
VÍRUS ENTÉRICOS VEICULADOS POR ÁGUA: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E DE CONTROLE DE QUALIDADE DA ÁGUA

Talissa de Moraes Tavares, ¹ Divina das Dores de Paula Cardoso ² e Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito ²

RESUMO

Os vírus entéricos humanos são importantes causas de enfermidades veiculadas através da água. Esses patógenos, que são eliminados em grandes quantidades pelas fezes de indivíduos infectados, podem permanecer viáveis e infecciosos durante vários meses no ambiente e, assim, contaminar águas destinadas ao consumo humano, além de resistirem aos atuais processos de tratamento da água e do esgoto aplicados no controle bacteriano. Dessa forma, a qualidade de águas tratadas nem sempre é garantida em termos de segurança virológica, pois os atuais indicadores do grupo coliforme determinam somente a segurança bacteriológica da água. Os vírus são mais difíceis de serem detectados que as bactérias em amostras ambientais, especialmente em águas, nas quais estes microrganismos normalmente são encontrados em menor número. Sendo parasitas intracelulares obrigatórios, não se multiplicam; tornam-se necessárias, então, a análise de amostras de água volumosas e a escolha de métodos de concentração com grande eficiência de recuperação para as partículas virais. Além disso, muitos patógenos virais transmitidos através da água são microrganismos fastidiosos, que dificilmente são isolados pelos métodos tradicionais de rotina, como a cultura celular, o que torna ideal a utilização de técnicas de detecção muito sensíveis e que exijam complexas implementações. Com os avanços recentes nas técnicas laboratoriais em parâmetros de concentração viral e com a descoberta de métodos moleculares altamente sensíveis e específicos, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), tem sido possível aumentar o número de investigações no campo da virologia aquática. Isso provavelmente possibilitará a elaboração e a adoção de medidas preventivas que minimizem a contaminação da água por agentes virais que, até o momento, somente são realizadas em situações ocasionais de controle pelas autoridades sanitárias.

DESCRITORES: Água. Vírus entéricos. PCR. Revisão.

1 Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG).

2 Setor de Microbiologia, IPTSP, UFG.

Endereço para correspondência: Wília Marta E. D. de Brito, Rua Delenda Rezende de Melo, s/n. – Setor Universitário, Goiânia-GO, Brasil. CEP: 74215-210. E-mail: wdbrito@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em 24/4/2004. Revisto em 4/6/2005. Aceito em 15/6/2005.

INTRODUÇÃO

A pesquisa de vírus na água iniciou-se após a ocorrência de um surto de hepatite em Nova Délhi (Índia), na década de 1950, como consequência da contaminação do sistema de tratamento da água por patógenos virais provenientes do esgoto. Depois desse episódio, tiveram início os estudos na área da virologia aquática, atualmente denominada virologia ambiental, com cientistas tentando detectar poliovírus em amostras de água (Bosch, 1998).

Desde 1990, com a implementação dos métodos moleculares no estudo de vírus em amostras ambientais, vem crescendo a atenção dada à contaminação da água, do solo e dos alimentos pelos vírus. Como um fator de disseminação de doenças virais, esse problema tem implicações de longo alcance que vêm sendo extensivamente estudadas pelos virologistas e profissionais de Saúde Pública (Marques, 1991; Queiroz et al., 2001; Mehnert, 2001).

Sabe-se que vírus entéricos como poliovírus, rotavírus, calicivírus, alguns adenovírus e vírus da hepatite A, presentes no trato gastrointestinal de indivíduos infectados, são eliminados através das fezes em grandes quantidades (10^5 - 10^{11} /g de fezes) e são capazes de contaminar direta ou indiretamente águas destinadas ao consumo humano. A presença destes patógenos em águas ou alimentos contaminados por resíduos fecais, provenientes de descargas de esgotos, tem contribuído para a ocorrência de doenças em indivíduos susceptíveis. A dose infectante destes agentes é extremamente baixa, podendo variar de uma a dez unidades infecciosas (Appleton, 2000; Abbaszadegan, 2001, Wyn-Jones & Sellwood, 2001; Leclerc et al., 2002).

Os vírus entéricos podem permanecer viáveis (potencialmente infectantes) durante vários meses na água, resistindo a condições ambientais adversas, embora não se multipliquem por serem parasitas intracelulares obrigatórios. Eles podem ser identificados durante todas as estações do ano e alguns vírus podem resistir a processos de tratamento de água e esgoto aplicados no controle bacteriano, inclusive cloração. Além disso, não apresentam nenhuma correlação em termos qualitativos e quantitativos com os atuais indicadores bacterianos de contaminação de águas (Marques, 1991; Appleton, 2000; Abbaszadegan, 2001; Mehnert, 2001; Schvoerer et al., 2001; Leclerc et al., 2002).

No Brasil, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com a finalidade de avaliar a qualidade microbiológica da água, nos quais são pesquisadas apenas as bactérias (Alves et al., 2002; Meirelles-Pereira et al., 2002; Vasconcelos & Serafini, 2002; Vieira et al., 2002; Marques, 2003; Nogueira et al., 2003). Raros são os estudos realizados sobre a presença de vírus entéricos humanos em águas de beber e em esgotos, bem como sobre seu envolvimento em surtos de diarreias, hepatite A e conjuntivites desencadeadas por veiculação hídrica. Isso se dá em razão da disponibilidade de métodos de concentração viral de baixa eficiência de recuperação e de métodos de detecção pouco sensíveis, onerosos e de complexa implantação (Marques, 1991; Mehnert, 2003).

Com os avanços recentes nas técnicas laboratoriais que permitem a concentração, a detecção e a identificação dos vírus de diferentes tipos de água, tem sido possível aumentar o número de investigações nesse campo de estudo (Marques, 1991; Queiroz et al., 2001; Mehnert, 2001).

CARACTERIZAÇÃO DOS PATÓGENOS VIRAIS ENTÉRICOS

O termo “vírus entérico” compreende todos os grupos de vírus que estão presentes no trato gastrointestinal humano e que, após transmissão por via fecal-oral, podem causar infecções ou enfermidades em indivíduos susceptíveis (Wyn-Jones & Sellwood, 2001; Leclerc et al., 2002; Theron & Cloete, 2002).

As doenças virais veiculadas por meio da água podem ser adquiridas principalmente após o consumo de água de beber ou de alimentos contaminados, incluindo os peixes e moluscos bivalves comestíveis de ambientes marinhos e os frutos e vegetais cultivados em solos irrigados com águas de esgoto. Os patógenos virais também podem ser transmitidos através de águas de recreação poluídas, após contato direto por meio da pele ou por inalação (Marques, 1991; Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

Mais de 100 espécies de vírus presentes em águas contaminadas por descargas de esgoto podem causar uma ampla variedade de doenças no homem. Os vírus entéricos produzem freqüentemente infecções assintomáticas, entretanto podem estar associados a quadros mais severos como paralisias, anomalias cardíacas, meningite asséptica, encefalites, hepatites, diarréias e outras enfermidades (Bosch, 1998; Wyn-Jones & Sellwood, 2001; Leclerc et al., 2002).

