíveis enzimas proteolíticas de bactérias presentes na água, que podem danificar os capsídeos virais, além da rápida mudança de temperatura a qual as amostras foram submetidas durante o processo de estocagem que pode ocasionar uma queda inicial da infecciosidade viral (Figura 12b) (WARD et al. 1986)

Existem diversos trabalhos avaliando a estabilidade de adenovírus, entre outros vírus entéricos, em diferentes matrizes ambientais, bem como em condições experimentais diversas, como variações de temperatura, pH, salinidade, avaliação da ação do cloro e da radiação U.V. na inativação viral (GERBA et al. 2002; GERBA 2005; SIRIKANCHANA et al. 2008; EISCHEID et al. 2009; CROMEANS et al. 2010; CARRATALÀ et al. 2013a).

Muitos desses estudos reportam o HAdV como um dos vírus mais estáveis no meio ambiente aquático e, devido a sua alta prevalência em matrizes ambientais, é de grande importância estudar o comportamento deste vírus em relação a sua estabilidade térmica, fator este que influencia diretamente na sobrevivência do vírus presente naturalmente em diferentes mananciais aquáticos. Um dos fatores que contribui para a elevada estabilidade do HAdV frente a diferentes agentes inativantes é a composição do seu material genético (DNA fita dupla), além do capsídeo em formato icosaédrico composto predominantemente por um único motivo de proteínas *hexons*. Quando comparado com outros vírus entéricos de genoma RNA, o HAdV apresenta a vantagem de que se uma das fitas de DNA for danificada pela ação de algum fator externo, a fita complementar intacta pode servir como molde para o reparo da fita danificada, utilizando enzimas de reparo da célula hospedeira, e isto pode acontecer durante o seu processo de replicação *in vitro* (EISCHEID et al. 2009).

Ainda não há uma conformidade acerca do real comportamento do HAdV quanto a sua estabilidade térmica, sendo que uma das variáveis mais importantes é o tipo de matriz ambiental, bem como os métodos utilizados na avaliação da sua infecciosidade (BERTRAND et al. 2012).

Analisando a estabilidade térmica de HAdV dos tipos 2 (respiratório) e 41 (entérico) por placa de lise em amostras de água de

superfície e água subterrânea autoclavadas, Rigotto et al. (2011) não encontraram redução logarítmica significativa para as amostras estocadas a 4 °C. Porém, quando estocadas a 19 °C, os vírus permaneceram estáveis por um período de 60 dias e então decaíram gradativamente até o período 310 dias (4 log<sub>10</sub>). No presente trabalho, utilizando a mesma metodologia, os valores de redução obtidos para o HAdV2 em amostras de água de superfície foram de 4,64 log<sub>10</sub> e 3,16 log<sub>10</sub> ao final de 230 dias quando estocadas respectivamente a 22 e 4 °C.

Vale ressaltar que no presente trabalho, a amostra de água utilizada (água de manancial) não foi previamente esterilizada, o que permitiu uma abordagem mais fidedigna a respeito da inativação viral tanto pela ação da temperatura como devido a manutenção da composição original da amostra, como a presença de micro-organismos endógenos que podem contribuir para um maior decaimento viral devido a predação ou ação virucida (WARD et al. 1986; GORDON, TOZE 2003; FONG, LIPP 2005).

Em estudo recente, Carratalà et al. (2013a) não observaram decaimento significativo na estabilidade de HAdV2 em amostras de água mineral quando estocadas a 7, 20 e 37 °C durante um período de 24 h por ensaio de imunofluorescência indireta. Entretanto em amostras de água de esgoto e água do mar a perda da infecciosidade viral foi mais pronunciada quando estocada a 37 °C. O curto período analisado (24 h) demonstra a necessidade de estudos que avaliem a estabilidade térmica por um período mais prolongado. Esse estudo comprovou ainda que amostras de águas que apresentam uma maior contaminação por outros micro-organismos ou outros componentes orgânicos e/ou inorgânicos (água de esgoto) apresentam uma menor estabilidade dos vírus. Também foi demonstrado em outro estudo com amostras de água subterrânea estocadas a 12 ± 2 °C que o HAdV2 permaneceu estável por um período de até 364 dias, quando avaliado por placa de lise e PCR, demonstrando ser o mais estável em relação a outros vírus de genoma RNA fita simples ou bacteriófagos de genoma DNA fita dupla e simples (CHARLES et al. 2009).

Existem poucos trabalhos avaliando a estabilidade de vírus em temperaturas que possam ser utilizadas para a estocagem de amostras em laboratório previamente à análise, como 4, -20 e -80 °C. Um trabalho conduzido por Olson et al. (2004) avaliando a estabilidade do bacteriófago MS2 (genoma RNA), que infecta *Salmonella* sp. e é aceito

como modelo substituto para estudos com vírus entéricos, concluiu que quando semeados em amostras de esgoto, provenientes de diversas etapas do tratamento, o MS2 teve sua estabilidade mais afetada quando as amostras foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do em temperaturas de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por períodos curtos, de até 48 h, é recomendável a estocagem em temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e por períodos longos, meses, a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Acredita-se que a maior inativação viral em amostras submetidas à temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  deva-se à formação de cristais de gelo que danificam a estrutura do capsídeo viral (GOULD 1999).

Shoham (2005) verificou que a habilidade da água em se expandir durante o processo de congelamento não interfere na estabilidade viral se este congelamento ocorrer de forma lenta e gradual, por exemplo, temperatura ambiente seguido de  $4, 0, -20$  e  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vale ressaltar que no presente estudo, as amostras de água semeadas com os vírus foram estocadas imediatamente nas temperaturas utilizadas, ocorrendo dessa forma um congelamento abrupto, o que pode ter contribuído para o maior decaimento obtido para o MNV-1 quando armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

No presente trabalho, a estabilidade do HAdV2 nas amostras de água de superfície seguiu o padrão de estabilidade de  $-80 > -20 > 4 > 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo que, com exceção das amostras estocadas a  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o HAdV2 presente nas amostras permaneceu potencialmente infeccioso por um período superior a 230 dias para todas as técnicas utilizadas. Apesar das diferenças observadas em relação aos valores finais de redução logarítmica obtidos nas diferentes metodologias baseadas em cultura celular empregadas, pode-se observar que todas apresentaram o mesmo perfil de inativação viral em relação às temperaturas de estocagem (Figura 12).

O norovírus humano (HuNoV) está muito relacionado com surtos de gastroenterites veiculadas pela ingestão de alimentos contaminados por este vírus, principalmente devido à irrigação ou ao processamento de alimentos com água contaminada. Devido ao fato de que a cepa humana não é adaptada ao cultivo celular, a maioria dos trabalhos que avaliam a estabilidade do norovírus utilizam outros modelos virais que são adaptados ao cultivo celular e permitem dessa forma a avaliação da viabilidade deste vírus (TULADHAR et al. 2012; VERHAELLEN et al. 2012).

No presente trabalho a avaliação da ação da temperatura sobre a inativação do MNV-1 em amostras de água de superfície foi avaliada pelo ensaio de formação de placa de lise (infecciosidade) e por RT-

qPCR (presença do genoma). Os resultados variaram de acordo com a temperatura analisada, porém, conforme esperado, a detecção do genoma viral total foi menos afetada pela ação da temperatura do que a capacidade infecciosa do vírus. Quando estocado a 22 °C as partículas infecciosas do MNV-1 apresentaram os maiores valores de redução onde a partir de 90 dias de estocagem não foi mais possível a detecção de vírus viáveis pelo ensaio de placa de lise. Em estudo conduzido por Bae, Schwab (2008) onde a estabilidade de diferentes modelos virais substitutos ao HuNoV como o MNV-1, o bacteriófago MS2, o calicivírus felino (FCV) e o poliovírus (PV) foi avaliada em diferentes amostras de água do ambiente estocadas a 25 °C, obteve-se, independentemente do modelo viral, maiores valores de redução da infecciosidade em relação ao genoma, entretanto não houve diferenças significativas quando estocadas a temperatura de 4 °C, sendo o MNV-1 o mais estável em relação ao ensaio de placa de lise e o norovírus humano o mais estável em relação ao ensaio de RT-qPCR.

De Roda Husman et al. (2009) também obtiveram maiores taxas de decaimento da infecciosidade em relação ao genoma viral para diferentes vírus entéricos de genoma RNA simples fita (PV1, PV2 e coxsackievirus B4) quando semeados em água de superfície artificial. Entretanto vale ressaltar que quando estocados a temperatura de 22 °C o decaimento observado para a infecciosidade foi paralelo ao decaimento observado para o genoma. Da mesma forma, no presente trabalho, os valores finais de decaimento tanto para a viabilidade da partícula viral como da estabilidade genômica apresentaram decaimento paralelo em todas as temperaturas analisadas (Figura 13).

Outros vírus entéricos compostos de material genético RNA como o rotavírus (dsRNA), astrovírus e poliovírus (ssRNA, senso positivo) apresentam diferentes padrões de estabilidade de acordo com a matriz aquática onde estão presentes. Mais especificamente, a infecciosidade é mais afetada em águas de superfície do que em águas subterrâneas e vírus de genoma ssRNA são menos estáveis que os de genoma dsRNA (ESPINOSA et al. 2008; CHARLES et al. 2009; DE RODA HUSMAN et al. 2009).

Dependendo do tipo de água onde os vírus foram semeados, o comportamento da estabilidade genômica apresenta-se de forma semelhante ou não ao padrão de variação na estabilidade da infecciosidade. Isso ocorre porque uma vez que a partícula viral (capsídeo) foi danificada pela ação da temperatura, ou radiação U.V.,



por exemplo, o material genético composto por RNA fita simples (altamente instável) fica exposto à degradação por enzimas proteolíticas presentes no meio e com isso a inativação tanto da partícula viável quanto do genoma aumentam (WARD et al. 1986).

As análises realizadas por RT-qPCR no presente trabalho apresentaram flutuações ao longo dos tempos analisados em todas as temperaturas de estocagem. Fatores externos podem interferir nos processos enzimáticos de amplificação, como diferenças na eficiência da extração do material genético, presença de inibidores da transcriptase reversa e da DNA polimerase ou mesmo diferenças amostrais intrínsecas que podem explicar a observação destas flutuações em relação ao número de cópias genômicas detectado (ESPINOSA et al. 2008; RODRÍGUEZ et al. 2009).

De maneira geral, a estocagem de amostras a temperaturas mais baixas como 4 °C por período curto de estocagem, ou -80 °C, para períodos mais longos previamente à análise da amostra, permitem uma melhor manutenção da estabilidade viral e consequentemente da estabilidade genômica, isso porque, possíveis fatores que podem contribuir com a inativação viral estarão mais controlados. Nessas temperaturas, micro-organismos predadores estão com o seu crescimento e metabolismo controlados e nesse sentido, mesmo amostras ambientais muito contaminadas com matéria orgânica, como água de esgoto, acabam por favorecer a estabilidade viral, protegendo os vírus devido à tendência das partículas virais se agregarem aos sólidos em suspensão (WARD et al. 1986; THURSTON-ENRIQUEZ et al. 2003).

No presente estudo, as amostras de água submetidas à temperatura de -80 °C tiveram ao final do período de 180 dias de análise, uma redução logarítmica de apenas 0,61 log<sub>10</sub>, o que denota a estabilidade do MNV-1 estocado nesta temperatura. Richards, et al. (2012) demonstraram que o norovírus humano genogrupo GII.4 em amostras de fezes filtradas, permaneceu sem alterações quanto a integridade do capsídeo e quantificação do material genético por RT-qPCR, durante um período de 120 dias de estocagem a -80 °C. Quando as amostras foram submetidas a vários ciclos de congelamento e descongelamento não houve alteração significativa na integridade e/ou degradação do genoma viral.

Na avaliação da estabilidade térmica do MNV-1 as amostras foram mais estáveis seguindo a ordem das temperaturas de -80 > 4 > -20 > 22 °C para as análises realizadas por placa de lise e de -80 > -20 >

4> 22 °C para os valores de decaimento genômico obtidos por RT-qPCR (Tabela 4). Com exceção das amostras estocadas a 22 °C, nas demais temperaturas, a razão da detecção de cópias genômicas *versus* unidades formadoras de placa (CG/UFP), permaneceu sem grandes alterações ao longo do período avaliado. Tendo em vista que a metodologia da RT-qPCR é capaz de detectar genomas virais provenientes de partículas defectivas, ou seja, sem a capacidade de infectar as células, o que poderia subestimar os reais valores de decaimento viral, ambos os métodos mostraram-se eficientes na avaliação da estabilidade térmica do MNV-1, sendo possível sua utilização em estudos de análise de risco microbiológico (DE RODA HUSMAN et al. 2009).

Quando se compararam os valores de  $T_{90}$  obtidos utilizando o modelo de regressão linear para o HAdV2 e MNV-1 pelo mesmo período (180 dias) e analisados pela mesma técnica (placa de lise), amostras semeadas com MNV-1 e estocadas a 22 °C apresentaram os menores tempos para que ocorresse 1  $\log_{10}$  de inativação (33 dias) em comparação com os 50 dias requeridos pelo HAdV2 (Tabela 5). Nas demais temperaturas de estocagem (4, -20 e 80 °C) os valores de  $T_{90}$  obtidos para o MNV-1 foram menores que os observados para o HAdV2.

Como citado anteriormente, é difícil um consenso acerca dos tempos de inativação para cada vírus avaliado em relação aos tipos de matrizes aquáticas e metodologias empregadas. Carter, et al. (2005) avaliando o tempo de inativação de diferentes vírus entéricos em diferentes condições, encontrou que o tempo de 10 minutos são necessários para a inativação total do HAdV quando submetido a temperatura de 56 °C. Outro trabalho, utilizando modelo de regressão linear, constatou que amostras de água do mar mantidas a 37 °C e sob irradiação UVA, apresentaram os valores de 3, 7, 11 e 15 horas para a inativação de 1, 2, 3 e 4  $\log_{10}$ , ou seja, valores de  $T_{90}$ ,  $T_{99}$ ,  $T_{99,9}$  e  $T_{99,99}$  respectivamente. Já amostras de água mineral irradiadas com UVB e estocadas a 7 °C apresentaram valores de 0, 98, 2, 3 e 5 horas para o decaimento de  $T_{90}$ ,  $T_{99}$ ,  $T_{99,9}$  e  $T_{99,99}$  (CARRATALÀ et al. 2013a).

Em outro trabalho que utilizou poliovírus (genoma RNA simples fita) semeado em amostras de água de superfície e estocado a 22 °C, De Roda Husman et al. (2009) encontraram valores de tempo de meia vida de 24,4 dias com valores de constante de inativação muito inferiores aos apresentados para o MNV-1 no presente estudo. Outro

trabalho, avaliando a estabilidade do bacteriófago MS2 em amostras de água subterrânea encontrou valores para  $T_{90}$  de 23,4 e 1,4 dias e HAdV2 131,6 e 35,6 dias para amostras estocadas a 4 e 20 °C respectivamente utilizando ensaio de cultura celular (OGORZALY et al. 2010).

A avaliação dos tempos de inativação utilizando modelos mais robustos, talvez possa explicar as diferenças observadas em relação aos perfis de inativação encontrados para o HAdV2 e o MNV-1 quando submetidos às mesmas temperaturas de estocagem, podendo demonstrar a existência do fenômeno da agregação viral, mais pronunciado para o HAdV2 do que para o MNV-1.

A concentração viral inicial adicionada à amostra de água de superfície pode influenciar na ocorrência do fenômeno de agregação e poderia explicar a aparente maior redução viral obtida para o HAdV2 em relação ao MNV-1 (LANGLET et al. 2007).

