PATRÍCIA GARRAFA

**Avaliação da qualidade virológica do efluente
doméstico tratado e disponibilizado para reúso
na cidade de São Paulo**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Microbiologia).

São Paulo

2009

PATRÍCIA GARRAFA

**Avaliação da qualidade virológica do efluente
doméstico tratado e disponibilizado para reúso na
cidade de São Paulo**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Dolores Ursula
Mehnert

São Paulo

2009

RESUMO

Garrafa P. Avaliação da qualidade virológica do efluente doméstico tratado e disponibilizado para reúso na cidade de São Paulo [tese de doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade virológica da água de reúso produzida em uma das estações de tratamento de esgoto da cidade de São Paulo. Durante o período de janeiro de 2005 a novembro de 2006 um total de 354 amostras, 177 de esgoto bruto (15 L) e 177 de tratado (100 L), foram coletadas duas vezes por semana e concentradas por filtração através de membrana eletropositiva (ZP60S). O eluato foi concentrado por ultracentrifugação e em seguida as amostras foram tratadas por Vertrel-XF, e o genoma viral foi extraído para a detecção de adenovírus, rotavírus, norovírus e vírus da hepatite A. A detecção por PCR e/ou RT-PCR revelou a presença de rotavírus em 47,4% das amostras de esgoto tratado, com prevalência do genótipo G1; adenovírus foram detectados em 47,8% das amostras, sendo 40% da espécie F, responsável pelos casos de gastroenterite; o vírus da hepatite A foi detectado em 32,4%. Já no esgoto bruto, os índices de positividade viral foram maiores para rotavírus (81,7%), adenovírus (80,8%) e vírus da hepatite A (39,2%). A presença de norovírus não foi determinada em nenhum dos efluentes. A infectividade de rotavírus e adenovírus foi avaliada por cultivo em células e os rotavírus foram também quantificados por reação de imunoperoxidase direta. Os resultados mostraram redução no número de partículas após o tratamento, mas sua presença se manteve bastante elevada considerando-se que a dose infectante deste vírus é baixa (1-10 partículas). A reação de PCR em tempo real foi padronizada para quantificação de vírus não cultiváveis, ou de difícil cultivo como os VHA. Com base nos resultados obtidos, foi verificada a ocorrência e a distribuição anual de cada vírus no efluente tratado e disponibilizado para reúso.

Palavras-chave: vírus entéricos, reúso de água, esgoto, reação em cadeia pela polimerase (PCR), rotavírus, vírus da hepatite A.

ABSTRACT

Garrafa P. Evaluation of virological quality of treated wastewater available for urban reuse in Sao Paulo city, Brazil [PhD thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The aim of this study was to evaluate the virological quality from one Sewage Treatment Plant in the state of São Paulo. From January 2005 to November 2006, a total of 354 samples, 177 of raw sewage (15 L) and 177 treated (100 L) were collected twice a week and concentrated by filtration through positively charged microporous filters (ZP60S). The eluent was concentrated by ultracentrifugation and then the samples were treated with Vertrel-XF. The viral genome was extracted for the detection of adenovirus, rotavirus, noroviruses and hepatitis virus A. PCR and/or RT-PCR assays showed the rotavirus in 47.4% of treated sewage samples, with prevalence of genotype G1; adenovirus were detected in 47.8% of the samples, which 40% are species F responsible for gastroenteritis; hepatitis A virus was detected in 32.4% of the samples. For the raw sewage, the rates of viral positivity were higher for rotavirus (81.7%), adenovirus (80.8%) and hepatitis A virus (39.2%). Norovirus was not detected in any effluents. The infectivity of rotavirus and adenovirus was analyzed by cell culture and rotavirus was also quantified by direct immunoperoxidase assay. The results showed reduction in the number of the particles after treatment, but remained high because the infecting dose of this virus is low (1-10 particles). The real time PCR assay was standardized for quantification of non-cultivable viruses, or viruses that are difficult to cultivate, as the VHA. Based on these results, we analyzed the occurrence and annual distribution for each virus in the treated effluent and available for reuse.

Key words: viruses, waster reuse, polymerase chain reaction (PCR), rotavirus, hepatitis A virus.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Distribuição de água no planeta

Estimativas recentes apontam que o Planeta Terra tenha cerca de 1,4 bilhão de km³ de água. Desse volume, 97,5% é de água salgada e somente 2,5% de água doce. A maior parte da água doce, 68,7%, está estocada nas calotas polares e geleiras; 30,1% estão no subsolo e apenas 0,27% está acessível ao uso humano e de ecossistemas em lagos e rios (Setti et al., 2001; Shiklomanov, 2000).