Os vírus entéricos podem ser divididos em dois grupos de acordo com o crescimento em culturas celulares. O primeiro grupo inclui os enterovírus como poliovírus, coxsackievírus e echovírus, que têm bom crescimento e caracterização em culturas de células de primatas e que, normalmente, não causam doenças gastrointestinais. O segundo grupo inclui rotavírus, astrovírus, adenovírus 40/41, calicivírus (norovírus e saporovírus) e vírus das hepatites A e E, os quais são agentes causais de gastroenterites ou hepatites e dificilmente crescem em culturas celulares (Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

Enterovírus

O gênero *Enterovirus*, pertencente à família *Picornaviridae*, é constituído por: poliovírus humanos tipos 1 a 3, coxsackievírus humanos A1 a A22 e A24, coxsackievírus humanos B1 a B6, echovírus humanos 1 a 7, 9, 11 a 27 e 29 a 33, enterovírus humanos 68 a 71 e alguns enterovírus não humanos (Melnick, 1996).

O vírion apresenta forma esférica, não possui envelope, tem capsídeo com simetria icosaédrica e mede de 24 nm a 30 nm de diâmetro. Cada capsômero é composto por quatro poliproteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4, sendo a VP1

mais superficial e responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira e a VP4, mais interna e associada ao ácido nucléico. O genoma viral é formado por uma molécula linear de RNA de filamento simples com polaridade positiva (Melnick, 1996; Rueckert, 1996).

Os enterovírus são estáveis em uma faixa de pH entre 3 e 9, sensíveis ao cloro e inativados por luz ultravioleta. A maioria é citopatogênica e pode ser propagada em células primárias ou de linhagem contínua de uma variedade de tecidos de origem humana ou de macaco, tais como HeLa, WI-38 e Vero (Melnick, 1996).

Cerca de 66 tipos sorológicos de enterovírus conhecidos podem infectar o homem. De maneira geral, são eliminados por longos períodos através das fezes (um mês ou mais) e, normalmente, causam infecções assintomáticas, embora também possam causar paralisias, meningites ou cardiomiopatias. São encontrados em todas as partes do mundo e estão amplamente distribuídos durante o ano inteiro, porém com uma maior frequência no verão e no outono em países de clima temperado (Melnick, 1996; Borchardt et al., 2003).

Enfermidades causadas por enterovírus e veiculadas pela água não são facilmente reconhecidas, já que é baixo o índice de transmissão desses vírus pela água (Melnick, 1996). No entanto, em diferentes países, estes patógenos têm sido evidenciados em surtos de gastroenterites associadas à ingestão de águas destinadas ao consumo humano contaminadas (Häfliger et al., 1999; Gofti-Laroche et al., 2001; Frost et al., 2002).

Rotavírus

O gênero *Rotavirus*, pertencente à família *Reoviridae*, apresenta partícula viral não envelopada, medindo cerca de 75 nm de diâmetro, com capsídeo de simetria icosaédrica constituído por três camadas protéicas distintas. A camada mais interna, core, que envolve o genoma viral, é formada pela proteína VP2. A camada intermediária, capsídeo interno, é composta pela proteína VP6. A camada mais externa, capsídeo externo, é constituída pelas proteínas VP4 e VP7. O genoma viral é constituído de 11 segmentos de RNA de fita dupla com cada um codificando pelo menos uma proteína (Estes, 1996).

Os rotavírus são classificados em sete sorogrupos de A a G, reconhecidos com base na especificidade antigênica da proteína VP6. O grupo A é o mais comum dos rotavírus humanos e é ainda classificado em sorotipos e/ou genotipos. Os sorotipos G ou P são determinados pela reatividade do vírus em ensaios de neutralização com base nas proteínas VP7 ou VP4 do capsídeo, respectivamente. Os genotipos P ou G são determinados por seqüenciamento, amplificação ou hibridização dos genes 4 ou 9 que codificam as proteínas VP4 ou VP7 (Kapikian & Chanock, 1996).

O rotavírus tem sido considerado o principal agente etiológico de diarreia infantil em todo o mundo. A doença diarreica é geralmente branda e autolimitada, caracterizada por diarreia, vômito, febre, desidratação e dor abdominal. A

transmissão é feita principalmente por via fecal-oral. A veiculação através da água tem sido evidenciada durante todas as estações, porém com uma maior frequência durante o inverno (Kapikian & Chanock, 1996; Mehnert & Stewien, 1993; Mehnert et al., 1999; Borchardt et al. 2003).

Números limitados de casos de rotavirose relacionados com o consumo de águas contaminadas têm sido publicados; a maioria é resultante da ingestão de águas de beber contaminadas por descargas de esgoto (Gofti-Laroche et al., 2001; Frost et al., 2002; Lopman et al., 2003).

Calicivírus

De acordo com a organização do genoma viral, a família *Caliciviridae* foi dividida em quatro gêneros: *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Norovirus* e *Saporovirus*; os dois últimos gêneros referem-se aos calicivírus entéricos de origem humana (Pringle, 1999).

O vírion não possui envelope, apresenta simetria icosaédrica, mede cerca de 26 nm a 35 nm de diâmetro e contém um genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva. O genoma contém três seqüências abertas de leitura (ORF – *open read frame*): a ORF1 codifica uma poliproteína não estrutural, a ORF2 forma o capsídeo viral e a ORF3 codifica uma proteína pequena cuja função ainda é desconhecida (Kapikian et al., 1996).

Os norovírus, inicialmente também designados como pequenos vírus arredondados, incluem-se entre os principais vírus causadores de diarreia e estão envolvidos em surtos de gastroenterites que acometem crianças e adultos. A doença é branda e autolimitada com duração de 24 a 48 horas e seus sintomas são basicamente vômitos e diarreias. Dados epidemiológicos demonstram uma predominância da doença por norovírus durante o inverno (Kapikian et al., 1996; Pringle, 1999; Appleton, 2000; Borchardt et al., 2003).

Apesar do norovírus ter sido descoberto em 1972, sua análise genômica só foi iniciada em 1990. Recentemente, dois genogrupos foram descritos: genogrupo I (GI) e genogrupo II (GII). Existe também um terceiro genogrupo (GIII) constituído de amostras originadas de bovinos. No momento, há oito amostras virais referidas como protótipos: Norwalk (NV), Hawaii (HV), Snow Mountain (SMV), Jena (JV), Southampton (SOV), Toronto (TV), Desert Shield (DSV) e Bristol (BV) (Kapikian et al., 1996; Ando et al., 2000).

Surtos de diarreia têm sido associados à ingestão de norovírus em água potável e em crustáceos contaminados (Häfliger et al., 1999; Appleton, 2000). Existem também evidências de surtos de infecções causados por calicivírus relacionados com a exposição a águas de fins recreacionais. É provável que uma parte dos casos de gastroenterites agudas associados a piscinas e lagos seja causada por calicivírus (Frost et al., 2002; Lee et al., 2002).

Os vírus do grupo saporovírus, formalmente designados como “calicivírus clássicos”, foram recentemente divididos em dois genogrupos. O saporovírus tem papel importante em surtos de gastroenterites infantis, em que a contaminação ocorre aparentemente por contato pessoa a pessoa, no entanto é incerta sua participação em surtos associados a consumo ou utilização de águas contaminadas (Vinjé et al., 2000; Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

Adenovírus entéricos

Os adenovírus entéricos fazem parte da família *Adenoviridae* e do gênero *Mastadenovirus*, que inclui mais de 49 sorotipos humanos classificados em seis espécies, de A a F. A espécie F é formada por sorotipos de adenovírus entéricos fastidiosos, Ad40 e Ad41, que dificilmente crescem em culturas celulares (Shenk, 1996; Horwitz, 1996).