É preciso ainda considerar que diferentes vírus entéricos apresentam diferentes padrões de decaimento e valores de  $T_{90}$  e que outros fatores além da temperatura podem estar contribuindo para a inativação viral, como fenômenos de adesão-agregação, o tipo da amostra, diferenças nos locais geográficos onde as amostras foram obtidas, variação entre os métodos de detecção utilizados (cultura celular e/ou moleculares), presença de outros micro-organismos e parâmetros físico-químicos, bem como os modelos de avaliação da cinética de decaimento viral empregado (NOBLE et al. 2004; AHMED et al. 2014).



## Capítulo III

### Estabilidade térmica do rotavírus humano cepa vacinal (RotaTeq) em diferentes amostras de água de superfície

#### 1 Objetivo geral

Verificar o perfil de estabilidade térmica do rotavírus humano cepa vacinal em amostras de água de superfície.

##### 1.1 Objetivos específicos

- Padronizar o ensaio de formação de placa de lise para a titulação e avaliação da viabilidade do rotavírus humano (RV) cepa vacinal;
- Determinar o limite de detecção do RV cepa vacinal em águas de superfície por meio da técnica de placa de lise;
- Avaliar a estabilidade térmica do RV cepa vacinal em diferentes amostras de água e temperaturas de estocagem comparando infecciosidade *versus* estabilidade genômica;
- Determinar os valores de  $T_{90}$  em relação ao decaimento do RV viral utilizando o modelo de regressão linear;

#### 2 Materiais e métodos

##### 2.1 Produção do estoque viral de rotavírus cepa vacinal e padronização do ensaio de formação de placa de lise

Células da linhagem MA104 (células epiteliais de rim de macaco rhesus) permissivas à infecção pelo RV foram cultivadas em meio MEM (Eagle's minimal essential medium) (Gibco-BRL, Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Gibco) (meio de crescimento) ou sem SFB (meio de manutenção); 100 U mL<sup>-1</sup> penicilina G, 100 µg mL<sup>-1</sup> estreptomocina, 0,025 µg mL<sup>-1</sup> anfotericina (PSA) (Gibco); 1% de L-glutamina 2 mM; 1× de aminoácidos não-essenciais e 1% de piruvato de sódio 2 M (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e a 37 °C.

A cepa de RV derivada da vacina RotaTeq utilizada na infecção *in vitro* das células permissivas foi gentilmente cedida pelo Dr.

Fernando Rosado Spilki, Universidade Feevale, Rio Grande do Sul, Brasil e foi aqui denominada RVA-Teq. O estoque viral foi produzido pela infecção de uma monocamada de células MA104 em frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Após a visualização do efeito citopático (ECP) os frascos contendo células infectadas foram congelados e degelados por três vezes para liberação dos vírus presentes no interior das células. O sobrenadante viral foi centrifugado (3.000 ×g, 4 °C por 5 min) para a remoção dos restos celulares, aliquotado e estocado a -80 °C para posterior titulação e utilização nos ensaios de estabilidade viral.

A padronização do ensaio de formação de placa de lise para a titulação do estoque de RVA-Teq e ensaio de viabilidade foi baseada no trabalho descrito por Smith et al. (1979) com algumas modificações. Resumidamente, células MA104 foram semeadas em placa de 6 cavidades na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>. A monocamada celular foi infectada com 0,45 mL das diluições seriadas na base 10 do estoque viral produzido, ou no caso dos ensaios de estabilidade viral, das amostras de água semeadas com RV, utilizando diluições não citotóxicas, em triplicata. Previamente à inoculação, os vírus presentes nas amostras foram ativados pela adição de 10 µg mL<sup>-1</sup> de tripsina (Sigma) por 30 min a 37 °C para mimetizar uma infecção *in vivo*, permitindo dessa forma, a clivagem da proteína VP4 em VP5 e VP8 possibilitando a adsorção e penetração viral na célula. Após incubação pelo período de 2 h a 37 °C para que ocorresse a adsorção viral, as células foram recobertas com uma camada de Bacto Agar 1,5% (LGC Biotecnologia, Brazil) diluído em meio DMEM 2× (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco), suplementado com 100 U mL<sup>-1</sup> penicilina G, 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, 0,025 µg mL<sup>-1</sup> de anfotericina (PSA) (Gibco); 1% de L-glutamina 2 mM; 1× aminoácidos não-essenciais e 0,1 mM de piruvato de sódio (Sigma); 100 µg mL<sup>-1</sup> de DEAE-dextrana (Sigma) e 10 µg mL<sup>-1</sup> de tripsina. As células foram incubadas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 4-5 dias e em seguida coradas com 0,4% de cristal violeta, 0,1% de fenol e 12% de etanol diluídos em água para a visualização das placas de lise formadas. A contagem das placas foi realizada macroscopicamente e expressas em Unidades Formadoras de Placas por mL (UFP mL<sup>-1</sup>). Ao final da padronização, o valor do título do estoque viral de RVA-Teq produzido foi de  $2,2 \times 10^7$  UFP mL<sup>-1</sup>.

## 2.2 Limite de detecção do ensaio de formação de placa de lise

Previamente aos ensaios de estabilidade térmica do RV cepa vacinal, foram avaliados os limites de detecção da técnica nas águas selecionadas para avaliação da estabilidade viral.

As amostras de água foram semeadas com uma quantidade conhecida do estoque viral de RVA-Teq, utilizando diluições não citotóxicas em base 10 ( $10^{-3}$  até  $10^{-6}$ ) em meio MEM e em triplicata conforme descrito no item 2.1. Ao final do período de incubação (4-5 dias) as células foram coradas e o valores dos limites de detecção expressos em valores de UFP mL<sup>-1</sup>.

## 2.3 Desenho experimental dos estudos de estabilidade do RVA-Teq

Foram selecionadas três diferentes fontes de água de superfície para a avaliação da estabilidade do RVA-Teq: água de superfície da Lagoa do Peri (LP), água de consumo não clorada (AC) e água da Lagoa da Conceição (LC) (salobra).

Um litro das amostras de água foram coletados em garrafas estéreis de polipropileno e transportadas para o laboratório em gelo e sob o abrigo da luz. No local da coleta foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura (°C), pH, turbidez, salinidade, oxigênio dissolvido e condutividade utilizando sonda multiparâmetros YSI-85 (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA) apresentados aqui na Tabela 6.

**Tabela 6** - Parâmetros físico-químicos das amostras de água

Parâmetro	Amostras de água		
	LP	LC	AC
Temperatura da água (°C)	25	23	25,3
pH	6,09	7,7	6,9
Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	ND	7,9	7,53
Salinidade (ppm)	-	24	-
Turbidez (NTU)	5,6	ND	1,52
Condutividade (µS cm <sup>-1</sup> )	67,2	ND	53

**Legenda:** LP: Lagoa do Peri; LC: Lagoa da Conceição; AC: Água de Consumo

No laboratório as amostras de água foram semeadas com RVA-Teq na concentração de  $2,2 \times 10^7$  UFP mL<sup>-1</sup>. Esta concentração viral foi determinada objetivando a avaliação de até 99,99% ( $4\text{-log}_{10}$ ) de redução no título viral ao longo dos experimentos de estabilidade. Após a

semeadura, as amostras foram aliquotadas em tubos de 1 mL e estocadas a temperaturas de 22 e 4 °C e sob o abrigo da luz, simulando dessa forma temperaturas do ambiente e de estocagem, respectivamente.

É importante salientar que as amostras não foram previamente esterilizadas, mantendo sua composição original. A infecciosidade do RVA-Teq foi avaliada pelo ensaio de formação de placa de lise e a estabilidade do genoma por RT-qPCR, nos tempos de 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 dias.

#### **2.4 Extração do RNA e RT-qPCR**

Um volume de 200 µL de um *pool* de cada uma das matrizes aquáticas estocadas foi utilizado para a extração do RNA do RV utilizando o kit comercial RNeasy-MinElute Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

A quantificação dos genomas do RV foi realizada em equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com o protocolo descrito por Zeng et al. (2008) com algumas modificações. Para diminuir a influência da presença de inibidores das reações enzimáticas, naturalmente presentes nas amostras, o RNA extraído foi diluído na base 10 ( $10^{-1}$ ) para as amostras da Lagoa do Peri e água de consumo e  $10^{-2}$  para as amostras da Lagoa da Conceição antes da reação de RT-qPCR. As amostras foram analisadas em duplicata com a adição de controles positivos e negativos em cada reação. A reação de RT-qPCR consistiu de 10 µL de RNA adicionados à 12,5 µL de  $2 \times$  Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen), 0,25 µL da sonda TaqMan NSP3 (1 µM) e 0,25 µL dos iniciadores NSP3F e NSP3R (1 µM) (Quadro 5). Os iniciadores e sonda utilizados foram direcionados para uma região específica do genoma que codifica a proteína não-estrutural NSP3.

A sequência gênica correspondente ao gene NSP3 foi previamente clonada em plasmídeo pGEN-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) e quantificada utilizando o protocolo descrito acima para a construção de curva padrão. Esse padrão, em diluições e quantidades conhecidas, foi usado em todas as reações realizadas. Os valores de cópias genômicas de RV foram expressos como cópias genômicas por mL ( $\text{CG mL}^{-1}$ ).



**Quadro 5** - Iniciadores e sonda utilizados na reação de RT-qPCR para o RVA-Teq

Iniciadores e sonda	Sequência 5' - 3'	Referência
NSP3-F NSP3-R	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG GGTCACATAACGCCCTATAGC	Zeng, et al., 2008
Sonda NSP3	FAM- AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAAMGB -MGBNFQ	

### 2.5 Análise dos dados

O decaimento da concentração do RVA-Teq ao longo do período avaliado foi determinado comparando os valores título do viral obtido em cada tempo de análise ( $N_t$ ) (dias de estocagem) dividido pela concentração viral no tempo zero, logo depois da semeadura ( $N_0$ ) utilizando a fórmula  $[\log_{10}(N_t/N_0)]$ .

Análise de variância (ANOVA) foi realizada para comparar os valor de redução obtidos nos diferentes tempos e temperaturas de estocagem, seguindo por teste t Bonferroni, quando necessário.

O modelo de regressão linear foi utilizado para obter uma correlação entre o decaimento viral em relação ao tempo ( $R^2$ ), sendo os valores do coeficiente de inativação ( $-k$ ) obtidos pelo *slope* fornecido pela equação da reta, permitindo desta forma, o cálculo dos valores de  $T_{90}$  que correspondem ao tempo necessário para o decaimento de 1  $\log_{10}$ . Os gráficos e análises estatísticas foram realizadas em *software* GraphPad PRISM 5.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) considerando valores de significância de 95%.

## 3 Resultados

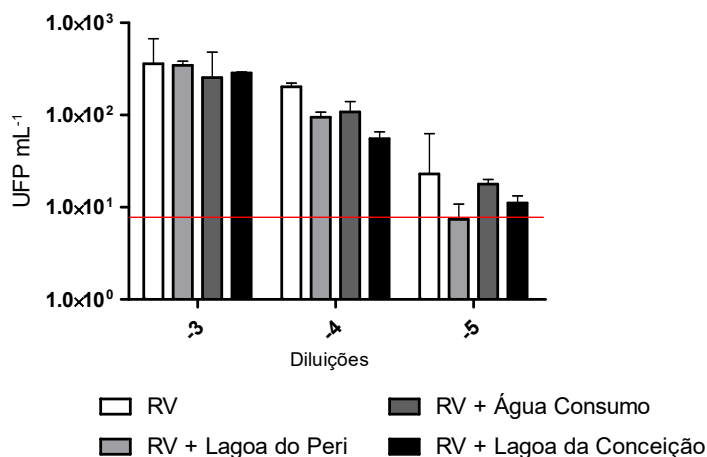
### 3.1 Limite de detecção do ensaio de placa de lise

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos para o limite de detecção do método de placa de lise para o RVA-Teq nas diferentes águas selecionadas para os estudos de estabilidade térmica e temporal.

De maneira geral não houve interferência da composição das águas na detecção do RV quando se compararam os resultados obtidos com o vírus diluído apenas em meio MEM ( $p > 0,05$ ). Foram obtidos os seguintes valores de limite de detecção expressos em UFP  $\text{mL}^{-1}$ : RVA-Teq diluído em MEM ( $6,89 \times 10^1$ ), RV em água da Lagoa do Peri

(7,41), RV em água da Lagoa da Conceição ( $1,11 \times 10^1$ ) e RV em água de consumo ( $1,78 \times 10^1$ ). Os valores de correlação linear entre as diluições utilizadas e os valores de limite de detecção obtidos foram em ordem decrescente: RV diluído em MEM ( $R^2 = 0,96$ ), seguido do RV em água da Lagoa do Peri e de consumo ( $R^2 = 0,92$ ) e RV em água da Lagoa da Conceição ( $R^2 = 0,86$ ).

**Figura 14** - Limite de detecção do RVA-Teq em diferentes águas por meio da técnica de placa de lise.



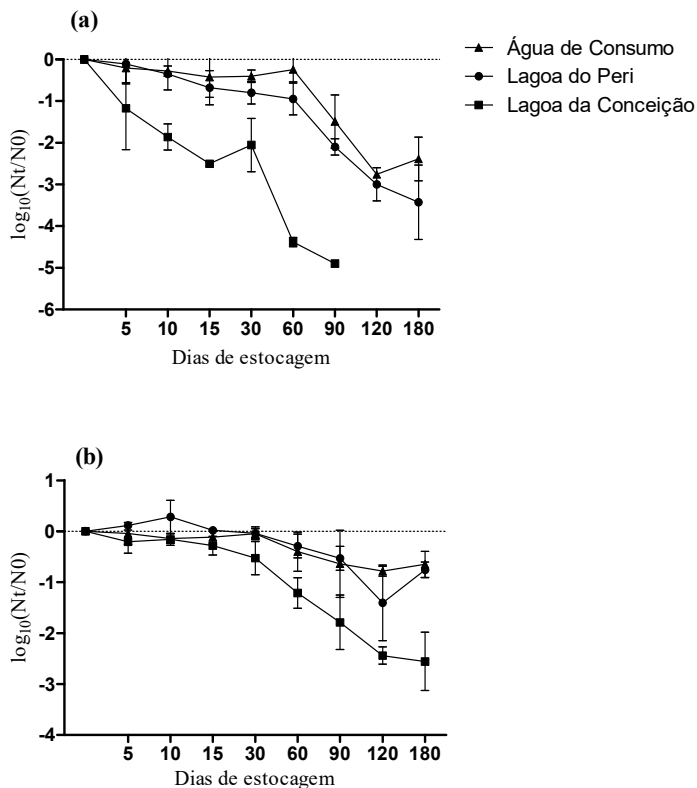
### 3.2 Estabilidade do RVA-Teq pelo ensaio de placa de lise

A estabilidade da cepa vacinal do rotavírus foi avaliada em três diferentes tipos de água de superfície sob as temperaturas de estocagem de 22 e 4 °C. A redução da infecciosidade viral ( $\log_{10}$ ) avaliada por placa de lise está apresentada nas Figuras 15a e b, respectivamente para 22 e 4 °C. Quando estocadas a 22 °C as amostras de água da Lagoa do Peri (LP) e água de consumo não clorada (AC) demonstraram padrão de decaimento viral similar, com baixos valores de redução nos primeiros 60 dias de estocagem. A partir de 90 dias de estocagem até o final do período analisado foram observados os maiores valores de decaimento viral, totalizando, ao final de 180 dias de estocagem, valores de redução de 3,42 e 2,38  $\log_{10}$  respectivamente para RVA-Teq semeado na LP e AC. A amostra de RVA-Teq semeada na Lagoa da Conceição (LC)

apresentou valores de decaimento maiores,  $1,17 \log_{10}$  já no primeiro período avaliado (5 dias), seguido por um decaimento constante até 90 dias pós estocagem, onde não foi mais possível a detecção de vírus infecciosos pelo ensaio de placa de lise, totalizando valores de redução de  $4,89 \log_{10}$  (Figura 15a).