O volume de água existente no planeta tem se mantido constante nos últimos 500 milhões de anos. Entretanto, há uma crescente demanda de água devida tanto ao aumento da população quanto às atividades humanas. Enquanto a população da Terra cresceu aproximadamente três vezes no século XX, o volume de água utilizado aumentou de seis a sete vezes. Assim, o aumento da demanda de água e seu uso indiscriminado têm levado, em alguns casos, ao esgotamento total da água de rios, açudes, lagos e aquíferos subterrâneos (Setti et al., 2001; UNESCO, 2003). Outros fatores também corroboram para a escassez de água, dentre os quais se destaca a distribuição dos recursos hídricos e da população, que não ocorre de forma homogênea nos diversos países do mundo, gerando, desta forma, cenários adversos quanto à disponibilidade hídrica em diferentes regiões (UNESCO, 2003).

Um estudo sobre a avaliação global da gestão da água na agricultura revelou que uma em cada três pessoas enfrenta problemas decorrentes da escassez de recursos hídricos (WHO, 2006). Cerca de 1,2 bilhão de pessoas, ou seja, quase um quinto da população mundial, vive em áreas de escassez física da água (áreas desérticas, de elevada pressão demográfica, poluição excessiva, ou consumo em níveis insustentáveis), 500 milhões de pessoas estão se aproximando desta situação e 1,6 bilhão de pessoas, ou quase um quarto da população mundial, enfrentam escassez econômica de água por falta de infra-estrutura necessária para captar a água de rios e aquíferos (UNESCO, 2003).

Pesquisas sobre a taxa de consumo de água em 118 países indicam que cerca de um terço da população mundial estará vivendo em áreas com moderada ou séria falta de água até o ano 2025 (Seckler et al., 1999; Setti et al., 2001). No Brasil, a existência de um rico sistema de recursos hídricos, de superfície e subterrâneo tem dado uma falsa idéia de abundância, que serviu durante muitos anos como incentivo à cultura do desperdício. Entretanto, a distribuição dos recursos hídricos ao longo do território brasileiro não ocorre de forma homogênea entre

os estados, tampouco em relação aos locais de maior densidade populacional (Tucci et al., 2001).

Do total de água doce do Brasil, 70% estão na região amazônica, habitada por menos de 5% da população. A disponibilidade hídrica por habitante varia grandemente de estado para estado. Por exemplo, no estado de Roraima, a disponibilidade hídrica *per capita* é de 1.500.488 m³/hab./ano, enquanto no estado de São Paulo é de 2.694 m³/hab./ano; no estado do Rio de Janeiro, é de 2.208 m³/hab./ano, chegando a 1.270 m³/hab./ano no estado de Pernambuco (Sete et al., 2001; Tucci et al., 2001). Desta forma, os problemas de escassez hídrica no Brasil decorrem, fundamentalmente, da combinação entre o crescimento exagerado das demandas localizadas e da degradação da qualidade das águas, consequência dos desordenados processos de urbanização, industrialização e expansão agrícola (Tucci et al., 2001).

Assim, muitas cidades brasileiras já enfrentam problemas relacionados ao abastecimento, dentre elas a cidade de São Paulo, que pode ser considerada uma das mais afetadas, devido à escassez relativa de recursos hídricos, em consequência de seu desenvolvimento ter ocorrido em área de manancial de cabeceira, da alta demanda para abastecer seu parque industrial e de sua elevada densidade populacional. Para minimizar esse problema, torna-se necessária, cada vez mais, a captação de água em locais distantes para fornecimento à população (Hespanhol, 2002; Tucci et al., 2001).

Alternativas mais efetivas vêm sendo estudadas para solucionar o problema da escassez de água como, por exemplo, a obtenção de outras fontes hídricas, a dessalinização de água, e o tratamento de esgotos domésticos e sua utilização para fins não potáveis, que se mostra atualmente uma solução promissora, adotada em diversos países (Hespanhol, 2002).