As partículas virais não apresentam envelope e medem de 70 nm a 100 nm de diâmetro. O capsídeo icosaédrico é constituído por 252 capsômeros. Destes, 240 hexons formam as faces do icosaedro e 12 pentons formam os vértices. O vírion é constituído de 11 proteínas das quais 7 formam o capsídeo. O hexon é formado pelo trímero do polipeptídeo II. O penton consiste em duas estruturas distintas: a base, responsável por ancorar o penton ao capsídeo, e a fibra, que é uma estrutura alongada que se estende a partir do vértice da partícula viral. O core viral contém quatro proteínas (polipeptídeos V, VII e μ e proteína terminal) e o genoma viral de DNA de fita dupla linear não segmentado (Shenk, 1996).

Em geral, a gastroenterite associada a adenovírus é tão prevalente quanto a causada por rotavírus e ocorre mais freqüentemente em crianças com menos de 4 anos, caracterizando-se como uma doença branda com diarreia e vômito. Em regiões de clima temperado, a prevalência de adenovírus entéricos é maior. No entanto, em países de clima tropical, como o Brasil, adenovírus veiculados pela água têm sido detectados durante todos os meses do ano (Horwitz, 1996; Mehnert et al., 1999).

Sabe-se que os adenovírus apresentam maior estabilidade na água do que os enterovírus e outros vírus entéricos, porém têm sido evidenciados poucos surtos de gastroenterites causados por adenovírus associados a águas destinadas ao consumo humano contaminadas (Mehnert et al., 2001; Frost et al., 2002; Lee & Kim, 2002)

Vírus das hepatites A e E

O vírus da hepatite A (HAV), pertencente ao gênero *Hepatovirus* e à família *Picornaviridae*, apresenta-se estruturalmente como um nucleocapsídeo icosaédrico não envelopado, medindo de 27 nm a 32 nm de diâmetro. O genoma que compõe a partícula é uma molécula de RNA linear com 7,5 Kb, de fita simples e polaridade

positiva. Esse genoma é dividido em três regiões: região 5' não codificadora; longa ORF codificadora de 11 proteínas, algumas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 3B) e outras não estruturais (2B, 2C, 3A, 3C, 3D) e região 3' não codificadora. O HAV, estável em pH 1 e em aquecimento de 60°C por 60 min, dificilmente cresce em culturas de células (Rueckert, 1996; Hollinger & Ticehurst, 1996).

A distribuição mundial da hepatite A apresenta diferentes níveis de endemicidade e está diretamente relacionada com as condições sanitárias e socioeconômicas das populações. A transmissão dessa virose ocorre por via fecal-oral, principalmente através da ingestão de água e alimentos contaminados. Pode manifestar-se como hepatite icterica ou anictérica, ou desenvolver-se de forma inaparente ou subclínica, o que acontece em 80% dos casos de infecção (Hollinger & Ticehurst, 1996).

Surtos de hepatite A associados ao consumo de águas de beber e à utilização de águas de recreação contaminadas têm sido evidenciados (Frost et al., 2002). O HAV também tem sido detectado em águas de poços (De Serres et al. 1999; Borchardt et al., 2003), sistemas de tratamento de esgoto, rios (Schvoerer et al., 2000), córregos e esgotos (Sassaroli et al., 2000; Clemente-Casares et al., 2003).

O vírus da hepatite E (HEV), transmitido por via fecal-oral, assemelha-se aos vírus da família *Caliciviridae*. O vírion não possui envelope, apresenta um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, com diâmetro variando entre 27 nm e 32 nm e um genoma de fita simples de RNA de polaridade positiva. A infecção é similar à hepatite A, mas pode ser mais severa, especialmente em mulheres grávidas (Purcell, 1996).

Epidemias e casos esporádicos causados por HEV veiculados pela água foram relatados em vários países da Ásia, África e América Latina (Appleton, 2000). Nos EUA, Espanha e França, o HEV também foi detectado em amostras de esgotos urbanos provenientes de diferentes áreas consideradas não endêmicas (Clemente-Casares et al., 2003).

Astrovírus

Os astrovírus, pertencentes à família *Astroviridae*, possuem partícula viral esférica e não envelopada, medindo de 28 nm a 30 nm de diâmetro, com bordas bem definidas, apresentando, caracteristicamente, uma configuração de estrela de cinco ou seis pontas. O genoma viral é constituído de uma fita simples de RNA de polaridade positiva. A infecção por astrovírus em humanos é caracterizada por uma gastroenterite aguda com dois a três dias de duração. O pico da infecção é observado nos meses de inverno, em regiões de clima temperado, e na estação de chuvas em regiões de clima tropical. O astrovírus geralmente não cresce em culturas de células, embora sua propagação e isolamento tenham sido possíveis em linhagens de células de carcinoma de cólon intestinal (CaCo-2) (Matsui & Greenberg, 1996).

Existem poucos relatos da incidência de astrovírus no ambiente aquático e raramente esses vírus têm sido detectados em amostras de água e em crustáceos

contaminados por descargas de esgotos (Appleton, 2000; Gofiti-Laroche et al, 2001; Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

INVESTIGAÇÕES DE SURTOS VIRAIS VEICULADOS PELA ÁGUA

Levantamentos epidemiológicos conduzidos em diferentes países revelam o envolvimento de vírus entéricos em surtos associados a águas contaminadas.

No Canadá, em 1995, ocorreu um surto de hepatite A devido à ingestão de águas contaminadas de poços (De Serres et al., 1999). Em 1998, um surto de gastroenterite, na Suíça, confirmou a presença de enterovírus e de norovírus em amostra de água de beber contaminada por esgoto (Häfliger et al., 1999). Em 1999, nos Alpes Franceses, sudeste da França, ocorreu um surto de doença digestiva aguda envolvendo 19 pessoas que haviam ingerido águas de torneira contaminadas por enterovírus e rotavírus (Gofiti-Laroche et al., 2001).

Nos EUA, de 1971 a 1998, ocorreram 625 surtos de gastroenterites como conseqüência da ingestão de águas de beber contaminadas e 161 surtos de gastroenterites adquiridas após a utilização de águas de recreação contaminadas. Do total de 786 surtos, 30 foram causados por HAV, 29 por norovírus, dois por adenovírus, 2 por enterovírus e 2 por rotavírus (Frost et al., 2002). Entre 1999 e 2000, ainda nos EUA, foram constatados três surtos por norovírus associados à recreação em piscina e ao consumo de água proveniente de sistemas não tratados contaminados, nos quais foram atingidas 202 pessoas (Lee et al., 2002).

Na Coreia do Sul, entre 1997 e 1998, adenovírus e enterovírus foram encontrados em águas de torneira. Entre os enterovírus foram detectados os coxsackievírus B e echovírus 6. Ambos foram identificados como agentes causadores de meningite asséptica no país naquele período (Lee & Kim, 2002).

De 1995 a 2000, dos surtos de gastroenterites causados por norovírus ou rotavírus associados ao consumo de alimentos e águas contaminadas que foram notificados na Europa, 24% ocorreram na Finlândia, 17% nos Países Baixos, 14% na Eslovênia, 7% na Espanha e 7% na Inglaterra (Lopman et al., 2003).

No Brasil, entre 1987 e 1988, Mehnert e Stewien (1993) realizaram a primeira investigação de rotavírus em águas de esgotos e córregos poluídos na cidade de São Paulo, utilizando como metodologias a imunofluorescência indireta e a imunoperoxidase direta. Entre 1988 e 1989, 1998 e 1999, Mehnert et al. (1999) identificaram adenovírus em amostras de águas provenientes dos mesmos locais analisados por Mehnert e Stewien (1993), na cidade de São Paulo, através do método imunoenzimático para detecção de rotavírus e adenovírus (EIERA).