Quando estocado a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  o RVA-Teq semeado apresentou baixo decaimento viral nos primeiros 30 dias de estocagem e nos três diferentes tipos de água (menos de  $1 \log_{10}$ ). A partir deste período, as amostras LP e AC mantiveram baixo decaimento totalizando, ao final de 180 dias de estocagem, valores de redução de  $0,75$  e  $0,64 \log_{10}$ , respectivamente. Assim como quando estocadas a  $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , as amostras LC demonstraram um decaimento linear mais pronunciado a partir dos 30 dias de estocagem ( $R^2 = 0.87$ ) com valores de redução de título viral de  $2,35 \log_{10}$  ao final de 180 dias de estocagem (Figura 15b).

**Figura 15** - Redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do RVA-Teq em diferentes amostras de água avaliadas por ensaio de placa de lise por um período de 180 dias. **a)** temperatura de estocagem de 22 °C; **b)** temperatura de estocagem de 4 °C. Cada ponto da curva refere-se à média de três experimentos independentes.



Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando se compararam os valores de redução logarítmica obtidos para as matrizes LP e AC estocadas tanto a 22 quanto a 4 °C. Por outro lado, os valores de redução obtidos para as amostras LC foram estatisticamente diferentes em relação às outras duas águas, sendo que a 22 °C essas diferenças foram observadas a partir do décimo dia de

estocagem, com diferenças maiores obtidas entre o período de 60 e 90 dias de estocagem, entre as amostras AC e LC ( $p < 0.001$ ).

**Tabela 7** -  $T_{90}$  e taxas de inativação ( $k$ ) referentes a infecciosidade do RVA-Teq obtidos pelo modelo de regressão linear em amostras de água estocadas a 22 e 4 °C avaliadas por placa de lise.

Placa de Lise						
Água	Temp (°C)	Valor de p	$R^2$	Taxa de inativação ( $k$ )	$T_{90}$ (dias)	Intervalo de confiança 95% (dias)
LP	22	$< 10^{-4}$	0,91	-0,0181	55,15	(43,1 - 76,4)
	4	0,0022	0,76	-0,0064	154,9	(103,1 - 310,8)
LC	22	0,0015	0,88	-0,0538	18,58	(13,1 - 31,5)
	4	0,0002	0,87	-0,0146	68,09	(51,1 - 101,7)
AC	22	0,0002	0,87	-0,0168	59,36	(44,4 - 89,3)
	4	0,0007	0,82	-0,0041	240,3	(170,7 - 405,1)

Legenda: LP: Lagoa do Peri; LC: Lagoa da Conceição; AC: Água de Consumo

Os valores de decaimento da infecciosidade de RVA-Teq ( $\log_{10}$ ) obtidos foram analisados pelo modelo de regressão linear para estimar o  $T_{90}$  (tempo necessário para o decaimento de 1  $\log_{10}$ ) baseando-se nos valores do *slope* fornecidos pela equação da reta do modelo linear. Os valores de correlação linear ( $R^2$ ), taxa de inativação  $k$  (*slope*) e  $T_{90}$  são apresentados na Tabela 7.

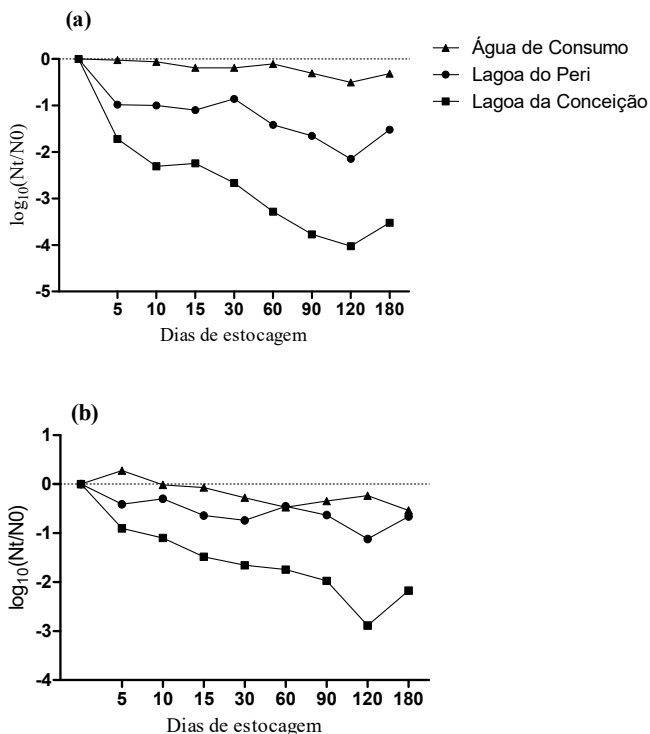
Em ambas as temperaturas de estocagem analisadas, as amostras LC demonstraram os menores valores de  $T_{90}$ , ou seja, menor tempo em dias para o decaimento de 1  $\log_{10}$ , seguido pelas amostras LP e AC. Como esperado, as amostras estocadas a 22 °C apresentaram os menores valores de  $T_{90}$ , 18, 55 e 59 dias, respectivamente para as matrizes LC, LP e AC. A 4 °C os valores de  $T_{90}$  foram de 68, 155 e 240 dias para LC, LP e AC respectivamente.

### ***3.3 Estabilidade do genoma do RVA-Teq***

As Figuras 16a e b apresentam, respectivamente, os valores de redução logarítmica obtidos na avaliação da estabilidade do genoma do RVA-Teq nas diferentes águas quando estocadas a 22 e 4 °C e avaliadas por RT-qPCR.

Assim como nos resultados de decaimento da infecciosidade viral, a estabilidade do genoma do RV foi mais afetada nas amostras da Lagoa da Conceição (LC), onde em ambas as temperaturas de estocagem (22 e 4 °C) foram observados os maiores valores de redução logarítmica, desde o primeiro dia de análise (5 dias) apresentando, ao final de 180 dias, os valores de  $\log_{10}$  de 3,5 a 22 °C e 2,17 a 4 °C. As amostras de água de consumo (AC) apresentaram os valores mais baixos referentes à redução da estabilidade genômica, sendo estes 0,31 e 0,53  $\log_{10}$  nas temperaturas de 22 e 4 °C, respectivamente ao final de 180 dias de estocagem. As amostras da Lagoa do Peri (LP) apresentaram valores de redução logarítmica de 1,51  $\log_{10}$  a 22 °C e 0,66  $\log_{10}$  a 4 °C ( $P > 0.05$ ) (Figuras 16a e b).

**Figura 16** - Redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) do genoma do RVA-Teq em diferentes amostras de água avaliada por RT-qPCR por um período de 180 dias. **a)** temperatura de estocagem de 22 °C; **b)** temperatura de estocagem de 4 °C. Cada ponto da curva refere-se a um experimento.



Os valores de decaimento do RVA-Teq foram estatisticamente significativos quando se compararam os valores obtidos nas amostras de água da Lagoa da Conceição (LC) *versus* Água de Consumo (AC), em ambas as temperaturas de estocagem ( $p < 0.001$ ) e entre as amostras LC *versus* LP (Lagoa do Peri) na temperatura de estocagem de 4 °C entre os períodos de 60 a 180 dias de análise ( $p < 0.001$ ).

Os valores de  $T_{90}$  estimados pelo modelo de regressão linear para as análises de estabilidade genômica do RVA-Teq são apresentados na Tabela 8. As amostras AC apresentaram os maiores valores de  $T_{90}$ , 461 e 317 dias respectivamente para as temperaturas de 22 e 4 °C. Os valores de  $T_{90}$  para as amostras LP foram 142 dias quando estocadas a 22 °C e 96 dias para as amostras LC quando estocadas a 4

°C. Não foi possível estimar os valores de  $T_{90}$  referentes às temperaturas de 4 °C para as amostras LP e a 22 °C para as amostras LC devido ao baixo valor de coeficiente de regressão linear obtido, bem como aos valores de *slope* não terem sido estatisticamente significativos.

**Tabela 8** -  $T_{90}$  e taxas de inativação ( $k$ ) do genoma do RVA-Teq obtidos pelo modelo de regressão linear em amostras de água estocadas a 22 e 4 °C e avaliadas por RT-qPCR.

RT-qPCR						
Água	Temp (°C)	Valor de p	$R^2$	Taxa de inativação ( $k$ )	$T_{90}$ (dias)	Intervalo de confiança 95% (dias)
LP	22	0,0270	0,52	-0,0070	142,1	(76,86 - 938,96)
	4			NS*		
LC	22			NS*		
	4	0,0135	0,60	-0,0103	96,82	(56,27 - 346,62)
AC	22	0,0086	0,65	-0,0021	461,1	(278,62 - 1136,36)
	4	0,0174	0,57	-0,0041	317,4	(179,85 - 1343)

**Legenda:** LP: Lagoa do Peri; LC: Lagoa da Conceição; AC: Água de Consumo

\* Valores de  $k$  não estatisticamente significativos



## 4 Discussão

Embora a presença de rotavírus já tenha sido detectada em diferentes tipos de matrizes ambientais, como águas residuais e de superfície, existem poucos trabalhos avaliando a infecciosidade deste patógeno, principalmente devido a dificuldade em se cultivar cepas selvagens *in vitro* (RODRÍGUEZ-DÍAZ et al. 2009; FONGARO et al. 2012; BARRIL et al. 2015). Muitos trabalhos utilizam a cepa símia (SA11) ou outras cepas derivadas de animais como modelos virais em substituição às cepas humanas, possibilitando desta forma a condução de estudos de estabilidade em amostras clínicas como fezes, fômites e até mesmo amostras ambientais (HURST, GERBA 1980; MENG et al. 1987; ESPINOSA et al. 2008; ROMERO et al. 2011). Entretanto, atualmente existem poucos estudos avaliando a estabilidade térmica do RV em matrizes aquáticas.

De nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a avaliar a estabilidade térmica de uma cepa vacinal de RV (RVA-Teq) em matrizes aquáticas, contribuindo para o entendimento de como esta cepa vacinal de caráter atenuado persiste em temperaturas ambientais (22°C), mimetizando o vírus liberado nas fezes para o meio ambiente aquático e de estocagem em laboratório (4°C), mimetizando tanto a estocagem da vacina em postos de saúde, quanto a forma de estocagem de amostras de água para pesquisa de rotavírus. Além disso, o método de avaliação da infecciosidade por placa de lise padronizado no presente trabalho mostrou-se eficaz e reprodutível para futuros estudos de avaliação da estabilidade e inativação viral, permitindo a detecção de até 7,41 UFP mL<sup>-1</sup> como limite de detecção.

O impacto da temperatura na inativação e sobrevivência de vírus entéricos tem sido demonstrado em diferentes estudos e amostras (DE RODA HUSMAN et al. 2009; RIGOTTO et al. 2011; CARRATALÀ et al. 2013b). De maneira geral, os resultados obtidos no presente capítulo, demonstraram que, quando estocados a temperatura de 22 °C, o RVA-Teq mostrou-se menos estável do que na temperatura de 4 °C. Meng et al. (1987) avaliando a estabilidade do RV símio SA11 e uma cepa humana isolada de fezes, demonstraram que havia uma redução nos valores dos títulos virais quando estas cepas estavam estocadas a temperatura de 20 ou 4 °C, sendo a cepa SA11 mais estável em ambas as temperaturas, enquanto que a cepa humana decaiu 1 log<sub>10</sub> a 20 °C dentro do período de 14 dias de estocagem. No presente trabalho, a cepa vacinal RVA-Teq apresentou maior estabilidade,

necessitando de 18, 55 e 59 dias para o decaimento de 1  $\log_{10}$  quando semeada respectivamente nas amostras da Lagoa da Conceição (LC), Lagoa do Peri (LP) e Água de Consumo (AC) em temperatura de 22 °C e avaliado por placa de lise.

As amostras LC apresentaram os valores mais baixos referentes ao  $T_{90}$ , variando entre 18 e 96 dias, (tempo estimado para o decaimento de 1  $\log_{10}$ ) em ambas as temperaturas empregadas. A presença de micro-organismos endógenos nesta matriz pode estar correlacionada com uma maior perda da infecciosidade viral pela ação virucida destes patógenos, sendo esta ação demonstrada em outros estudos onde foram avaliadas a estabilidade de diferentes vírus entéricos em diferentes matrizes (O'BRIEN, NEWMAN 1977; RAPHAEL et al. 1985; WARD et al. 1986). Apesar da presença da contaminação por outros micro-organismos não ter sido avaliada no presente estudo, um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa demonstrou a presença de coliformes fecais (*E. coli*) neste ambiente aquático (Lagoa da Conceição) pelo período de um ano, sendo a prática de atividades de recreação nesta área constantemente contra-indiciada pelas autoridades públicas, principalmente durante o período de verão (MORESCO et al. 2012).

Considerando as características físico-químicas das amostras de água (Tabela 6), a salinidade das amostras da Lagoa da Conceição pode ter influenciado em uma maior perda da viabilidade viral. Wetz et al. (2004) verificaram que a infecciosidade do poliovírus era rapidamente reduzida pela presença dos sais em amostras de água do mar bruta quando mantidas em temperaturas de 22 e 30 °C. Diferentemente, Hurst, Gerba (1980) avaliando a estabilidade do RV SA11 e enterovírus em diferentes fontes de águas estuarinas e em águas de superfície consideradas poluídas ou não poluídas e mantidas a 20 °C, demonstraram altas reduções nos valores do título viral nas águas de estuário em comparação com as amostras de água de superfície (manancial). Entretanto, este decaimento não foi diretamente relacionado com a concentração de sais, sendo que a taxa de inativação do RV SA11 foi similar aos demais enterovírus avaliados, sendo necessário, para o decaimento de 3  $\log_{10}$  (99,9%), 2 a 3 dias em águas estuarinas e 3 a 14 dias em águas de superfície. No presente capítulo, as amostras provenientes da Lagoa da Conceição (água salobra) apresentaram valores de salinidade de 24 ppm (Tabela 6) sendo também observados os maiores valores de redução viral ( $\log_{10}$ ) quando comparados às amostras de água de manancial e de consumo.

Raphael et al. (1985), avaliaram a estabilidade térmica do RV humano (cepa Wa) em amostras de água de consumo, água de rio filtrada e não filtrada estocadas a 20 e 4 °C pelo período de 64 dias demonstraram diferenças, de acordo com a fonte da amostra de água, nos valores de  $T_{99}$ , ou seja, tempo estimado para o decaimento de 2  $\log_{10}$ . As amostras de água de consumo e de rio filtrada necessitaram de mais de 64 dias para o decaimento de 2  $\log_{10}$  em ambas as temperaturas, já as amostras de água de rio não filtradas, decaíram 2  $\log_{10}$  em 10 e 32 dias respectivamente nas temperaturas de 20 e 4 °C. Deste modo, a elevada estabilidade térmica do RV cepa vacinal observada no presente estudo, em relação ao tempo necessário para o decaimento de 1  $\log_{10}$  ( $T_{90}$ ), pode ser explicado devido às diferenças na composição de cada matriz aquática avaliada (presença de matéria orgânica, parâmetros físico-químicos), além cepa viral utilizada e dos métodos de detecção empregados.