1.2 Reúso¹ de água e a escassez hídrica

A Agenda 21 nos capítulos 18, 21 e 30 destaca a importância do reúso da água, que pode contribuir de forma significativa para a conservação dos corpos hídricos, como uma alternativa para diminuir a crise no abastecimento, se realizado de modo consciente e dentro de parâmetros previamente estabelecidos (Hespanhol, 2002).

A prática do reúso consiste no reaproveitamento da água, tratada ou não, para diversos fins, os quais irão depender das características locais onde este será adotado, de decisões

¹ Na literatura nacional e internacional pode se observar o emprego do termo reúso de águas residuárias (wastewater reuse). Aqui, de maneira geral, serão empregados os termos reúso da água, utilização de esgotos tratados ou esgoto tratado.

políticas, disponibilidade, etc. Existem diversas formas potenciais de reúso, como o reúso direto e o indireto, para fins potáveis, não potáveis, agrícolas e industriais (Harwood et al., 2005).

A qualidade da água utilizada e o objeto específico do reúso definirão os níveis de tratamento recomendados, os critérios de segurança, os custos de operação e manutenção do sistema (Hespanhol, 2002). O reúso planejado da água faz parte de um programa global coordenado pela Organização das Nações Unidas (ONU) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

1.2.1 Modalidades de reúso da água

As modalidades de reúso variam consideravelmente nos diversos países onde esta prática é adotada, cada órgão regulador adota uma classificação, não existindo um padrão único. A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1973) classifica o reúso de águas em direto, indireto (intencional e não intencional) e reciclagem interna.

- Reúso indireto: a água já utilizada, uma ou mais vezes, para uso doméstico ou industrial é descarregada no meio ambiente, portanto, sendo diluída, e novamente utilizada a jusante. A OMS diferencia o reúso indireto intencional do não intencional, estabelecendo que, quando o reúso indireto decorre de descargas planejadas a montante, ou a recargas planejadas no aquífero subterrâneo, ele é designado reúso indireto intencional.
- Reúso direto: os efluentes são tratados com finalidades específicas como irrigação, uso industrial, recarga de aquífero e água potável.
- Reciclagem interna: reúso da água no âmbito das instalações industriais, tendo como objetivo a economia de água e o controle da poluição.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* - USEPA) divide o reúso de águas em categorias, descritas a seguir (USEPA, 1992).

- Reúso urbano irrestrito: irrigação de áreas onde o acesso do público não é restrito, tais como parques, jardins escolares e residenciais; descarga de sanitários, proteção contra incêndio, construção civil e fontes ornamentais.
- Reúso urbano restrito: irrigação de áreas nas quais o acesso de pessoas pode ser controlado, tais como campo de golfe, cemitérios e canteiros de rodovias.

- Reúso agrícola de culturas alimentícias: irrigação de safras de alimentos que são destinadas para consumo humano direto, muitas vezes classificados como alimentos de consumo cru.
- Reúso agrícola de culturas não alimentícias: irrigação de forragem para gado, fibras, sementeiras, viveiros e aquicultura.
- Reúso recreacional irrestrito: represas e lagos onde nenhuma limitação é imposta ao contato direto em atividades recreacionais como natação e mergulho.
- Reúso recreacional restrito: represas e lagos de água aproveitada na qual a recreação é limitada à pesca, canoagem e outras atividades de contato indireto.
- Reúso ambiental: criação de lagos artificiais e sustentação de vazões.
- Reúso industrial: uso em instalações industriais como sistema de refrigeração, reposição de água, água para caldeiras e água de processo.
- Reúso para recarga de aquífero: reposição de aquífero, controle de salinidade e de níveis do lençol freático.

No Brasil, o Centro Internacional de Referência em Reúso de Água (CIRRA), localizado na cidade de São Paulo, classifica os tipos de reúso e suas aplicações como reúso agrícola, urbano, industrial, meio ambiente e recarga de aquíferos (CIRRA, 2002). Segundo Brega Filho e Mancuso (2002) o reúso da água pode ocorrer de forma direta ou indireta, por meio de ações planejadas ou não planejadas. Já a Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES) classifica o reúso de água em duas grandes categorias, potável e não potável.

Reúso potável

- Reúso Potável direto: quando o esgoto recuperado, por meio de tratamento avançado, é diretamente reutilizado no sistema de água potável.
- Reúso Potável indireto: caso em que o esgoto, após tratamento, é disposto na coleção de águas superficiais ou subterrâneas para diluição, purificação natural e subsequente captação, tratamento e finalmente utilizado como água potável.