Em algumas cidades do estado São Paulo, entre 1998 e 2003, foram realizados outros estudos na área de virologia ambiental utilizando-se métodos moleculares, nos quais foram identificadas as presenças de HAV (Sassaroli et al., 2000), rotavírus (Queiroz et al., 2001; Pauli et al., 2003) e adenovírus (Santos et al., 2001; Garrafã et al., 2003; Martins et al., 2003) em águas de esgotos, córregos e poços analisados.

Na cidade de Vitória (ES), Keller & Gonçalves (2001) detectaram a presença de rotavírus em 33,3% das amostras de águas de esgoto analisadas por RT-PCR, provenientes de uma planta de tratamento de esgoto planejada para atender 1.000 habitantes nesta cidade.

As ostras provenientes de ambientes marinhos podem contaminar-se facilmente por descargas de esgoto, por serem animais bivalves que se alimentam por filtração. Assim, são capazes de reter materiais orgânicos ou partículas, incluindo os vírus, presentes na água do mar. Os vírus podem permanecer estáveis nos tecidos de moluscos bivalves comestíveis em concentrações 100 vezes mais elevadas do que na água do mar. Esse fato é suficiente para indicar a possibilidade da transmissão de doenças virais pela ingestão de certos alimentos provenientes do ambiente marinho, principalmente quando estes são consumidos crus ou mal cozidos (Marques et al., 1991; Appleton, 2000). Estudos investigativos de vírus em ostras, realizados na cidade de Florianópolis (SC), confirmaram a presença de HAV, rotavírus, poliovírus e adenovírus nestes alimentos (Coelho et al., 1999; Santos et al., 1999; Vinatea et al, 2002; Rigotto et al., 2003).

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

Análises microbiológicas de rotina da qualidade da água não consideram vírus como indicadores de contaminação, somente as bactérias (Mehnert, 2001; Carducci et al., 2003).

Estudos comparativos da detecção de enterovírus (Lee & Kim, 2000, Gofti-Laroche et al., 2001; Schvoerer et al., 2001), adenovírus (Lee & Kim, 2000), rotavírus (Gofti-Laroche et al., 2001; Kittigul et al., 2001; Borchardt et al., 2003), astrovírus (Gofti-Laroche et al., 2001), HAV e norovírus (Schvoerer et al., 2000; Borchardt et al., 2003) com coliformes fecais mostraram que não há correlação entre estes agentes nas amostras de água de esgotos, rios, córregos, poços e torneiras examinadas.

Griffin et al. (1999), Gofti-Laroche et al. (2001) e Borchardt et al. (2003) pesquisaram simultaneamente bactérias e vírus entéricos em amostras de água e mostraram que, apesar de não haver relação significativa entre bactérias e vírus detectados, houve uma associação entre vírus e componentes à base de cloro presentes nas amostras analisadas.

O tratamento convencional completo da água para consumo humano é constituído de processos de aplicação de cal e coagulante, floculação, decantação, filtração, cloração, correção de pH e fluoretação (Saneago, 2002).

Na etapa da filtração, na qual as partículas e microrganismos ficam retidos em membranas ou filtros permeáveis, normalmente obtém-se água bacteriologicamente segura para consumo humano. A remoção viral, entretanto, é geralmente ineficiente, uma vez que os vírus apresentam menores diâmetros que as bactérias e dificilmente ficam retidos nos filtros, por isso não são removidos (Payment, 1998; Lee et al., 2002; Saneago, 2000).

A etapa da cloração, isto é, a desinfecção de microrganismos remanescentes após a filtração por ação do cloro é um processo altamente eficiente contra algumas bactérias Gram-negativas intestinais pertencentes ao grupo dos coliformes. No entanto, não é medida de controle adequada para enterovírus, adenovírus e rotavírus e é extremamente insuficiente na remoção de HAV e norovírus, que são ainda mais resistentes à cloração (Keswick et al., 1985; Payment, 1998; Appleton, 2000; Lee & Kim, 2000; Gofiti-Laroche et al., 2001; Theron & Cloete, 2002).

Entre os vírus entéricos, os norovírus são mais resistentes à inativação por cloro, uma vez que têm permanecido viáveis em águas tratadas com cloro em concentrações de 3,75 mg/L a 6,26 mg/L, normalmente usadas no tratamento de água potável e eficientes na inativação de poliovírus, rotavírus e bacteriófagos f2. Esses vírus mostram-se sensíveis em águas cloradas com concentração de 10 mg/L, geralmente aplicada no tratamento dos sistemas de abastecimento de água após detecção de contaminação (Keswick, 1985; Appleton, 2000).

O HAV é também mais resistente à cloração do que outros vírus entéricos, pois não é inativado em águas consideradas potáveis que apresentam níveis de cloreto livre variando de 0,5 mg/L a 1,5 mg/L. Contudo, este vírus perde sua infecciosidade após tratamento com cloro em concentração de 5mg/L durante um minuto, ou ainda, tem sua infecciosidade reduzida após exposição a hipoclorito de sódio, glutaraldeído a 2% e compostos amônios quaternários (Appleton, 2000).

Segundo Payment (1998), a desinfecção por ozônio é o método mais eficiente para inativação da maioria dos agentes patogênicos conhecidos durante o tratamento da água.

Sempre existiram dificuldades tecnológicas em obter dados relacionados com a contaminação viral da água. Esta avaliação exige a análise de amostras de água volumosas e métodos eficientes e rápidos para concentração e detecção de vírus em amostras com diferentes origens (Marques, 1991; Carducci et al., 2003; Mehnert, 2001).

A análise virológica da água destinada ao consumo humano é, portanto, pouco realizada, especialmente em situações ocasionais de controle, sendo as investigações restritas às autoridades sanitárias e, na maioria das vezes, subestimadas (Gofiti-Laroche et al., 2001; Carducci et al., 2003).

Por estas razões, torna-se difícil estabelecer um padrão de qualidade virológica da água, em que seja utilizado um indicador viral comum capaz de apontar uma melhor qualidade da água sob diferentes aspectos, seja da água pura e nunca utilizada, seja da contaminada após acidentes de poluição e também daquela usada na análise de sazonalidade (Carducci et al., 2003).

Alguns autores têm sugerido a pesquisa de bacteriófagos tais como bacteriófagos F-específicos de RNA, fagos de *Bacteriodes fragilis* e fagos de *Escherichia coli*, como bons indicadores para monitorar a qualidade virológica da água, já que eles podem estar presentes em fezes humanas e de animais, apresentam tamanho e morfologia semelhantes às de grupos de vírus entéricos patogênicos, além

de possuírem características de sobrevivência e de transporte similares. Entretanto, as investigações realizadas com bacteriófagos têm mostrado baixa ocorrência ou ausência desses organismos em águas analisadas (Bosch, 1998; Griffin et al., 1999; Gofti-Laroche et al., 2001; Borchardt et al., 2003; Hot et al., 2003).