Em relação à estabilidade térmica da partícula viral em comparação com a estabilidade do genoma, Espinosa et al. (2008) avaliando rotavírus Rhesus em amostras de água subterrânea e água de superfície, esta última, considerada contaminada, demonstraram que a infecciosidade em água de superfície decaía mais rapidamente em comparação a redução da infecciosidade em água subterrânea, sendo o rotavírus mais resistente em comparação com o astrovírus, vírus também de genoma RNA, porém de fita simples. Nesse mesmo trabalho, os resultados obtidos para a estabilidade do genoma, avaliada por RT-qPCR, apresentaram considerável decaimento mesmo em amostras de água subterrânea. A redução na estabilidade do genoma observada no presente trabalho, principalmente para as amostras consideradas mais contaminadas, ou seja, Lagoa da Conceição e do Peri indica a possibilidade de que nessas amostras de água, além da influencia da temperatura, possa existir também a interferência de outros micro-organismos predadores. Esses afetariam, em um primeiro momento, a estabilidade da partícula viral e em um segundo momento a estabilidade do genoma, levando a um decaimento no número de cópias genômicas detectados. Corroborando com esse fato, está o baixo valor de redução ( $\log_{10}$ ) apresentado pelas amostras de água de consumo (sabidamente menos contaminadas por outros micro-organismos) onde, além de baixos valores de redução na infecciosidade da partícula, também foram observados baixos valores no decaimento do número de cópias do genoma.

Sabe-se que no meio ambiente aquático os vírus estão sujeitos a diversos fatores, além da temperatura, que podem contribuir para sua inativação, como a incidência de luz solar, umidade relativa e variação de pH. Fisher et al. (2002), analisaram a estabilidade de uma cepa de RV isolada de fezes e demonstraram que o vírus permanece potencialmente infeccioso por até 2,5 meses em temperatura ambiente acima dos 30 °C. Outro estudo demonstrou que independentemente da umidade relativa do ambiente, uma cepa humana de RV manteve-se mais estável em amostras de fezes estocadas a 4 °C quando comparada com a temperatura de 22 °C (MOE, SHIRLEY 1982).

Em resumo, os resultados descritos no presente capítulo mostraram a elevada estabilidade térmica da cepa vacinal do RV (RotaTeq), tanto em relação a estabilidade da infecciosidade da partícula viral como da estabilidade do genoma em todas as matrizes aquáticas avaliadas, destacando o maior decaimento nas amostras de água da Lagoa da Conceição e Lagoa do Peri. O efeito da temperatura na perda na viabilidade viral ficou evidente devido às diferenças nos valores de redução logarítmica obtidos nas duas temperaturas de estocagem avaliadas 22 e 4 °C. Para as amostras de água da Lagoa da Conceição (água salobra), a possível presença de micro-organismos predadores endógenos, bem como os níveis de salinidade podem ter atuado em sinergismo com a ação da temperatura, promovendo um maior decaimento viral nestas amostras. Ainda vale ressaltar que a utilização da cepa vacinal RVA-Teq, mostrou-se excelente por contribuir com dados sobre a estabilidade e conservação da vacina.

Em conclusão, a elevada estabilidade de partículas infecciosas do RVA-Teq avaliada no presente estudo indica a potencial transmissão horizontal desta vacina atenuada pelo ambiente aquático (recreacional e água de consumo) possibilitando a ocorrência de imunização indireta. Entretanto, devido ao modo de transmissão e da evidência da excreção da cepa vacinal por crianças imunizadas, o monitoramento da presença de cepas vacinais e de possíveis rearranjos gênicos entre as cepas selvagens e vacinais devem ser levados em consideração para garantir a segurança das vacinas disponíveis e na avaliação da circulação de novos genótipos, auxiliando futuros estudos epidemiológicos.

## *Capítulo IV*

### **Desenho e padronização de sonda tipo *Molecular Beacon* para a detecção de adenovírus humanos infecciosos**

Os resultados apresentados no presente capítulo foram obtidos durante estágio no exterior (doutorado sanduíche) realizado durante o período de Julho de 2014 a Junho de 2015 no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade da Califórnia, Riverside (UCR) sob co-orientação da Dra Marylynn V. Yates com concessão de bolsa PDSE/CAPES.

#### **1 Objetivo geral**

Desenhar e padronizar a detecção de adenovírus humano tipo 2 (HAdV2) utilizando sonda do tipo *Molecular Beacon* (MB).

##### **1.1 Objetivos específicos**

- Desenhar sonda molecular tipo MB específica para HAdV2;
- Padronizar a detecção de HAdV2 viáveis empregando a sonda tipo MB conjugada ao peptídeo TAT;
- Comparar os resultados de fluorescência obtidos na hibridização por MB com o ensaio de imunofluorescência indireta (IFI);

#### **2 Materiais e métodos**

##### **2.1 Desenho da sonda MB**

O desenho da sonda tipo MB foi concebido pelo alinhamento de sequências do genoma de diferentes cepas de adenovírus humanos obtidas do banco de dados do GenBank, tendo como referência o genoma do HAdV2.

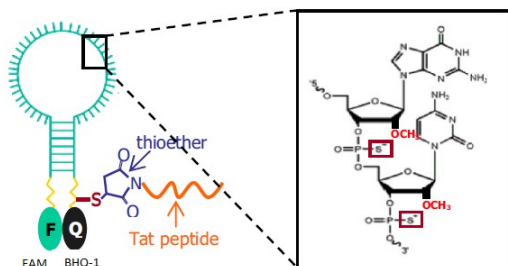
Para o estudo das propriedades termodinâmicas e predição das estruturas secundárias da sonda foram usados os programas: *UNAFold* (<https://www.idtdna.com/UNAFold>) e *mfold* (<http://unafold.rna.albany.edu/q=mfolde>) utilizando condições iônicas específicas previamente determinadas (1,380 mM de  $Mg_2^{++}$  e 70,8 mM de  $Na^+$ ), e condições intracelulares (5-20 mM de  $Mg_2^{++}$  e 15 mM de  $Na^+$ ).

A sonda AdV2-VM (5'-6-carboxyfluorescein[FAM]-CAGAUCUUGCGGGCGUAAAACUUG-thiol-6-dG-GAUCUG-BHQ-1-3') (porção dos braços sublinhadas) foi desenhada para hibridizar

especificamente com uma região de 18 pb (11040 a 12287 pb do genoma) que codifica a proteína de encapsidação 52K. O fluoróforo FAM possui excitação/emissão no espectro 492/517 nm e o bloqueador BHQ-1 absorve no espectro 480 e 580 nm.

Uma série de modificações (*backbones*) foram adicionadas entre os nucleotídeos que compuseram a sonda para conferir resistência à degradação por endonucleases celulares, sendo as mais importantes a adição de um grupo metil no carbono 2 da ribose ( 2'- O-metilribonucleotídeo ) e ligações fosforotioato. Adicionou-se ainda um grupo funcional tiol (SH) próximo a extremidade 3' para posterior conjugação com o resíduo aminoacídico de cisteína na região C terminal do peptídeo TAT. Isso foi responsável por formar uma ponte dissulfídica entre o peptídeo e a sonda, ligação esta que é desfeita durante a entrada da sonda na célula devido a redução que ocorre no citoplasma celular (Figura 17).

**Figura 17** - Representação esquemática da sonda MB para HAdV desenhada no presente trabalho destacando-se também as modificações realizadas a fim de conferir resitência à degradação por endonucleases celulares e adição de um grupo tiol para conjugação com o peptídeo TAT.



Fonte: adaptado de Yeh et al. 2008. **Legenda:** **F)** fluoróforo; **Q)** bloqueador (*quencher*).

## 2.2 Padronização do ensaio de hidridização molecular utilizando o peptídeo TAT

Para que fosse permitida a detecção do HAdV2 dentro da célula durante a replicação viral, a sonda AdV2-VM foi conjugada ao peptídeo

TAT (N-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Cys-C) derivado da proteína do vírus HIV-1, na proporção 1:1,5 (100  $\mu\text{M}$  cada) e mantido a temperatura ambiente por 2 h, seguido de incubação por 14-16 h a 4 °C.

O protocolo padronizado baseou-se no descrito por Gauguli et al. (2011), onde células A549 cultivadas em meio de crescimento como citado no Capítulo I foram semeadas em câmaras de 8 poços (Nunc™ Lab-Tek, Thermo Fisher Scientific Inc. USA), na densidade de  $3,0 \times 10^5$  cél  $\text{mL}^{-1}$ . Após 24 h as monocamadas celulares foram lavadas com tampão TBSS (Tris 0,05 M pH 7,4; NaCl 0,28 M; KCl 10 mM e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,82 mM) e incubadas com 100  $\mu\text{L}$  da sonda conjugada ao TAT e diluída em meio L-15  $1 \times$  (Leibovitz L-15 medium - LGC Biotecnologia), sem adição de vermelho de fenol o que evita a autofluorescência, na concentração final de 1  $\mu\text{M}$  por 30 min a 37 °C. Em seguida, as células foram novamente lavadas com TBSS e inoculadas com 100  $\mu\text{L}$  do vírus puro e nas diluições de ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) pelo período de 1 h a 37 °C para a adsorção viral. Estas concentrações equivalem a  $10^7$  (vírus puro)  $10^6$ ,  $10^5$  e  $10^4$  UFP  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Após este período, as células foram novamente lavadas com TBSS e adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de meio L-15, seguido de observação em microscópio de fluorescência (Olympus BX IT75) nos períodos de 6, 8 e 24 h pós infecção.

### ***2.3 Padronização do ensaio de hibridização por sonda MB e metodologia de fixação e permeabilização celular***

A eficiência da hibridização da sonda MB foi testada utilizando também um protocolo de fixação e permeabilização celular após infecção com o HAdV2. Baseando-se em protocolo previamente descrito por Yeh et al. (2008a), células A549 cultivadas em câmaras de 8 poços (Nunc™ Lab-Tek), na densidade de  $3,0 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  foram infectadas com 100  $\mu\text{L}$  das diluições do HAdV2 ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ) em meio L-15, em duplicata e usando como controles negativos a inoculação somente com meio L-15. Após o período de adsorção viral por 1 h a 37 °C os inóculos foram removidos e as células foram incubadas com meio L-15 pelos períodos de 6, 8 e 24 h. Ao final de cada um desses períodos, as células foram lavadas  $2 \times$  com tampão TBSS e fixadas com paraformaldeído 2% diluído em TBSS por 20 min a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas  $2 \times$  com TBSS e permeabilizadas pela adição de Triton X-100 (Sigma) 0,1% diluído em TBSS por 5 min a 4 °C. As células foram então novamente

lavadas com TBSS e 100  $\mu\text{L}$  da sonda diluída em meio L-15 (não conjugada com o peptídeo) foi adicionada na concentração final de 1  $\mu\text{M}$ , seguido de incubação por 1 h a temperatura ambiente. Ao final desse período, a sonda foi removida por lavagem das células com tampão TBSS e em seguida as células foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX IT75).

#### **2.4 Imunofluorescência Indireta**

O ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) foi realizado de acordo com o descrito por Barardi et al. (1998), com modificações. Este método consiste em utilizar células A549 permissivas ao HAdV2, cultivadas em meio de crescimento durante 24 h em câmaras de 8 poços (Nunc™ Lab-Tek), na densidade de  $3,0 \times 10^5$  cél  $\text{mL}^{-1}$ . Após atingirem confluência, as células foram infectadas com 100  $\mu\text{L}$  das diluições do HAdV2 ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ) em meio L-15 em duplicata e usando como controles negativos a inoculação somente com meio L-15. Após a incubação pelo período de 1 h para a adsorção viral, o inóculo foi removido e adicionou-se meio de manutenção consistindo de meio L-15. A infecção viral foi acompanhada durante os períodos de 6, 8 e 24 h para fazer um comparativo com os períodos de observação da metodologia utilizada com a sonda MB, onde em cada um desses períodos, as células foram lavadas  $2 \times$  com solução salina (PBS) e fixadas com metanol gelado a  $-20^\circ\text{C}$  duas vezes por cinco minutos para que a replicação viral fosse interrompida.

Após o último período de incubação (24 h), as células foram rehidratadas pela adição de 300  $\mu\text{L}$  de PBS e mantidas a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, removeu-se o PBS e adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de uma solução bloqueadora (PBS com 1% BSA e 0,05%, Tween-20) a fim de inibir reações inespecíficas quando incubadas com o anticorpo. Esta incubação foi mantida por 30 minutos em temperatura ambiente (TA) sob agitação. Para visualização da infecção provocada pelos vírus nas células, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do anticorpo monoclonal MAb8052 (Millipore) na diluição 1:200 em solução bloqueadora e incubados por 1 h a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação. As células foram lavadas 3 vezes com 300  $\mu\text{L}$  da solução bloqueadora por 5 min sob agitação e incubadas por 15 min em TA, no escuro e sob agitação com anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) diluído 1:100 em solução bloqueadora. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes com solução bloqueadora, secas à



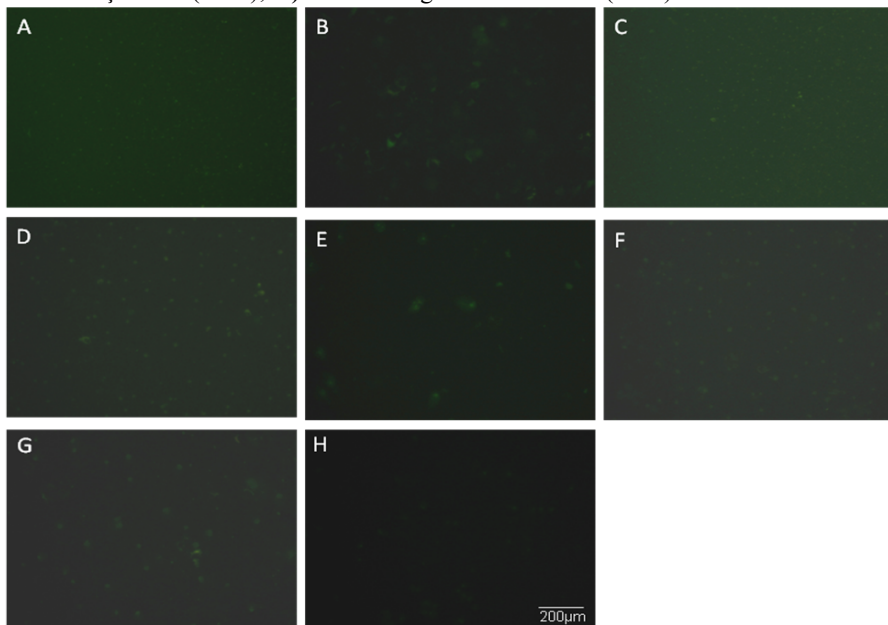
temperatura ambiente e montadas em solução de montagem [formalina 5%, NaCl 0,25M, DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano), pH 8,6, 2,5%]. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus BX IT75).

### 3 Resultados

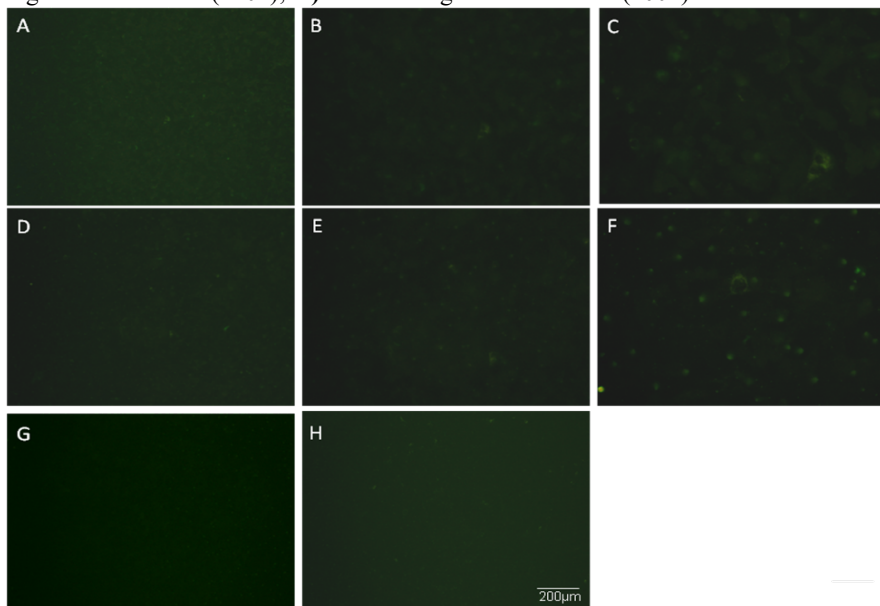
#### *3.1 Padronização da técnica de hibridização utilizando sonda MB conjugada ao peptídeo TAT*

A sonda MB específica para a detecção de HAdV2 desenhada no presente capítulo foi padronizada utilizando a metodologia de conjugação ao peptídeo TAT para que a sonda fosse liberada no interior celular podendo dessa forma detectar a replicação do HAdV2 em tempo real. O vírus puro e diluído nas concentrações de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  foi inoculado em células A549, permissivas à replicação pelo adenovírus, e a partir do tempo de 6 h pós infecção (p.i.) pode-se observar o início do aparecimento de células fluorescentes indicando a replicação viral sendo esta fluorescência mais intensa onde o vírus estava mais concentrado (puro e diluição  $10^{-1}$ ) (Figura 18). Já na maior diluição testada ( $10^{-3}$ ) a fluorescência obtida foi muito fraca e não foi, dessa forma, apresentada na Figura 18. Após 8 h de infecção, pode-se perceber um incremento na fluorescência observada em relação ao tempo de 6 h e também um maior número de células fluorescentes onde a concentração de vírus era maior (vírus puro e  $10^{-1}$ ) (Figura 19). Entretanto, nas demais diluições usadas, ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) a presença de células fluorescentes foi quase imperceptível (dados não mostrados).

**Figura 18** - Progressão da infecção do HAdV2 utilizando a sonda MB conjugada com o peptídeo TAT pelo período de 6 h pós infecção (p.i.). **A)** vírus puro, aumento 100x; **B)** vírus puro (400x); **C)** vírus diluição  $10^{-1}$  (100x); **D)** vírus diluição  $10^{-1}$  (200x); **E)** vírus diluição  $10^{-1}$  (400x); **F)** vírus diluição  $10^{-2}$  (200x); **G)** vírus diluição  $10^{-2}$  (400x); **H)** controle negativo com sonda (100x).

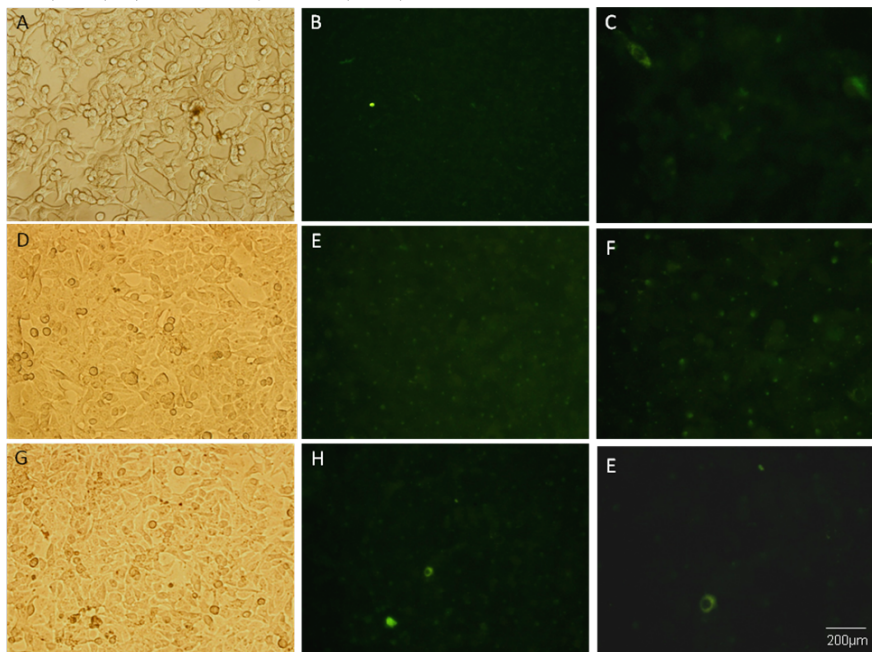


**Figura 19** - Progressão da infecção do HAdV2 utilizando a sonda MB conjugada com o peptídeo TAT pelo período de 8 h pós infecção (p.i.). **A)** vírus puro, aumento 100x; **B)** vírus puro (200x); **C)** vírus puro (400x); **D)** vírus diluição  $10^{-1}$  (100x); **E)** vírus diluição  $10^{-1}$  (200x); **F)** vírus diluição  $10^{-1}$  (400x); **G)** controle negativo com sonda (110x); **H)** controle negativo sem sonda (100x).



A presença de HAdV2 infecciosos avaliada pela técnica utilizando sonda MB conjugada ao peptídeo TAT foi avaliada pelo período máximo de 24 h p.i. para que se pudesse fazer um comparativo com os resultados obtidos pelo método de IFI (Figura 20). Na maior concentração viral (vírus puro) observou-se a presença de um número menor de células fluorescentes em relação ao tempo de 6 e 8 h p.i. na mesma concentração viral. Isto provavelmente deveu-se à lise celular (efeito citopático-ECP) ocasionada pela intensa replicação viral ao final do período de 24 h (Figura 20a). Já para as demais diluições utilizadas, percebeu-se um incremento no número de células fluorescentes, sem a observação de efeito citopático.

**Figura 20** - Progressão da infecção do HAdV2 utilizando a sonda MB conjugada com o peptídeo TAT pelo período de 24 h pós infecção (p.i.). **A)** vírus puro, campo claro, aumento 200x; **B)** vírus puro (200x); **C)** vírus puro (400x); **D)** vírus diluição  $10^{-1}$ , campo claro, aumento 200x; **E)** vírus diluição  $10^{-1}$  (200x); **F)** vírus diluição  $10^{-1}$  (400x); **G)** vírus diluição  $10^{-2}$ , campo claro, aumento 200x; **H)** vírus diluição  $10^{-2}$  (200x); **I)** vírus diluição  $10^{-2}$  (400x).



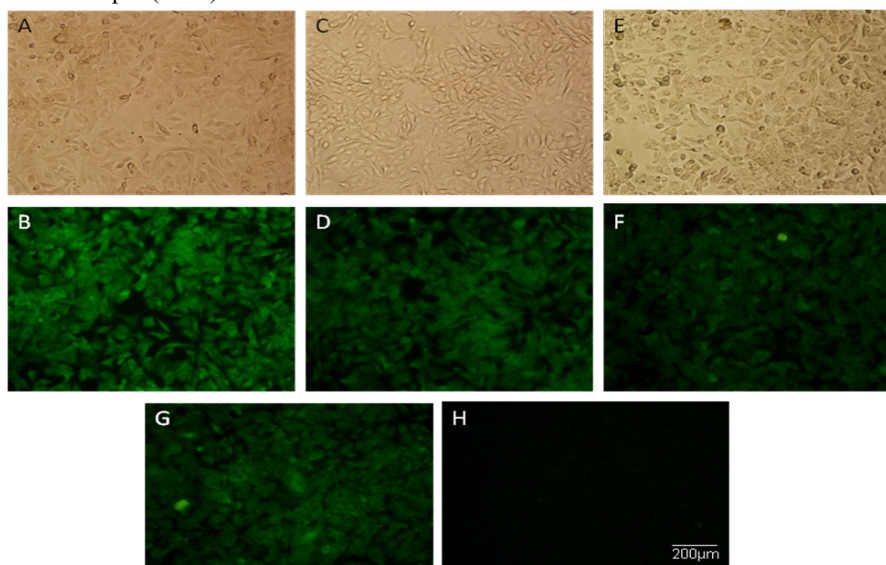
### ***3.2 Padronização da técnica de hibridização por sonda MB pelo método de fixação e permeabilização celular***

A sonda MB foi também testada utilizando o método de fixação e permeabilização celular, onde a replicação viral foi interrompida nos períodos de 6, 8 e 24 h pós infecção (Figura 21).

Como ocorrido anteriormente, pode-se verificar o aparecimento de ECP no período de 24 h p.i. (Figuras 21e), entretanto não houve distinção entre a quantidade de fluorescência emitida em relação ao tempos pós infecção utilizando a mesma diluição viral de  $10^{-1}$ . Na maior diluição testada ( $10^{-2}$ ) também não foi observada diferença entre a quantidade de fluorescência emitida e a quantidade de vírus presente

(dados não mostrados). Diferentemente do controle celular sem a presença da sonda, que não apresentou fluorescência, o controle celular incubado com a sonda apresentou fluorescência semelhante às amostras que foram infectadas com o HAdV2 (Figura 21g e h).

**Figura 21** - Progressão da infecção do HAdV2 utilizando a sonda MB pela metodologia de fixação e permeabilização utilizando a diluição viral  $10^{-1}$ . **A)** 6 h p.i. (pós infecção) campo claro, aumento 200x; **B)** 6 h p.i. (200x); **C)** 8 h p.i. campo claro (200x); **D)** 8 h p.i. (200x); **E)** 24 h p.i. campo claro (200x); **F)** 24 h p.i. (200x); **G)** controle celular com sonda 24 h p.i. (200x); **H)** controle celular sem sonda 24h p.i. (200x).

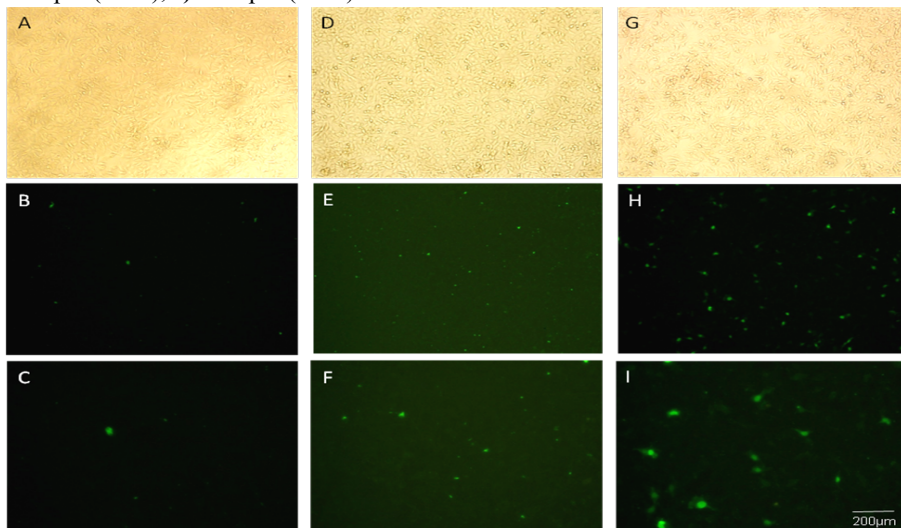


### 3.3 Uso da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) para a detecção de HAdV2

A metodologia de imunofluorescência indireta (IFI) já padronizada no Laboratório de Virologia Aplicada foi utilizada a título de comparação dos níveis de fluorescência celular pela IFI *versus* MB. Células A549 foram infectadas com a diluição viral  $10^{-1}$  e pode-se observar, como já esperado, um incremento de fluorescência ao longo dos períodos pós-infecção, concomitantemente com o aparecimento de ECP ao final do período de 24 h (Figura 22). A quantidade de fluorescência emitida pelos diferentes métodos utilizados (sonda MB e IFI) após 24 h de infecção foi semelhante, entretanto observou-se uma

maior fluorescência de fundo (*background*) nas células quando se utilizou a sonda MB. (Figuras 20 e 22).

**Figura 22** - Progressão da infecção do HAdV2 avaliado por imunofluorescência indireta (IFI) utilizando diluição viral  $10^{-1}$ . **A)** 6 h p.i. (pós infecção) campo claro, aumento 100x; **B)** 6 h p.i. (100x); **C)** 6 h p.i. (200x); **D)** 8 h p.i. campo claro (100x); **E)** 8 h p.i. (100x); **F)** 8 h p.i. (200x); **G)** 24 h p.i. campo claro (100x); **H)** 24 h p.i. (100x); **I)** 24 h p.i. (200x).



## 4 Discussão

Há um grande interesse no desenvolvimento de metodologias rápidas, eficientes e com alto limite de sensibilidade para a detecção de vírus infecciosos em amostras ambientais. Ainda mais se considerarmos que muitos dos vírus que ocasionam importantes surtos de doenças transmitidas por água e alimentos contaminados são vírus fastidiosos e que não apresentam efeito citopático durante a replicação.

A técnica de hibridização por sonda do tipo *molecular beacon* desenvolvida por Tyagi, Kramer (1996) vem sendo aplicada em diferentes estudos avaliando a infecciosidade de vírus entéricos como o vírus da hepatite A (HAV), norovírus murino (MNV-1), adenovírus (AdV), e alguns enterovírus tais como coxsackievírus, echovírus e poliovírus. Em todos os casos deve-se proceder à infecção de células permissivas utilizando metodologias de fixação e permeabilização ou sondas conjugadas à peptídeos para liberação intracelular (WANG et al. 2005; YEH et al. 2008a; YEH et al. 2008b; GAUGULI et al. 2011; DUNAMS et al. 2012; SIVARAMAN et al. 2013).

A utilização de sondas MB pelo método de fixação e permeabilização das células em um determinado tempo pós infecção tem demonstrado ser uma técnica capaz de detectar vírus viáveis que normalmente não apresentam efeito citopático e são fastidiosos em cultura de células. Wang et al. (2005) e Yeh et al. (2008a) utilizando esta metodologia conseguiram detectar o equivalente a 1 UFP (unidade formadora de placa) após 6 h de infecção para o coxsackievirus e o vírus da hepatite A (HAV), respectivamente. Entretanto, vale ressaltar que uma vez interrompida a infecção viral pela fixação da célula, não é possível o acompanhamento da replicação viral ao longo do período, requerendo vários passos para o acompanhamento da infecção (HAMZA et al. 2011).

No presente capítulo, utilizando o método de fixação e permeabilização, não foi possível distinguir a fluorescência observada entre as diluições testadas ao longo dos períodos pós-infecção avaliados. Além disso, o controle celular quando incubado com a sonda, também apresentou elevada fluorescência, denotando uma fluorescência inespecífica indesejada. A sonda utilizada no presente trabalho foi modificada pela adição de um grupamento metil na base de um dos seus nucleotídeos além de ligações do tipo fosfortiotato entre os nucleotídeos, permitindo dessa forma uma maior resistência a possíveis degradações por endonucleases quando no interior celular. Sabe-se que o processo de fixação e permeabilização pode influenciar na

estabilidade dessas ligações, contribuindo para a degradação da sonda e ocasionando resultados falso positivos (WANG et al. 2005). Por outro lado, devido ao fato de que o controle celular sem incubação com a sonda não ter apresentado fluorescência pode-se excluir possível contaminação cruzada entre as amostras (Figura 21h).

Diferentemente dos resultados observados para o método de fixação e permeabilização, os resultados obtidos quando a sonda foi conjugada ao peptídeo TAT apresentaram diferenças na emissão de fluorescência ao longo dos períodos pós-infecção. No primeiro período analisado (6 h), a emissão de fluorescência foi baixa independentemente da concentração viral utilizada, não sendo possível a observação de uma diferença entre os níveis de fluorescência entre as diferentes concentrações virais. A partir de 8 h p.i., foi observado um incremento no número de células fluorescentes e no último período analisado (24 h) observou-se a emissão de fluorescência mais aparente confirmando que a sonda é resistente às endonucleases celulares.