As autoridades governamentais européias incluíram nos padrões microbiológicos utilizados na avaliação da qualidade da água a pesquisa de enterovírus como indicadores virológicos, além dos indicadores bacterianos (Mehnert et al., 2001). No Brasil, embora a Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000, do Ministério da Saúde, haja feito referência à necessidade da inclusão desses vírus como parâmetros de avaliação virológica da água (Brasil, 2001) e de estudos realizados terem demonstrado que os enterovírus podem ser considerados importantes indicadores de contaminação ambiental e fecal de origem humana e animal (Schvoerer et al., 2001; Ley et al., 2002; Hot et al., 2003), nenhuma portaria ou legislação foi ainda elaborada no país preconizando a pesquisa de enterovírus como indicadores virológicos em amostras de água.

Estudos recentes conduzidos na Europa e na África sugerem o uso de adenovírus como indicadores de poluição viral humana no lugar de enterovírus, visto que os adenovírus são mais estáveis no meio ambiental, podem ser evidenciados em todas as estações do ano, são detectados mais facilmente e não apresentam nenhuma correlação quantitativa significativa estatisticamente com os indicadores bacterianos do grupo coliforme (Mehnert et al., 2001; Heerden et al., 2003). Algumas investigações realizadas no Brasil com enterovírus, rotavírus e adenovírus corroboram a maioria dessas considerações (Mehnert et al., 1999; Mehnert et al., 2001; Santos et al., 2001; Garrafa et al., 2003; Martins et al., 2003).

ANÁLISE VIROLÓGICA DA ÁGUA

As etapas básicas para análise virológica da água são: coleta, concentração, remoção de inibidores e detecção de vírus específicos (Bosch, 1998).

Coleta

De acordo com Queiroz et al. (2001), as amostras submetidas à análise devem ser coletadas, preferencialmente, no período da manhã, aproximadamente entre 8h e 9h e durante os dias da semana, a fim de minimizar os efeitos de variações diurnas refletidas por condições ambientais como temperatura da água, percentual de irradiação por luz UV, precipitação e alterações conseqüentes da ocupação e atividades humanas (Griffin et al., 1999).

O processamento das amostras deve ser realizado logo após a coleta. Se isso não for possível, deve-se mantê-las entre 2° e 10°C até 48 horas ou, após esse período, a - 70°C ou menos (Clesceri et al., 1998).

Método de concentração

A concentração das partículas virais em amostras de água é uma etapa crítica, pois normalmente os vírus estão presentes em pequenas quantidades na água, sendo necessária a coleta de amostras volumosas (variando de um a 1.000 litros ou mais, dependendo da origem da água a ser analisada), que serão reduzidas a volumes menores para serem posteriormente ensaiadas em poucos mililitros (Bosch, 1998; Wyn-Jones & Sellwood, 2001; Straub & Chandler, 2003).

Um bom método de concentração deve ser tecnicamente simples, rápido e acessível e capaz de processar grandes volumes de água, de obter um pequeno volume de concentrado, de promover uma grande recuperação de vírus e de detectar uma ampla variedade de vírus, além de ser repetitivo e reprodutível (Bosch, 1998; Li et al., 1998; Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

Em diferentes investigações realizadas, o procedimento para concentração de vírus em amostras de água volumosas geralmente inclui a etapa de *adsorção-eluição*, utilizando filtros ou membranas carregadas positivamente ou negativamente, fibras de vidro, de pó ou de algodão, ou ainda hidróxido de alumínio, ou a etapa de *ultrafiltração*, por fluidez tangencial ou por vórtex, seguida da etapa de *precipitação* através da floculação orgânica, ou da reação com sulfato amônico, ou da hidroextração com polietilenoglicol e/ou da etapa de *ultracentrifugação* (Bosch, 1998; Clesceri et al., 1998; Gofiti-Laroche et al., 2001; Mehnert & Stewien, 1993; Keller & Gonçalves, 2001; Kittigul et al., 2001; Queiroz et al., 2001; Wyn-Jones & Sellwood, 2001; Beuret, 2003; Borchard et al., 2003; Carducci et al., 2003).

De um modo geral, apesar dos vírus serem concentrados por diferentes metodologias com sucesso, alguns deles, como os rotavírus, são mais susceptíveis às variações de pH durante o processamento das amostras e a outros componentes orgânicos que possam estar presentes na água, o que dificulta a recuperação dessas partículas virais em relação aos outros vírus (Wyn-Jones & Sellwood, 2001; Queiroz et al., 2001).

Segundo Wyn-Jones & Sellwood, (2001), porque os vírus apresentam uma massa molecular relativamente alta ($M_r > 10^6$), torna-se possível concentrá-los com êxito através de métodos de ultrafiltração e ultracentrifugação.

No Brasil, desde de 1988, trabalhos realizados têm utilizado um método de concentração em duas etapas: *adsorção-eluição* por filtração através de membrana de filtro eletropositiva Zeta Plus 60 S (ZP60S), seguida de *ultracentrifugação*, na pesquisa de rotavírus, adenovírus e vírus da hepatite A em amostras de água (Mehnert & Stewien, 1993; Mehnert et al., 1997, 1999; Sassaroli et al., 2000; Queiroz et al., 2001; Garrafa et al., 2003; Martins et al., 2003; Pauli et al., 2003). Esse método é muito eficiente por ser simples, rápido, de baixo custo, além de ser capaz de promover uma grande recuperação de vírus a partir de amostras de água volumosas.

Outros métodos também têm sido utilizados no Brasil, como a filtração em membrana estéril e precipitação com polietilenoglicol 6000 utilizada durante pesquisa de rotavírus em águas de esgoto no Espírito Santo (Keller & Gonçalves, 2001).

Métodos de detecção, enumeração e identificação

A identificação de vírus em águas de diferentes origens tem sido realizada de diversas formas, de acordo com seu crescimento ou não em culturas celulares (Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

Culturas celulares

As culturas de células são métodos tradicionais utilizados na detecção de alguns vírus, como os enterovírus, em amostras de água concentradas, que são capazes de infectar células de origem animal ou humana em ensaios de placa *in vitro*. A cultura celular, apesar de ser um método muito sensível e detectar partículas virais infecciosas, requer de três dias a mais de seis semanas para evidenciar os efeitos citopáticos, além de ser uma técnica onerosa e com baixa especificidade (Reynolds et al., 1996; Gilgen et al., 1997; Abbaszadegan et al., 1999; Wyn-Jones & Sellwood, 2001; Frost et al., 2002).

Experimentos que utilizam a semeadura experimental de amostras de água para posterior detecção por métodos imunológicos ou moleculares usam esta técnica para determinar a porcentagem de recuperação das partículas virais ao longo do processo da concentração (Mehnert et al., 1997; Gilgen et al., 1997; Ijzerman et al., 1997; Li et al., 1998; Kittigul et al., 2001; Carducci et al., 2003).

A cultura de células, apesar de permitir que ensaios de quantificação viral sejam realizados, não é capaz de caracterizar sorotipos de vírus, o que é possível por testes imunológicos ou moleculares (Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

Métodos imunológicos

Entre os métodos imunológicos, a imunofluorescência, a imunoperoxidase, a quimioluminescência e a citometria de fluxo destacam-se como técnicas altamente específicas usadas no acompanhamento de processos de recuperação e detecção de vírus isolados em culturas de células a partir de amostras de água (Mehnert & Stewien, 1993; Mehnert et al., 1997; Li et al., 1998; Greening et al., 1999; Wyn-Jones & Sellwood, 2001). Entre estes, a quimioluminescência é até dez vezes mais sensível que os outros métodos utilizados na detecção de vírus em água (Greening et al., 1999).