A baixa fluorescência observada nos primeiros períodos pós-infecção estipulados (6 e 8 h) pode estar relacionada com a sequência alvo ao qual a sonda foi desenhada (proteína de expressão tardia) sendo necessário dessa forma, um tempo maior para a detecção do RNA mensageiro. Isso também pode explicar porque somente com concentrações elevadas de HAdV2 foi possível a visualização de células fluorescentes, diferentemente de outros trabalhos que obtiveram sucesso na detecção do equivalente a apenas 1 UPF em torno de 6 h pós infecção (GAUGULI et al. 2011; DUNAMS et al. 2012).

Gauguli et al. (2011) detectaram a presença de células fluorescentes devido a replicação do MNV-1 após 6 h de infecção utilizando uma sonda MB conjugada com peptídeo TAT e adicionada previamente à infecção com o vírus. A quantificação da fluorescência observada neste período correspondia a 1 UFP sendo o tempo de detecção 12 vezes menor em relação ao ensaio de placa de lise.

Yeh et al. (2008b) detectaram o equivalente a 1 UFP do coxsackievirus B6 em apenas 2 h pós infecção incubando primeiramente as células com a sonda e realizando em seguida a infecção viral. Neste mesmo trabalho a replicação viral foi monitorada em tempo real permitindo compreender em que momento houve a infecção das primeiras células e o espalhamento da infecção pela replicação intracelular da progênie viral.



Em um ensaio multiplex, utilizando a mesma linhagem celular para a detecção de adenovírus tipo 2 e echovírus tipo 17 utilizando duas sondas marcadas com diferentes fluoróforos, Dunams et al. (2012) observaram a detecção do equivalente a 1 UFP após 5 e 7 h pós infecção para o echovírus e adenovírus respectivamente, sendo que, para a metodologia de placa de lise, seriam necessários os tempos de 48 e 168 h respectivamente. Este trabalho denota a importância de sondas extremamente específicas para que não ocorram resultados falso positivos. A sonda desenhada para a detecção do HAdV2 citada nesse trabalho corresponde a uma região complementar ao gene EA1, gene este transcrito precocemente durante a replicação viral. A sonda desenhada no presente trabalho corresponde a região que codifica para a proteína de encapsulamento 52K, expressa de forma tardia, explicando, dessa forma, a necessidade de um tempo maior para a detecção, mesmo em concentrações elevadas do vírus.

As diferenças observadas entre os tempos de detecção de vírus de genoma RNA (echovírus, MNV-1 e PVI, por exemplo) em relação ao vírus de genoma DNA dupla fita, como é o caso do HAdV2, podem ser explicadas pelos diferentes locais na célula onde ocorre a replicação viral. Enquanto o desnudamento dos vírus de genoma RNA de senso positivo ocorre no citoplasma estando a fita de RNA já disponível para a tradução/replicação, vírus como o HAdV necessitam percorrer um caminho maior, até o núcleo, para que ocorra o desnudamento e início do processo de replicação (DUNAMS et al. 2012).

Outro trabalho também utilizando a conjugação da sonda ao TAT descreveu o aparecimento dos primeiros sinais de fluorescência indicando a replicação do poliovírus tipo 1 (PV1) apenas 30 s após a incubação com a sonda (SIVARAMAN et al. 2013). Contudo, vale ressaltar que neste estudo, as células foram primeiramente infectadas com o PV1 e somente após 18 h de infecção a sonda foi adicionada, permitindo a detecção quase imediata de células fluorescentes.

A rápida internalização da sonda quando conjugada ao TAT já foi demonstrada em diversos estudos, onde 30 min de incubação mostraram-se suficientes para a entrada da sonda na célula permitindo dessa forma a detecção de sinais fluorescentes após a entrada e transcrição dos primeiros RNAs virais (YEH et al. 2008b; GAUGULI et al. 2011).

A metodologia de IFI vem sendo utilizada na virologia ambiental para a detecção de HAdV2 viáveis em diferentes tipos de amostras, como águas de superfície, águas residuais e de lodo de

esgoto, moluscos e vegetais e apresenta certas vantagens em relação a outras técnicas de cultura celular, necessitando períodos menores de incubação quando se compara com o método de placa de lise, por exemplo (SCHLINDWEIN et al. 2010; CORRÊA et al. 2012a; CARRATALÀ et al. 2013b; RODRIGUEZ-MANZANO et al. 2014).

Calgua et al. (2011) avaliando amostras de água naturalmente ou artificialmente contaminadas por HAdV2 encontrou valores de detecção e quantificação melhores usando a metodologia de IFI e o mesmo anticorpo utilizado no presente capítulo, em comparação com metodologias como placa de lise e TCID<sub>50</sub>. Neste mesmo trabalho os autores definiram um período de 4 dias de incubação, o que foi diferente do observado nos resultados do presente capítulo, quando em apenas 6 h pós infecção já eram observados sinais de fluorescência. Entretanto deve-se determinar o tempo ideal de incubação de acordo com o tipo de amostra e se esta foi semeada artificialmente ou não com o vírus.

Ridinger et al. (1982) demonstrou que a metodologia de IFI foi mais sensível e rápida quando comparada ao ensaio de placa de lise na detecção de reovírus em amostras de águas residuais, sendo necessário um período de 10 h para a detecção viral por IFI em comparação com um período de incubação de 4 a 7 dias para a formação das placas de lise.

De maneira geral, a metodologia utilizando a sonda MB conjugada ao peptídeo TAT mostrou rapidez em detectar os primeiros sinais fluorescentes, indicando a presença de vírus viáveis. Em comparação com outras técnicas, como placa de lise, IFI e ICC-et-RT-qPCR é de mais rápida execução evitando inúmeros passos de incubação, lavagens, manipulação de ácidos nucleicos, entre outros, podendo ainda ser utilizada tanto em ensaios por microscopia como por citometria de fluxo. Vale ressaltar, entretanto que é uma técnica de difícil padronização e que a síntese da sonda, somada às marcações com fluoróforos e modificações é ainda bastante dispendiosa.

Como perspectivas para o refinamento da padronização desta técnica, estão a validação da metodologia pela incubação da sonda com sequência de oligonucleotídeo complementar, quantificação do número de células fluorescentes e correlação com a quantificação pela técnica de placa de lise, além de aprimorar as imagens fornecidas pelo *software* do microscópio, para uma melhor interpretação dos resultados.

## 5 Conclusões gerais

Os resultados obtidos no presente trabalho de doutoramento demonstraram a elevada estabilidade dos vírus entéricos estudados em amostras de águas de superfície usualmente utilizadas para fins de recreação e consumo. Quando em condições de temperatura ambiente, a persistência da capacidade infecciosa dos vírus comprova a estabilidade destes patógenos no ambiente aquático, sendo assim potenciais desencadeadores de doenças relacionadas com o consumo de água ou contato com esses ambientes.

Quando submetidas à temperaturas de estocagem, que podem ser utilizadas em laboratórios previamente às análises, como 4, -20 e -80 °C os vírus estudados na presente tese demonstraram conservar a estabilidade infecciosa e genômica avaliada por diferentes técnicas, baseadas em cultura celular e métodos moleculares, respectivamente. Esta estabilidade variou de acordo com a temperatura, técnica utilizada, vírus avaliado e condições físico-químicas da amostra de água.

O desenvolvimento e aplicação de técnicas que avaliem a estabilidade viral por meio de métodos associados à cultura celular é de grande importância para se determinar a viabilidade viral, objetivando a escolha do melhor método, que associe as vantagens de rapidez, confiabilidade e menor custo.

A obtenção de resultados que possam definir procedimentos tanto de estocagem como de avaliação da estabilidade viral podem colaborar para a disseminação da real importância destes patógenos no desenvolvimento de doenças, e em futuros estudos epidemiológicos, avaliações de análise de risco, de estabilidade e seguridade de cepas vacinais atenuadas presentes no ambiente aquático, deixando de ser um tópico de caráter especulativo.

Atualmente o monitoramento da qualidade da água no Brasil não contempla a avaliação da presença destes importantes patógenos virais. Apesar dos inúmeros trabalhos conduzidos por importantes grupos de pesquisa, tanto em escala mundial como em escala nacional, a adequação das diretrizes para uma possível inclusão da avaliação destes potenciais indicadores de contaminação ambiental ainda carece de atenção dos órgãos regulamentadores. Deste modo, os resultados obtidos na presente tese de doutorado contribuem como possíveis norteadores para futuras tomadas de decisões referentes a implementação do monitoramento desses micro-organismos em análises rotineiras, salientando que os mesmos possuem elevada estabilidade do

ambiente aquático, tanto ao considerar-se a persistência genômica como da partícula infecciosa como um todo.

Além disso, destacam-se os procedimentos de estocagem das amostras previamente às análises, bem como a importância em se definir um protocolo rápido e eficiente para a detecção de partículas virais infecciosas, ou seja, capazes de desencadear uma infecção quando em contato com o hospedeiro humano.

Sugere-se dessa forma, a estocagem de amostras de água de superfície (água doce) e água de consumo à temperatura de 4 °C por períodos curtos de armazenamento (48 h) e previamente à concentração das amostras, já que previamente à concentração o espaço necessário para a estocagem de amostras é maior, podendo ser realizado em câmaras refrigeradas. Quando concentradas, indica-se a estocagem à temperatura de -80 °C, levando em consideração, neste caso, o menor espaço físico necessário para a estocagem das amostras já concentradas. Indica-se também que para a pesquisa de vírus infecciosos e quando estes forem adaptados ao cultivo celular, o uso de métodos de detecção que integrem cultura celular e métodos moleculares, como o ICC-et-RT-qPCR para uma rápida e eficiente detecção. Já para vírus não adaptados à cultura de células *in vitro*, sugere-se a quantificação do genoma viral, por qPCR ou RT-qPCR e possível padronização destes métodos de detecção acoplados à tratamento enzimático previamente à quantificação genômica.

## REFERÊNCIAS

- ABAD, F. X.; PINTO, R. M.; BOSCH, A. Flow cytometry detection of infectious rotaviruses in environmental and clinical samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2392-2396, 1998.
- AHMED, W.; GYAWALI, P.; SIDHU, J. P. S.; TOZE, S. Relative inactivation of faecal indicator bacteria and sewage markers in freshwater and seawater microcosms. **Letters in Applied Microbiology**, v.59, p.348-354, 2014.
- ALBINANA-GIMENEZ, N.; MIAGOSTOVICH, M. P.; CALGUA, B.; HUGUET, J. M.; MATIA, L.; GIRONES, R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. **Water Research**, v.43, p.2011-2019, 2009.
- ALLWOOD, P. B.; MALIK, Y. S.; HEDBERG, C. W.; GOYAL, S. M. Survival of F-specific RNA coliphage, feline calicivirus, and *Escherichia coli* in water: a comparative study. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5707-5710, 2003.
- ARAÚJO, I. T.; FIALHO, A. M.; SANTOS DE ASSIS, R. M.; ROCHA, M.; GALVÃO, M.; CRUZ, C. M.; FERREIRA, M. S. R.; LEITE, J. P. G. Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.48, p.214-218, 2002.
- ARIAS, C. F.; ESPINOSA, A. C.; HIRIART-MAZARI, M.; ESPINOSA, R.; AVIDAL-MARURI, L.; MÉNDEZ, E. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. **Water Research**, v.42, p.2618-2628, 2008.
- ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v.198, p.229-238, 2004.
- ASLAN, A.; XAGORARAKI, I.; SIMMONS, F. J.; ROSE, J. B.; DOREVITCH, S. Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. **Journal of Applied Microbiology**, v.p.1-12, 2011.

ATMAR, R. L. Noroviruses: State of the art. **Food and Environmental Virology**, v.2, p.117-126, 2010.

ATMAR, R. L.; OPEKUN, A. R.; GILGER, M. A.; ESTES, M. K.; CRAWFORD, S. E.; NEILL, F. H.; RAMANI, S.; HILL, H.; FERREIRA, J.; GRAHAM, D. Y. Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v.209, p.1016-1022, 2014.

BAE, J.; SCHWAB, K. J. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.477-484, 2008.

BAERT, L.; WOBUS, C. E.; COILLIE, E. V.; THACKRAY, L. B.; DEBEVERE, J.; UYTENDAELE, M. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.543-546, 2008.

BARARDI, C. R. M.; YIP, H.; EMSLIE, K. R.; VESEY, G.; SHANJER, R. S.; WILLIAMS, K. L. Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.49, p.9-18, 1998.

BARRIL, P. A.; FUMIAN, T. M.; PREZ, V. E.; GIL, P. I.; MARTÍNEZ, L. C.; GIORDANO, M. O.; MASACHESSI, G.; ISA, M. B.; FERREYRA, L. J.; RÉ, V. E.; MIAGOSTOVICH, M.; PAVAN, J. V.; NATES, S. V. Rotavirus seasonality in urban sewage from Argentina: effect of meteorological variables on the viral load and the genetic diversity. **Environmental Research**, v.138, p.409-415, 2015.

BEGIER, E. M.; OBERSTE, M. S.; LANDRY, M. L.; BRENNAN, T.; MLYNARSKI, D.; MSHAR, P. A.; FRENETTE, K.; RABATSKYHER, T. An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. **Clinical Infectious Diseases**, v.47, p.616-623, 2008.

BERK, A. J. (2013). Adenoviridae. **Fields Virology**. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **1**: 1704-1731.

BERTRAND, I.; SCHIJVEN, J. F.; SÁNCHEZ, G.; WYN-JONES, P.; OTTOSON, J.; MORIN, T.; MUSCILLO, M.; VERANI, M.; NASSER, A.; DE ROSA HUSMAN, A. M.; MYRMEL, M.; SELLWOOD, J.; COOK, N.; GANTZER, C. The impact of the temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v.p.1-16, 2012.

BOFFIL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GIRONES, R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.7894-7896, 2006.

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

BORCHARDT, M. A.; BERTZ, P. D.; SPENCER, S. K.; BATTIGELLI, D. A. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1172-1180, 2003.

BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D.; PINTO, R. M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, p.295-301, 2008.

BRASIL (2011). - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estabelece procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria n. 2.914, de 12 de março de 2011. **Ministério da Saúde**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da União .

CALGUA, B.; BARARDI, C. M. R.; BOFFIL-MAS, S.; ROCRIGUES-MANZANO, J.; GIRONES, R. Detection and quantification of

infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. **Journal of Virological Methods**, v.171, p.1-7, 2011.

CANTERA, J. L.; CHEN, W.; YATES, M. V. Detection of infective poliovirus by a simple, rapid, and sensitive flow cytometry method based on fluorescence resonance energy transfer technology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.584-588, 2010.

CARRATALÀ, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; RUSIÑOL, M.; FRESNO, S.; COOK, N.; GIRONES, R. Effect of temperature and sunlight on the stability of human adenoviruses and MS2 as fecal contaminants of fresh produce surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v.164, p.128-134, 2013a.

CARRATALÀ, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; RUSIÑOL, M.; FRESNO, S.; COOK, N.; GIRONES, R. Effect of temperature and sunlight on the stability of human adenoviruses and MS2 as fecal contaminants on fresh produce surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v.164, p.128-134, 2013b.

CARTER, M. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1354-1389, 2005.

CARVALHO-COSTA, F. A.; ARAÚJO, I. T.; ASSIS, R. M. S.; FIALHO, A. M.; MARTINS, C. M. M. A.; BÓIA, M. N.; LEITE, J. P., G. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p.95-97, 2009.