Métodos moleculares

O uso de ensaios moleculares, particularmente da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), tem permitido novos avanços na detecção e controle de vírus entéricos presentes na água. A PCR é uma técnica utilizada para amplificar seqüências de ácidos nucleicos virais através de reação enzimática, mesmo quando as partículas virais estão presentes em pequenas quantidades em amostras de água (Abbaszadegan et al., 1999; Carducci et al., 2003).

Comparada com a cultura de células utilizada para detecção de vírus, a PCR apresenta várias vantagens: o tempo requerido por esse ensaio pode ser reduzido de dias ou semanas para horas, os custos para execução dessa técnica são substancialmente menores, além de ser uma metodologia mais fácil de ser realizada e que apresenta alta especificidade e sensibilidade (Gilgen et al., 1997; Abbaszadegan et al., 1999; Schvoerer et al., 2000; Abbaszadegan, 2001; Gofiti-Laroche et al., 2001; Frost et al., 2002; Carducci et al., 2003).

Além disso, este método facilita a identificação de vírus patogênicos fastidiosos, que não crescem bem em ensaios de cultura de células, como rotavírus, calicivírus, HAV e alguns adenovírus, assim como amplia as informações já disponíveis para enterovírus, que apresentam bom crescimento em culturas celulares (Abbaszadegan et al., 1999; Schvoerer et al., 2000; Wyn-Jones & Sellwold, 2001; Carducci et al., 2003).

Dessa forma, a análise de amostras de águas por PCR e confirmadas por hibridização por *Southern-blot* ou *nested* PCR, geralmente usados para aumentar a sensibilidade e confirmar a especificidade do ensaio PCR, tem evidenciado a presença de HAV, rotavírus, norovírus e enterovírus de poços nos EUA (Borchardt et al., 2003; Abbaszadegan et al., 1999); de enterovírus, rotavírus, astrovírus, calicivírus e HAV de áreas de recreação para banho, de torneiras e de sistemas de tratamento de esgoto na França (Gofiti-Laroche et al., 2001; Schvoerer et al., 2001; Schvoerer et al., 2000); de enterovírus, rotavírus e pequenos vírus arredondados do rio Aare em Berne, na Suíça, e de enterovírus e calicivírus em água de beber nesse país (Gilgen et al., 1997; Häfliger et al., 1999); de enterovírus e adenovírus de torneiras na Coreia do Sul (Lee & Kim, 2002); de rotavírus, adenovírus e HAV de esgotos, córregos e poços no Brasil (Sassaroli et al., 2000; Keller & Gonçalves, 2001; Queiroz et al., 2001; Santos et al., 2001; Garrafa et al., 2003; Martins et al., 2003; Pauli et al., 2003).

No estudo dos vírus em água, a principal desvantagem apontada em relação à técnica PCR é sua incapacidade de distinguir vírus viáveis ou potencialmente infecciosos de vírus não viáveis ou não infecciosos que apresentam o genoma viral livre após a lise (Mehnert et al., 1997; Bosch, 1998; Abbaszadegan et al., 1999; Gofiti-Laroche et al., 2001; Schvoerer et al., 2001; Li et al., 2002; Carducci et al., 2003).

A técnica de PCR detecta principalmente partículas virais intactas e não o genoma viral despreendido após a lise, pois o ácido nucléico livre tem uma estabilidade menor no ambiente, apesar de ser detectado mesmo quando os vírus estão inativados por desinfecção química, calor ou proteases presentes na água (Gilgen et al., 1997; Carducci et al., 2003).

A PCR, mesmo não sendo um procedimento perfeito para indicar partículas virais infecciosas, ainda é considerada por alguns autores como uma boa técnica de monitoramento de contaminação viral de amostras ambientais, por ser um método rápido, prático, de baixo custo e muito sensível (Abbaszadegan et al., 1999; Gofiti-Laroche et al., 2001; Carducci et al., 2003).

Outra desvantagem da PCR ou RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa), voltada para detecção de vírus em água, é sua limitação mediante certos inibidores da enzima da reação tais como: proteínas, carboidratos, ácidos húmico e fúlvico e outros compostos orgânicos que possam estar presentes nas amostras de águas concentradas. Torna-se necessária, portanto, a remoção dos inibidores antes da detecção de vírus. Técnicas que começam com diálise, seguida de extração com solvente, ultrafiltração e purificação das amostras, têm mostrado resultados satisfatórios na remoção de inibidores e também na detecção de vírus pela técnica de PCR. Entretanto, alguns métodos aplicados têm afetado a capacidade de recuperação de vírus (Gilgen et al., 1997; Ijzerman et al., 1997; Greening et al., 1999; Queiroz et al., 2001; Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

A PCR convencional, monoplex, não é capaz de detectar vários tipos de vírus simultaneamente em uma mesma amostra de água analisada, pois utiliza um tipo de *primer* para cada grupo viral investigado, comprometendo, dessa forma, a praticidade do método, além de tornar a pesquisa mais demorada e onerosa. Na PCR multiplex, usa-se uma mistura de diferentes *primers* para detectar vários tipos virais simultaneamente em única amostra, o que torna o método mais rápido e econômico que a PCR monoplex. Apesar disso, é mais susceptível à contaminação, visto que os *primers* utilizados nesta mistura podem interferir uns nos outros e, assim, dificultar a pesquisa de três ou mais tipos de vírus quando realizada ao mesmo tempo (Egger et al., 1995; Wyn-Jones & Sellwood, 2001; Li et al., 2002).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os progressos laboratoriais na habilidade de concentrar e detectar vírus entéricos a partir de amostras de água de diferentes origens permitiram ampliar, de modo considerável, os conhecimentos na área da virologia ambiental (Marques, 1991; Mehnert, 2001). No entanto, alguns questionamentos têm surgido como consequência desses avanços (Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

Os métodos de concentração ainda apresentam muitas controvérsias quanto ao volume de água necessário a ser coletado, à eliminação de componentes inibidores e à eficiência de recuperação das partículas virais (Clesceri et al., 1998). É necessário, portanto, que esses métodos continuem sendo desenvolvidos e testados para que as metodologias disponíveis possam ser modificadas e melhoradas, de modo que permitam a detecção adequada de patógenos virais veiculados pela água (Clesceri et al., 1998; Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

Os métodos de detecção molecular representam um passo significativo em termos de diagnóstico, quando comparados aos métodos convencionais inicialmente usados no estudo da virologia aquática (Theron & Cloete, 2002). Contudo, estes ensaios precisam ser melhorados em relação ao reconhecimento da infecciosidade viral, principalmente quando empregados em casos de monitoramento de contaminação viral e de avaliações de risco quantitativas com

patógenos que não crescem em culturas de células (Wyn-Jones & Sellwood, 2001; Carducci et al., 2003).

Através de análises de genotipagem, vários genótipos virais têm sido isolados em águas. Estes estudos são de importância fundamental para determinar a circulação de patógenos virais entéricos no ambiente aquático, a origem de vírus entéricos animais transmitidos para humanos através de veiculação hídrica e a poluição da água por material fecal humano (Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

De fato, é necessário quem tenham continuidade pesquisas que busquem o desenvolvimento de um protocolo molecular simples, eficiente e acessível para ser utilizado na rotina da avaliação virológica da água (Theron & Cloete, 2002), como também para o estabelecimento de um indicador viral “universal” que seja capaz de monitorar a presença de todos os vírus patogênicos e de garantir uma boa qualidade da água destinada ao consumo humano em termos de segurança virológica (Bosch, 1998).