CARVALHO-COSTA, F. A.; VOLOTAO, E. M.; ASSIS, R. M. S.; FIALHO, A. M.; ANDRADE, J. S. R.; ROCHA, L. N.; TORT, L. F. L.; SILVA, M. F. M.; GÓMEZ, M. M.; SOUZA, P. M.; LEITE, J. P., G. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of vaccination program, Brazil, 2005-2009. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.30, p.35-41, 2011.

CHAPRON, C. D.; BALLESTER, N. A.; FONTAINE, J. H.; FRADES, C. N.; MARGOLIN, A. B. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenoviruses types 40 and 41 in surface water collected and evaluated



by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2520, 2000.

CHARLES, K. J.; SHORE, J.; SELLWOOD, J.; LAVERICK, M.; HART, A.; PEDLEY, S. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.1827-1837, 2009.

CONAMA (2000). - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. Resolução n. 274, de 20 de março de 2000. **Ministério do Meio Ambiente**: Conselho Nacional do Meio Ambiente, Diário Oficial da União.

CORRÊA, A. A.; ALBARNAZ, J. D.; MORESCO, V.; POLI, C. R.; TEIXEIRA, A. L.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Marine Environmental Research**, v.63, p.479-489, 2007.

CORRÊA, A. A.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; KLEEMANN, C. R.; TEIXEIRA, A. L.; POLI, C. R.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M. The depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated with hepatitis A virus and human adenovirus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, p.11-17, 2012a.

CORRÊA, A. A.; SOUZA, D. S. M.; MORESCO, V.; KLEEMANN, C. R.; GARCIA, L. A. T.; BARARDI, C. R. M. Stability of human enteric viruses in seawater samples from mollusc depuration tanks coupled with ultraviolet irradiation. **Journal of Applied Microbiology**, v.p.1365-2672, 2012b.

CROMEANS, T. L.; LU, X.; ERDMAN, D. D.; HUMPHREY, C. D.; HILL, V. R. Development of a plaque assay for adenoviruses 40 and 41. **Journal of Virological Methods**, v.151, p.140-145, 2008.

CROMEANS, T. L.; KAHLER, A. M.; HILL, V. R. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.1028-1033, 2010.

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.1169-1176, 2007.

DE RODA HUSMAN, A. M.; LODDER, W. J.; RUTJES, S. A.; SCHIJVEN, J. F.; TEUNIS, P. F. M. Long-term inactivation study of three enteroviruses in artificial surface and groundwaters, using PCR and cell culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.1050-1057, 2009.

DIKA, C.; DUVAL, F. L.; LY-CHATAIN, H. M.; MERLIN, C.; GANTZER, C. Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.4939-4948, 2011.

DONATO, C. M.; CH'NG, L. S.; BONIFACE, K. F.; CRAWFORD, N. I. W.; BUTTERY, J. P.; LYON, M.; BISHOP, R. F.; KIRKWOOD, C. D. Identification of strains of RotaTeq rotavirus vaccine in infants with gastroenteritis following routine vaccination. **The Journal of Infectious Diseases**, v.206, p.377-383, 2012.

DUNAMS, D.; SARKAR, P.; CHEN, W.; YATES, M. V. Simultaneous detection of infectious human echoviruses and adenoviruses by an *in situ* nuclease-resistant molecular beacon-based assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.1584-1588, 2012.

EISCHEID, A. C.; MEYER, J. N.; LINDEN, K. G. UV disinfection of adenoviruses: molecular indications of DNA damage efficiency. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.23-28, 2009.

ENRIQUEZ, C. E.; HURST, C. J.; GERBA, C. P. Survival of enteric adenovirus 40 and 41 in tap, sea and waste water. **Water Research**, v.29, p.2548-2553, 1995.

ESPINOSA, A. C.; MAZARI-HIRIART, M.; ESPINOSA, R.; MARURI-AVIDAL, L.; MÉNDEZ, E.; ARIAS, C. F. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. **Water Research**, v.42, p.2618-2628, 2008.

- ESTES, M. K.; GREENBERG, H. B. (2013). Rotaviruses. **Fields Virology**. H. P. Knipe D.M. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 1347-1401.
- FISHER, T.; STEINSLAND, H.; VALENTINER-BRANTH, P. Rotavirus particles can survive storage in ambient tropical temperatures for more than 2 months. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.4763-4764, 2002.
- FONG, T. T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.69, p.357-371, 2005.
- FONGARO, G.; NASCIMENTO, M. A.; VIANCELLI, A.; TONETTA, D.; PETRUCIO, M. M.; BARARDI, C. M. R. Surveillance of human viral contaminant and physicochemical profiles in a surface water lagoon. **Water Science and Technology**, v.66, p.2682-2687, 2012.
- FONGARO, G.; NASCIMENTO, M. A.; RIGOTTO, C.; RITTERBUSCH, G.; DA SILVA, A. D. A.; ESTEVES, P. A.; BARARDI, C. R. M. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. **Virology Journal**, v.10, p.166, 2013.
- GANTZER, C.; DUBOIS, E.; CRANCE, J. M.; BILLAUDEL, S.; KOPECKA, H.; SCHAWARTZBROD, L.; POMMEPUY, M.; LE GUYADER, F. Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater. **Oceanologica Acta**, v.21, p.983-992, 1998.
- GASSILLOUD, B.; SCHWARTZBROD, L.; GANTZER, C. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.3965-3969, 2003.
- GASSILLOUD, B.; GANTZER, C. Adhesion-aggregation and inactivation of poliovirus 1 in groundwater stored in a hydrophobic container. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.912-920, 2005.

GAUGULI, P. S.; CHEN, W.; YATES, M. V. Detection of murine norovirus-1 by using TAT peptide-delivered molecular beacons. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.5517-5520, 2011.

GENTSCH, J. R.; LAIRD, A. R.; BIELFELT, B.; GRIFFIN, D. D.; BÁNYAI, K.; RAMACHANDRAN, M.; JAIN, V.; CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, O.; KIRKWOOD, C. D.; FISCHER, T. K.; PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; JIANG, B.; GLASS, R. I. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **The Journal of Infectious Diseases**, v.192, p.146-159, 2005.

GERBA, C. P.; GRAMOS, D. M.; NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV lighth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.5167-5169, 2002.

GERBA, C. P.; NWACHUKU, N.; RILEY, K. Disinfection resistance of waterborne pathogens on the United States Environmental Protection Agency's Contaminant Candidate List (CCL). **Journal of Water Supply: Research and Technology**, v.52, p.81-94, 2003.

GERBA, C. P. (2005). Survival of viruses in the marine environment. **Oceans and health: Pathogens in the marine environment**. Belkin and Colwell. New York, Springer: 133-141.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D.; ESTES, M. K. Norovirus gastroenteritis. **New England Journal of Medicine**, v.361, p.1-17, 2009.

GORDON, C.; TOZE, S. Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.536-544, 2003.

GOULD, E. A. Methods for long-term virus preservation. **Molecular Biotechnology**, v.13, p.57-66, 1999.

GREEN, K. Y. (2013). Caliciviridae: The Noroviruses. **Fields Virology**. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 1: 582-608.

GRIFFIN, D. W.; DONALDSON, K. A.; PAUL, J. H.; ROSE, J. B. Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.129-143, 2003.

GUERET, V.; NEGRETE-VIRGEN, J. A.; LYDDIATT, A.; AL-RUBEAI, M. Rapid titration of adenoviral infectivity by flow cytometry in batch culture of infected HEK293 cells. **Cytotechnology**, v.38, p.87-97, 2002.

GURGEL, R. Q.; CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, O.; CUEVAS, L. E. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. **Journal of Clinical Virology**, v.43, p.1-8, 2008.

HALL, A. J.; LOPMAN, B. A.; PAYNE, D. C.; PATEL, M. M.; GASTAÑADUY, P. A.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U. D. Norovirus disease in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, p.1198-1205, 2013.

HAMZA, I. A.; JURZIK, L.; STANG, A.; SURE, K.; UBERLA, K.; WILHELM, M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, v.43, p.2657-2668, 2009.

HAMZA, I. A.; JURZIK, L.; ÜBERLA, K.; WILHELM, M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.214, 2011.

HARAMOTO, E.; KATAYAMA, H.; OGUMA, K.; OHGAKI, S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.2153-2159, 2007.

HARRISON, S.C. (2013). Principles of virus structure. **Fields Virology**. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 1: 52-86.

HELENIUS, A. (2007). Virus entry and uncoating. **Fields Virology**. D.M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 1: 100-118.

HERNROTH, B. E.; CONDEN-HANSSON, A. C.; REHNSTAM-HOLM, A. S.; GIRONES, R.; ALLARD, A. K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4523-4533, 2002.

HEWITT, J.; RIVERA-ABAN, M.; GREENING, G. E. Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.65-71, 2009.

HITT, D. C.; BOOTH, J. L.; DANDAPANI, V.; PENNINGTON, L. R.; GIMBLE, J. M.; METCALF, J. A flow cytometry protocol for titering recombinant adenoviral vectors containing the green fluorescence protein. **Molecular Biotechnology**, v.14, p.197-203, 2000.

HUANG, K.; MARTÍ, A. A. Recent trends in molecular beacon design and applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.402, p.3091-3102, 2012.

HURST, C. J.; GERBA, C. P. Stability of simian rotavirus in fresh and estuarine water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, p.1-5, 1980.

IBGE (2008). - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 08 de novembro 2010.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; ISHERWOOD, B.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. **Journal of Virology**, v.75, p.3696-3705, 2001.

JAYARAM, H.; ESTES, M. K.; PRASAD, B., V.V. Emerging themes on rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Research**, v.101, p.67-81, 2004.

JIANG, S. C. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. **Environmental Science and Technology**, v.40, p.7132-7140, 2006.

JOHN, D. E.; ROSE, J. B. Review of factors affecting microbial survival on groundwater. **Environmental Science and Technology**, v.39, p.7345-7356, 2005.

JONES, M. K.; WATANABE, M.; ZHU, S.; GRAVES, C. L.; KEYES, L. R.; GRAU, K. R.; GONZALES-HERNANDEZ, M. B.; IOVINE, N. M.; WOBUS, C. E.; VINJÉ, J.; TIBBETTS, S. A.; KARST, S. M. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection on B cells. **Science**, v.346, p.755-759, 2014.

JULIAN, T. R.; SCHWAB, K. J. Challenges in environmental detection of human pathogens. **Current Opinion in Virology**, v.2, p.78-83, 2012.

KIRKWOOD, C. D. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. **The Journal of Infectious Diseases**, v.202, p.43-48, 2010.

KO, G.; CROMEANS, T. L.; SOBSEY, M. D. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.7377-7384, 2003.

KO, G.; CROMEANS, T.; SOBSEY, M. D. UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. **Water Research**, v.39, 2005a.

KO, G.; JOTHIKUMAR, N.; HILL, V. R.; SOBSEY, M. D. Rapid detection of infectious adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.127, p.148-153, 2005b.

LAMBERTINI, E.; SPENCER, S. K.; BERTZ, P. D.; LOGE, F. J.; KIEKE, B. A.; BORCHARDT, M. A. Concentration of enteroviruses, adenoviruses and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.2990-2996, 2008.

LANGLET, J.; GABORIAUD, F.; GANTZER, C. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.1632-1638, 2007.

LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; MIOSSEC, R.; DUBOIS, E.; POMMEPUY, M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3248-3248, 2000.

LE GUYADER, F.; BON, F.; DEMEDICI, D.; PARNAUDEAU, S.; BERTONE, A.; CRUDEL, S.; DOYLE, A.; ZIDANE, M.; SUFFREDINI, E.; KOHLI, E.; MADDALO, F.; MONINI, M.; GALLAY, A.; POMMEPUY, M.; POTHIER, P.; RUGGERI, F. M. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. **Journal of Clinical Microbiology**, v.p.3878-3882, 2006.

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

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 water. **Journal of Microbiological Methods**, v.82, p.59-63, 2010.

LI, F.; FENG, L.; LIU, Y.; ZHENG, X.; CHEN, L. An integrated cell culture and quantitative polymerase chain reaction technique for determining titers of functional and infectious adenoviruses. **Analytical Biochemistry**, v.391, 2009.

LI, Y.; ZHOU, X.; YE, D. Molecular beacons: an optimal multifunctional biological probe. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.373, p.457-461, 2008.

LIM, M. Y.; KIM, J.-M.; LEE, J. E.; KO, G. Characterization of ozone disinfection of murine norovirus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.1120-1124, 2010.



LINHARES, A. C.; VERSTRAETEN, T.; WOLLESWINKEL-VAN DEN BOSCH, J.; CLEMENS, R.; BREUER, T. Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p.312-314, 2006.

LIU, B. R.; HUANG, Y.-W.; WINIARZ, J. G.; CHIANG, H.-J.; LEE, H.-J. Intracellular delivery of quantum dots mediated by a histidine- and arginine-rich HR9 cell-penetrating peptide through the direct membrane translocation mechanism. **Biomaterials**, v.32, p.3520-3537, 2011.

MARRAS, S. A. E. (2006). Selection of fluorophore and quencher pairs for fluorescent nucleic acid hybridization probes. **Methods in Molecular Biology: Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols**. V. V. Didenko. Totowa, NJ, Humana Press Inc.: 3-16.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M. K.; GENTSCH, J. R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C. D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P. P. C.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J. T.; RUGGERI, F. M.; SAIF, L. J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; RANST, M. V. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v.153, p.121-1629, 2008.

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P. H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; RANST, M. V.; JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v.157, p.1177-1182, 2012.

MCKILLEN, J.; HJERTNER, B.; MILLAR, A.; MCNEILLY, F.; BELÁK, S.; ADAIR, B. Molecular beacon real time PCR detection of swine viruses. **Journal of Virological Methods**, v.140, p.155-164, 2007.

MENA, K. D.; GERBA, C. P. Waterborne Adenovirus. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.198, p.133-167, 2008.

MENG, Z.-D.; BIRCH, C.; HEATH, R.; GUST, I. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.727-730, 1987.

MIAGOSTOVICH, M. P.; FERREIRA, F. F.; GUIMARAES, F. R.; FUMIAN, T. M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S. L.; SILVA, L. A.; LEITE, J. P. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.375-382, 2008.

MOE, K.; SHIRLEY, J. A. The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotaviruses in faeces. **Archives of Virology**, v.72, p.179-186, 1982.

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

MORGA, J. H.; LEON-FELIX, J.; PERAZA-GARAY, F.; GIL-SALAS, B. G.; CHAIDEZ, C. Detection and characterization of hepatitis A virus and norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration-RT-PCR integrated methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.1579-1590, 2009.

NEMEROW, G. R.; PACHE, L.; REDDY, V.; STEWART, P. L. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. **Virology**, v.384, p.380-388, 2009.

NITIN NITIN, P. J.; SANTANGELO, G. K.; SHUMING, N.; BAO, G. Peptide-linked molecular beacons for efficient delivery and rapid mRNA detection in living cells. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.1-8, 2004.

NOBLE, R. T.; LEE, I. M.; SCHIFF, K. C. Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.464-472, 2004.

O'BRIEN, R. T.; NEWMAN, J. S. Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, p.334-340, 1977.

OGORZALY, L.; BERTRAND, I.; PARIS, M.; MAUL, A.; GRANTZER, C. Occurrence, survival and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.8019-8025, 2010.

OLSON, M. R.; AXLER, R. P.; HICKS, R. E. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. **Journal of Virological Methods**, v.122, p.147-152, 2004.

PATEL, M. M.; WIDDWSON, M. A.; GLASS, R. I.; AKAZAWA, K.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U. D. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1224-1231, 2008.