ABSTRACT

Enteric viruses vehiculated by water: microbiological aspects and water quality control

Human enteric viruses cause important waterborne diseases. These pathogens are excreted with the feces of infected individuals in large numbers, and many of them tend to be persistent in aquatic environment and are also able to survive in water in an infectious state form for months. Such agents show more resistance to current procedures used in water and sewage treatment for bacterial removing and could contaminate water for human consumption. The bacterial coliform group indicators fail to give a reliable clue of virological quality of water because the viruses are more resistant to many of standard methods used in the control of the traditional bacterial pathogens. Large volumes of water samples and concentration methods with a high virus recovery rate are necessary to detect them in environmental samples because these pathogens are obligate intracellular parasites and can not multiply in these samples. Besides that, they are in a low number in water samples. Some enteric viruses are fastidious microorganisms and can not grow easily in routine traditional methods as the cell culture, hence, the use of more sensitive detection techniques is necessary, which demand complex implementations. With the recent progresses in laboratorial techniques concerning viral concentration methods and the discovery of highly sensitive molecular methods, as polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription (RT)–PCR, the number of investigations in aquatic virology field have been increased. Therefore, this will give the possibility of the elaboration and adopting of warning and preventive tools that will minimize the water contamination with viruses. Up to date, these measures are used in occasional emergence control situations by sanitary authorities.

KEYWORDS: Water. Enteric viruses. PCR. Review.

REFERÊNCIAS

1. Abbaszadegan M. Advanced detection of viruses and protozoan parasites in water. *Rev Biol Biotech I*: 21-26, 2001.
2. Abbaszadegan M, Stewart P, LeChevallier M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol* 65: 444-449, 1999.
3. Alves NC, Odorizzi AC, Goulart FC. Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília, SP. *Rev Saúde Pública* 36: 749-751, 2002.
4. Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of “Norwalk-like viruses”. *J Infect Dis* 181: 336-348, 2000.
5. Appleton H. Control of food-borne viruses. *Br Med Bull* 56: 172-183, 2000.
6. Beuret C. A simple method for isolation of enteric viruses (noroviruses and enteroviruses) in water. *J Virol Methods* 107: 1-8, 2003.
7. Borchardt MA, Bertz PD, Spencer SK, Battigelli DA. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 69: 1172-1180, 2003.
8. Bosch A. Human enteric viruses in water environment: a minireview. *Internatl Microbiol I*: 191-196, 1998.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n° 1469 de 29 de dezembro de 2000. Norma da Qualidade da Água para Consumo Humano. Capítulo IV Do Padrão de Potabilidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2 jan. 2001.
10. Carducci A, Casini B, Bani A, Rovini E, Verani M, Mazzoni F, Giuntini A. Virological control of groundwater quality using biomolecular tests. *Water Sci Technol* 47: 261-266, 2003.
11. Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardi R, Martin M, Bofill-Mas S, Girones R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 9: 448-454, 2003.
12. Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD. Microbiological Examination – Detection of enteric viruses. In: *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, p. 9-131. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF). Washington, 20th Ed., 1998.
13. Coelho C, Santos C, Simões CMO, Barardi CRM. Standardization of RT-PCR and cell culture techniques for hepatitis A virus (HAV) detection in oysters. *Virus Reviews and Research* 4 : Abstract n. E-352, p.158, 1999.
14. De Serres G, Cromeans TL, Levesque B, Brassard N, Barthe C, Dionne M, Prud’homme H, Paradis D, Shapiro CN, Nainan OV, Margolis HS. Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. *J Infect Dis* 179: 37-43, 1999.
15. Egger D, Pasamontes L, Ostermayer M, Bienz K. Reverse transcription multiplex PCR for differentiation between polio- and enteroviruses from clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol* 33: 1442-1447, 1995.
16. Estes MK. Rotaviruses and their replication, p. 1625-1655. In: *Virology*, p. 655-712. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.2. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.
17. Frost FJ, Kunde TR, Craun GF. Is contaminated groundwater an important cause of viral gastroenteritis in the United States? *J Environ Health* 65: 9-14, 2002.
18. Garrafa P, Barrella KM, Monezi TA, Hársi CM, Brighetti JMP, Mehnert DU. Evaluation of virological, bacteriological and physico-chemical parameters of well-water at the rural area of São José do Rio Preto, SP. *Virus Reviews and Research* 8: Abstract n. EV 2, p.100, 2003.
19. Gilgen M, Germann D, Lüthy J, Hübner Ph. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A, and small round structured viruses in water samples. *Int J Food Microbiol* 37: 189-199, 1997.
20. Gofti-Laroche L, Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Joret JC, Harteman Ph, Seigneurin JM, Zmirou D. A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study). *Water Sci Technol* 43: 39-48, 2001.

21. Greening GE, Woodfield L, Lewis GD. RT-PCR and chemiluminescent ELISA for detection of enteroviruses. *J Virol Methods* 82: 157-166, 1999.
22. Griffin DW, Gibson CJ 3rd, Lipp EK, Riley K, Paul JH 3rd, Rose JB. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. *Appl Environ Microbiol* 65: 4118-4125, 1999.
23. Häfliger D, Hübner Ph, Lüthy J. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int J Food Microbiol* 54: 123-126, 1999.
24. Heerden JV, Ehlers MM, Van Zyl WB, Grabow WOK. Incidence of adenoviruses in raw and treated water. *Water Res* 37: 3704-3708, 2003.
25. Hollinger FB, Ticehurst. Hepatitis A Virus. In: *Virology*, p. 735-782. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.1. Lippincott-Raven, 3rded., Philadelphia, USA, 1996.
26. Horwitz MS. Adenoviruses. In: *Virology*, p. 2149-2171. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.2. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.
27. Hot D, Legeay O, Jacques J, Gantzer C, Caudrelier Y, Guyard K, Lange M, Andréoletti L. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res* 37: 4703-4710, 2003.
28. Ijzerman MM, Dahling DR, Fout GS. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 63: 145-153, 1997.
29. Kapikian AZ, Chanock RM. Rotaviruses. In: *Virology*, p. 1657-1708. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.2. Lippincott-Raven, 3rded., Philadelphia, USA, 1996.
30. Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM. Norwalk group of viruses. In: *Virology*, p. 783-810. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.1. Lippincott-Raven, 3rded., Philadelphia, USA, 1996.
31. Keller R, Gonçalves RT. Molecular techniques monitoring rotavirus in wastewater treatment plants. *Virus Reviews and Research* 6: Abstract n. EV 4, p.96, 2001.
32. Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, DuPont HL, Secor SL, Bitsura JA, Gary GW, Hoff JC. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 50: 261-264, 1985.
33. Kittigul L, Khamoun P, Sujirarat D, Utrarachkij F, Chitpirom K, Chaichantanakit N, Vathanophas K. An improved method for concentration rotavirus from water samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 1-7, 2001.
34. Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit Rev Microbiol* 28: 371-409, 2002.
35. Lee SH, Kim SJ. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res* 36: 248-256, 2002.
36. Lee SH, Levy DA, Craun GF, Beach MJ, Calderon RL. Surveillance for waterborne-disease outbreaks – United States, 1999-2000. *MMWR Surveill Summ* 51: 1-47, 2002.
37. Ley V, Higgins J, Fayer R. Bovine enterovirus as indicators of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol* 68: 3455-3461, 2002.
38. Li JW, Wang XW, Rui QY, Song N, Zhang FG, Ou YC, Chao FH. A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *J Virol Methods* 74: 99-108, 1998.
39. Li JW, Wang XW, Yuan CQ, Zheng JL, Jin M, Song N, Shi XQ, Chao FH. Detection of enteroviruses and hepatitis A virus in water by consensus primer multiplex RT-PCR. *World J Gastroenterol* 8: 699-702, 2002.
40. Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 9: 90-96, 2003.
41. Marques E. *A importância do estudo da presença e detecção de vírus em água e alimentos*. In: IV Simpósio Brasileiro de Microbiologia de Alimentos, 2 a 5 abr. 1991; Goiânia/GO. p.129-130.