PATEL, N. J.; HERTEL, P. M.; ESTES, M. K.; MORENA, M. D. L.; PETRU, A. M.; NOROSKI, L. M.; REVELL, P. A.; HANSON, C. I.; PAUL, M. E.; ROSENBLATT, H. M.; ABRAMSON, S. L. Vaccine-acquired rotavirus in infants with severe combined immunodeficiency. **The New England Journal of Medicine**, v.362, p.314-319, 2010.

PRADO, T.; SILCA, D. M.; GUILAYN, W. C.; ROSE, T. L.; GASPAS, A. M.; MIAGOSTOVICH, M. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. **Water Research**, v.45, p.1287-1297, 2010.

RAPHAEL, R. A.; SATTAR, S. A.; SPRINGTHORPE, V. S. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p.124-128, 1985.

REYNOLDS, K. A. Integrated cell culture/PCR for detection of enteric viruses in environmental samples. **Methods in Molecular Biology**, v.268, p.69-78, 2004.

RICHARDS, G. P.; WATSON, M. A.; MEADE, G. K.; HOVAN, G. L.; KINGSLEY, D. H. Resilience of norovirus GII.4 to freezing and thawing: implications for virus infectivity. **Journal of Food and Environmental Virology**, v.4, p.192-197, 2012.

RIDINGER, D. N.; SPENDLOVE, R. S.; BARNETT, B. B.; GEORGE, D. B.; ROTH, J. C. Evaluation of cell line and immunofluorescence and plaque assay procedures for quantifying reoviruses in sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.740-746, 1982.

RIGOTTO, C.; SINCERO, T. C.; SIMOES, C. M.; BARARDI, C. R. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Research**, v.39, p.297-304, 2005.

RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; CORRÊA, A. A.; SOUZA, D. S. M.; MIAGOSTOVICH, M.; SIMÕES, C. M.; BARARDI, C. R. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.1979-1987, 2010.

RIGOTTO, C.; HANLEY, K.; ROCHELLE, P. A.; DE LEON, R.; BARARDI, C. R. M.; YATES, M. V. Survival of adenovirus types 2 and 41 in surface and ground waters measured by a plaque assay. **Environmental Science and Technology**, v.45, p.4145-4150, 2011.

ROBINSON, C. M.; SINGH, G.; LEE, J. Y.; DEGHAN, S.; RAJAIYA, J.; LIU, E. B.; YOUSUF, M. A.; BETENSKY, R. A.; JONES, M. S.; DYER, D. W.; SETO, D.; CHODOSH, J. Molecular evolution of human adenoviruses. **Nature Scientific Reports**, v.3, p.1-7, 2013.

RODRÍGUEZ-DÍAZ, J.; QUERALES, L.; CARABALLO, L.; VIZZI, E.; LIPRANDI, F.; TAKIFF, H.; BETANCOURT, W. Q. Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.387-294, 2009.

RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; CALGUA, B.; CARRATALÀ, A.; MOTES, C. M.; RUSIÑOL, M.; MORESCO, V.; RAMOS, A. P. D.; MARTÍNEZ-MARCA, F.; CALVO, M.; BARARDI, C. R. M.; GIRONES, R.; BOFILL-MAS, S. Adenovirus and norovirus contaminants in commercially distributed shellfish. **Food and Environmental Virology**, v.6, p.31-41, 2014.

RODRÍGUEZ, R. A.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.297-307, 2009.

ROMERO, O. C.; STRAUB, A. P.; KOHN, T.; NGUYEN, T. H. Role of temperature and Suwannee River natural organic matter on inactivation kinetics of rotavirus and bacteriophage MS2 by solar irradiation. **Environmental Science and Technology**, v.45, p.10385-10393, 2011.

RUIZ-PALACIOS, G. M.; PÉREZ-SCHAEL, I.; VELÁZQUEZ, F. R.; ABATE, H.; BREUER, T.; CLEMENS, S. C.; CHEUVART, B.; ESPINOZA, F.; GILLARD, P.; INNIS, B. L.; CERVANTES, Y.; LINHARES, A. C.; LÓPEZ, M. D. P.; MACÍAS-PARRA, M.; ORTEGA-BARRÍA, E.; RICHARDSON, V.; RIVERA-MEDINA, D. M.; RIVERSA, L.; SALINAS, B.; PAVÍA-RUZ, N.; SALMERÓM, J.; RUTTIMANN, R.; TINOCO, J. C.; RUBIO, P.; NUÑEZ, E.; GUERRERO, M. L.; YARZÁBAL, J. P.; DAMASO, S.; TORNIEPORTH, N.; SÁEZ-LLORENS, X.; VERGARA, R. F.; VESIKARI, T. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **The New England Journal of Medicine**, v.354, p.11-22, 2006.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Reviews in Medical Virology**, v.15, p.29-56, 2005.

SCHLINDWEIN, A. D.; RIGOTTO, C.; SIMÕES, C. M.; BARARDI, C. R. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. **Water Science Technology**, v.61, p.537-544, 2010.

SCIPIONI, A.; MAUROY, A.; VINJÉ, J.; THIRY, E. Animal noroviruses. **The Veterinary Journal**, v.178, p.32-45, 2008.

SIMONET, J.; GANTZER, C. Degradation of the poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. **Journal of Applied Microbiology**, v.199, p.862-870, 2006.

SIRIKANCHANA, K.; SHISLER, J. L.; MARIÑAS, B. J. Inactivation kinetics of adenovirus serotype 2 with monochloramine. **Water Research**, v.42, p.1467-1474, 2008.

SIVARAMAN, D.; YEH, H.-Y.; MULCHANDANI, A.; YATES, M. V.; CHEN, W. Use of flow cytometry for rapid quantitative detection of poliovirus-infected cells via TAT peptide-delivered molecular beacons. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p.696-700, 2013.

SKRABER, S.; GASSILLOUD, B.; SCHWARTZBROD, L.; GANTZER, C. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. **Water Research**, v.38, p.2927-2933, 2004.

SMITH, E. M.; ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; GERBA, C. P. A plaque assay for the simian rotavirus SA11. **The Journal of General Virology**, v.43, p.403-409, 1979.

SHOHAM, D. (2005). Viral pathogens of human likely to be preserved in natural ice. **Life in Ancient Ice**. J.D Castello and S.O. Rogers. Princenton, Princenton University Press. **1**: 208-226.

TEUNIS, P. F.; MOE, C. L.; LIU, P. Norwalk virus: how infectious is it? **Journal of Medical Virology**, v.80, p.1468-1476, 2008.

TEUNIS, P. F. M.; LODDER, W. J.; HEISTERKAMP, S. H.; DE RODA HUSMAN, A. M. Mixed plaques: statistical evidence how plaque assays may underestimate virus concentration. **Water Research**, v.39, p.4240-4250, 2005.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; HAAS, C. N.; JACANGELO, J.; GERBA, C. P. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.3979-3985, 2003.

TREE, J. A.; ADAMS, M. R.; LEES, D. N. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.2038-2043, 2003.

TULADHAR, E.; BOUWKNEGT, M.; ZWIETERING, M. H.; KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Thermal stability of structurally different viruses with proven or potential relevance to food safety. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, p.1050-1057, 2012.

TYAGI, S.; KRAMER, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. **Nature Biotechnology**, v.14, p.303-308, 1996.

USEPA. Drinking water contaminant list 3 - Final. **Federal Regulation**, v.74, p.1850-1862, 2009.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p.139-159, 2002.

VECCHIA, A. D.; RIGOTTO, C.; STAGGEMEIER, R.; SOLIMAN, M. C.; SOUZA, F. G.; HENZEL, A.; QUEVEDO, D. M.; FLECK, J. D.; HEINZELMANN, L. S.; ALMEIDA, S. E. M.; SPILKI, F. R. Surface water quality in the Sinos River basin, in Southern Brazil: tracking microbiological contamination and correlation with physicochemical parameters. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, p.9899-9911, 2015.

VERHAELLEN, K.; BOUWKNEGT, M.; LODDER-VERSCHOOR, F.; RUTJES, S. A.; DE RODAHUSMAN, A. M. Persistence of human norovirus GI.4 and GII.4, murine norovirus, and human adenovirus on soft berries as compared with PBS at commonly applied storage conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.160, p.137-144, 2012.

VESIKARI, T.; MATSON, D. O.; DENNEHY, P.; VAN DAMME, P.; SANTOSHAM, M.; RODRIGUEZ, Z.; DALLAS, M. J.; HEYSE, J. F.; GOVEIA, M. G.; BLACK, S. B.; SHINEFIELD, H. R.; CHRISTIE, C. D. C.; YLITALO, S.; ITZLER, R. F.; COIA, M. L.; ONORATO, M. T.; ADEYI, B. A.; MARSHALL, G. S.; GOTHEFORS, L.; CAMPENS, D.; KARVONEN, A.; WATT, J. P.; O'BRIEN, K. L.; DINUBILE, M. J.; CLARK, H. F.; BOSLEGO, J. W.; OFFIT, P. A.; HEATON, P. M. Safety and efficacy of a pentavalent human bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. **The New England Journal of Medicine**, v.354, p.23-33, 2006.

VINJÉ, J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.53, p.373-381, 2015.

WALKER, C. F.; RUDAN, I.; LIU, L.; NAIR, H.; THEODORATOU, E.; BHUTTA, Z. A.; O'BRIEN, K. L.; CAMPBELL, H.; BLACK, R. E. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **Lancet**, v.381, p.1405-1416, 2013.

WANG, A.; SALAZAR, A. M.; YATES, M. V.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Visualization and detection of infectious coxsackievirus replication using a combined cell culture-molecular beacon assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.8397-8401, 2005.

WARD, R. L.; KNOWLTON, D. R.; WINSTON, P. E. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.450-459, 1986.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of viruses infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.254-298, 2006.

WETZ, J. J.; LIPP, E. K.; GRIFFIN, D. W.; LUKASIK, J.; WAIT, D.; SOBSEY, M. D.; SCOTT, T. M.; ROSE, J. B. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. **Marine Pollution Bulletin**, v.48, p.698-704, 2004.

WHO. World Health Organization: **Guidelines for drinking-water quality** - 4<sup>th</sup> ed. p.1-564, 2011.

WHO. World Health Organization: **Progress on drinking water and sanitation**. p.1-66, 2012.

WHO. World Health Organization: **Bulletin of the World Health Organization**. 93, p.820-821, 2015.

WIGGINTON, K.; PECSON, B.; SIGSTAM, T. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. **Environmental Science and Technology**, v.46, p.12069-12078, 2012.



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

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

XAGORARAKI, I.; KUO, D. H.-W.; WONG, K.; WONG, M.; ROSE, J. B. Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the Great Lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7874-7881, 2007.

XAVIER, M. P. T. P.; CARVALHO-COSTA, F. A.; ROCHA, M. S.; ANDRADE, J. S. R.; DINIZ, F. K. B.; ANDRADE, T. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LEITE, J. P. G.; VOLOTÃO, E. M. Surveillance of human astrovirus infection in Brazil: the first report of MLB1 astrovirus. **Plos One**, v.10, p.1-12, 2015.

YATES, M. V.; GERBA, C. P.; KELLEY, L. M. Virus persistence in groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.778-781, 1985.

YEH, H.-Y.; HWANG, Y.-C.; YATES, M. V.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Detection of hepatitis A virus by using a combined cell culture-molecular beacon assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.2239-2243, 2008a.

YEH, H.-Y.; YATES, M. V.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Visualizing the dynamics of viral replication in living cells via Tat peptide delivery of nuclease-resistant molecular beacons. **PNAS**, v.105, p.17522-17525, 2008b.

YEH, H. Y.; YATES, M. V.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Real-time molecular methods to detect infectious viruses. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.20, p.49-54, 2009.

YEN, C.; JAKOB, K.; ESONA, M. D.; PECKHAM, X.; RAUSCH, J.; HULL, J. J.; WHITTIER, S.; GENTSCH, J. R.; LARUSSA, P. Detection of fecal shedding of rotavirus vaccine in infants following their first dose of pentavalent rotavirus vaccine. **Vaccine**, v.31, p.4151-4155, 2011.

ZENG, S.-Q.; HALKOSALO, A.; SALMINEN, M.; SZAKAL, E. D.; PUUSTINEN, L.; VESIKARI, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal of Virological Methods**, v.153, p.238-240, 2008.

ZHENG, D. P.; 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.

*Apêndices:*

## Apêndice A: Artigo aceito para publicação referente aos resultados dos Capítulos I e II.

## Uncorrected Proof

1

© IWA Publishing 2015 Water Science &amp; Technology: Water Supply | In press | 2015

**Thermal and temporal stability on the enteric viruses infectivity in surface freshwater**

V. Moresco, N. A. Damazo and C. R. M. Barardi

**ABSTRACT**

The present study aimed to evaluate the stability of Human Adenovirus type 2 (HAdV2) and Murine Norovirus 1 (MNV-1) in surface freshwater samples stored at different with increasing temperatures ( $-80 > -20 > 4 > 22$  °C). The time required to reach one log reduction in viral titers ( $T_{90}$ ) was similar among all the times and temperatures by different cell-culture based methods and RT-qPCR. The HAdV2 stability decreased along the time of storage temperatures and methods employed, aside from samples stored at 22 and 4 °C which showed the lowest  $T_{90}$  values (50 days). For MNV-1, the samples stored at 22 and  $-20$  °C showed higher  $\log_{10}$  decay values, followed by 4 and  $-80$  °C; while genome persistence was ranked as  $-80 > -20 > 4 > 22$  °C. The  $T_{90}$  values were lower for samples stored at 22 °C (33 days), followed by 4,  $-20$  and  $-80$  °C with 111, 100 and 333 days, respectively. The results indicate that, under laboratory storage conditions, freshwater samples should be kept at 4 °C and at  $-80$  °C for short and long-term periods, respectively. This study provided useful information about thermal and temporal stability of the enteric viruses regarding sample storage

V. Moresco

N. A. Damazo

C. R. M. Barardi (corresponding author)

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento

de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,

Centro de Ciências Biológicas,

Universidade Federal de Santa Catarina,

Florianópolis,

Santa Catarina State CEP 88040-900,

Brazil

E-mail: [ceila.barardi@ufsc.br](mailto:ceila.barardi@ufsc.br)

## ORIGINAL ARTICLE

**Rotavirus vaccine stability in the aquatic environment**

V. Moresco, N.A. Damazo and C.R.M. Barardi

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil

**Keywords**

rotaviruses, stability, temperature, vaccine, water.

**Correspondence**

Celia Regina Monte Barardi, Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina State CEP 88040-900, Brazil.  
E-mail: celia.barardi@ufsc.br

2015/2037: received 5 October 2015, revised 3 December 2015 and accepted 4 December 2015

doi:10.1111/jam.13021

**Abstract**

**Aims:** To evaluate the thermal and length of stability of the Rotaviruses (RV) vaccine (Rota1eq) in the aquatic environment.

**Methods and Results:** Surface freshwater, brackish and drinking water were spiked with RV vaccine strain and stored at 22 and 4°C. The virus infectivity and genome persistence were evaluated by plaque assay and RT-qPCR, respectively, up to 180 days. Infectious RV vaccine particles showed to be less stable in the brackish water matrix than in surface and drinking water either at 22 or 4°C. The estimated  $T_{50}$  values obtained by the linear regression model were 18, 55 and 59 days, respectively for brackish, surface and drinking water stored at 22°C and 68, 154 and 240 days at 4°C. As expected, the genome persistence showed to be less affected by length and temperature of storage in all the matrices evaluated.

**Conclusions:** The evidence of high stability of the RV vaccine in water matrices reinforces the importance for surveillance of RV vaccines strains in the environment regarding the potential occurrence of unexpected infections and virus genomic reassortments.

**Significance and Impact of the Study:** The presence of reassortants and the shedding of the live attenuated vaccine strains after vaccination can compromise the vaccine safety by introducing new viral variants in the environment.