42. Marques RG. *Ocorrência de coliformes e Salmonella em águas de irrigação de hortaliças nos municípios de Goiânia e Aparecida de Goiânia, Goiás*. Goiânia [Tese de Mestrado em Medicina Tropical – IPTSP/UFG], 2003.
43. Martins SS, Tonetto PA, Stefanutti R, Gatti MSV, Coraucci Filho B, Mehnert DU. Viral particles removal from urban wastewater by anaerobic process and overland flow system treatment. *Virus Reviews and Research 8*: Abstract n. EV 1, p. 99-100, 2003.
44. Matsui SM, Greenberg HB. Astroviruses. In: *Virology*, p. 811-824. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.1. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.
45. Mehnert DU. Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Laboratório de vírus entéricos humanos e animais. *Vírus no meio ambiente*. Universidade de São Paulo, 2003. Disponível em: http://icb.usp.br/~dumehmert/linha_de_pesquisa.html. Acesso em: 13 ago. 2003.
46. Mehnert DU. *Vírus no ambiente aquático e o impacto da poluição por água de esgoto*. In: V CAEB – Unicamp 2001, São Paulo/SP. Disponível em: <http://icb.usp.br/~dumehner/publicações.html>. Acesso em: 13 ago. 2003.
47. Mehnert DU, Queiroz APS, Pauli V; Monezi TA, Hársi CM. Virus: a new parameter for determination of water quality. *Virus Reviews and Research 6*: 67, 2001.
48. Mehnert DU, Queiroz APS, Santos FM, Candeias JMG, Hársi CM. Occurrence of human enteric viruses in sewage and surface waters in the city of São Paulo. *Virus Reviews and Research 4*: 27, 1999.
49. Mehnert DU, Stewien KE. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol 59*: 140-143, 1993.
50. Mehnert DU, Stewien KE, Hársi CM, Queiroz APS, Candeias JMG, Candeias JAN. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. *Mem Inst Oswaldo Cruz 92*: 97-100, 1997.
51. Meirelles-Pereira F, Pereira AMS, Silva MCG, Gonçalves VD, Brum PR, Castro EAR, Pereira AA, Esteves FA, Pereira JAA. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bactéria of importance to human infections. *Braz J Microbiol 33*: 287-293, 2002.
52. Melnick JL. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: *Virology*, p. 655-712. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.1. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.
53. Nogueira G, Nakamura CV, Tognim MCB, Abreu Filho BA, Dias Filho BP. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities, Brazil. *Rev Saúde Pública 37*: 232-236, 2003.
54. Pauli V, Monezi TA, Mosca X, Garrafa P, Hársi CM, Mehnert DU. Distribution of rotavirus G1-G5 genotypes in domestic effluent and creek in São Paulo city from 2000 to 2001. *Virus Reviews and Research 8*: Abstract n. EM 2, p.93, 2003.
55. Payment P. *Waterborne viruses and parasites: resistance to treatment and disinfection*. In: OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water. Available from: Interlaken'98: 1-11, 1998.
56. Pringle CR. Virus taxonomy. *Arch Virol 144*: 421-429, 1999.
57. Purcell, RT. Hepatitis E Virus. In: *Virology*, p. 2831-2843. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.2. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.
58. Queiroz APS, Santos FM, Sassaroli A, Hársi CM, Monezi TA, Mehnert DU. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Appl Environ Microbiol 67*: 4614-4618, 2001.
59. Reynolds KA, Gerba CP, Pepper IL. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR. *Appl Environ Microbiol 62*: 1424-1427, 1996.
60. Rigotto C, Sincero TCM, Simões CMO, Barardi CRM. Proposal for the use of adenoviruses as bioindicators for human viral contamination in cultivated oysters. *Virus Reviews and Research 8*: Abstract n. EV 4, p.101, 2003.
61. Rueckert RR. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: *Virology*, p. 609-654. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.1. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.

62. Saneamento de Goiás S/A (SANEAGO). Qualidade da água. Tratamento da água. *Sistemas de tratamento da água*. SANEAGO, 2002. Disponível em: <http://www.saneago.com.br/wwsan/quali/tratamento.htm>. Acesso em: 29 ago. 2003.
63. Santos CS, Rigotto C, Coelho C, Simões CMO, Barardi CRM. Semi-nested RT-PCR and cell culture for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. *Virus Reviews and Research 4*: Abstract n. E-351, p.158, 1999.
64. Santos FM, Vieira MJ, Hársi CM, Mehnert DU. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) for characterization of adenoviruses present in wastewater samples in São Paulo city, Brazil. *Virus Reviews and Research 6*: Abstract n. EV 7, p.98, 2001.
65. Sassaroli A, Garrafa P, Santos FM, Hársi CM, Vieira MJ, Monezi TA, Barardi CRM, Mehnert DU. Detection of hepatitis A in wastewater samples in São Paulo city, Brazil. *Virus Reviews and Research 5*: Abstract n. HE 1, p.100, 2000.
66. Schvoerer E, Bonnet F, Dubois V, Cazaux G, Serceau R, Fleury HJA, Lafon ME. PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in southwestern France. *Res Microbiol 151*: 693-701, 2000.
67. Schvoerer E, Ventura M, Dubos O, Cazaux G, Serceau R, Gournier N, Dubois V, Caminade P, Fleury HJA, Lafon ME. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Res Microbiol 152*: 179-186, 2001.
68. Shenk T. Adenoviridae: The viruses and their replication. In: *Virology*, p. 2111-2148. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.2. Lippincott-Raven, 3rded., Philadelphia, USA, 1996.
69. Straub TM, Chandler DP. Towards a unified system for detection waterborne pathogens. *J Microbiol Methods 53*: 185-197, 2003.
70. Theron J, Cloete TE. Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, and detection tools. *Crit Rev Microbiol 28*: 1-26, 2002.
71. Vasconcelos SMS, Serafini AB. Ocorrência de indicadores de poluição no Rio Meia Ponte e Ribeirão João Leite, Goiás: coliformes totais e fecais. *Rev Patol Trop 31*: 175-193, 2002.
72. Vieira RHSF, Catter KM, Sampaio SS, Rodrigues DP, Theophilo GND, Fonteles-Filho AA. The stormwater drain system as a pollution vector of the seashore in Fortaleza (Ceará State, Brazil). *Braz J Microbiol 33*: 294-298, 2002.
73. Vinatea CB, Spagnol WP, Simões CMO, Barardi CRM. Study of the contamination ratio of cultivated oysters by poliovirus using bioaccumulation assay. *Virus Reviews and Research 7*: Abstract n. EV 3, p.95, 2002.
74. Vinjé J, Deijl H, van der Heide R, Lewis D, Hedlund KO, Svensson L, Koopmans MPG. Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. *J Clin Microbiol 38*: 530-536, 2000.
75. Wyn-Jones AP, Sellwood J. A review: Enteric viruses in aquatic environment. *J Appl Microbiol 91*: 945-962, 2001.