Reúso não potável

- Reúso não potável para fins agrícolas: irrigação de plantas alimentícias (árvores frutíferas, cereais etc.) e plantas não alimentícias (pastagens e forrações), além de ser aplicável para dessedentação de animais.
- Reúso não potável para fins industriais: abrange os usos industriais de refrigeração, águas de processo, para utilização em caldeiras, etc.

- Reúso não potável para fins recreacionais: irrigação de plantas ornamentais, campos de esportes, parques e implantação de lagos ornamentais, etc.
- Reúso não potável para fins domésticos: rega de jardins, descargas sanitárias e utilização desse tipo de água em grandes edifícios.
- Reúso para manutenção de vazões: a manutenção de vazões de cursos de água promove a utilização planejada de efluentes tratados, visando a uma adequada diluição de eventuais cargas poluidoras a eles carregadas, incluindo-se fontes difusas, além de propiciar uma vazão mínima na estiagem.
- Aquicultura: consiste na produção de peixes e plantas aquáticas visando à obtenção de alimentos e/ou energia, utilizando os nutrientes presentes nos efluentes tratados.
- Recarga de aquíferos subterrâneos: é a reposição de água dos aquíferos subterrâneos com efluentes tratados. Este pode ocorrer de forma direta, pela injeção sob pressão, ou de forma indireta, utilizando-se águas superficiais que tenham recebido descargas de efluentes tratados a montante.

1.2.2 Reúso no Brasil e no mundo

O reúso de água tem sido uma opção importante adotada por inúmeros países para o gerenciamento dos recursos hídricos, principalmente por países situados no Oriente Médio e no Norte da África, os quais consideram o esgoto parte integrante de seus recursos hídricos (Hespanhol, 1999).

Na Europa o reúso é realizado em inúmeros países, dentre os quais se destacam Itália, Espanha e França. A Itália, por exemplo, aumentou seu interesse pelo reúso desde a década de 80, quando uma importante vazão de efluentes tratados foi utilizada e disponibilizada para indústria e para agricultura. Na Espanha, a prática do reúso é de extrema importância em muitas regiões do país, devido à seca e à falta de reservas hídricas. A França possui uma longa tradição no que se refere ao reúso agrícola. Na década de 90, o interesse com relação à reutilização da água aumentou, dando origem a vários tipos de aplicação, e em 1996 o país lançou seu manual de recomendações técnicas para a prática do reúso (CMHC, 2005; Toze, 1997).

No Japão, o reúso é praticado desde 1968, na tentativa de minimizar a demanda da água, em resposta à grave seca de 1978 e também como alternativa para solucionar os problemas referentes à disposição dos efluentes. O efluente tratado gerado visa atender as

demandas urbanas não potáveis como, descarga sanitária, uso industrial e aumento das vazões de rios (Asano et al., 1996; CMHC, 2005).

Apesar de o reúso planejado ser difundido e utilizado mundialmente, no Brasil essa prática não é adotada de forma ampla. Existem poucos relatos de reúso planejado de efluentes tratados em diversas atividades. Entretanto, apesar da possibilidade de transmissão de doenças, águas contaminadas por efluentes municipais vêm sendo utilizadas indiscriminadamente para a irrigação de hortaliças sem que haja fiscalização adequada (Duarte, 2006).

Atualmente, o reúso planejado de efluentes é uma realidade em algumas cidades do Estado de São Paulo e está voltado para diversas atividades, como resfriamento de caldeiras, lavagem de ruas, irrigação de parques temáticos e de culturas agrícolas, entre outras (Duarte, 2006; SABESP, 2008).

O reúso urbano planejado é realizado pela Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo (SABESP) nos municípios de Barueri, Carapicuíba, São Caetano do Sul e São Paulo. A água produzida nas estações de tratamento de esgoto é utilizada para vários fins, como a lavagem de ruas após as feiras-livres, irrigação de jardins e assentamento de pó em canteiros de obras (SABESP, 2008).

Na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Barueri, por exemplo, uma parte da água de reúso é utilizada no processo de refrigeração de equipamentos da estação, além de assentamento de pó em canteiros de obras. Próximo a esta ETE, um novo projeto de instalação de núcleo industrial está em vias de ser implementado, que prevê a utilização da água de reúso para limpeza de pátios, veículos, e resfriamento de caldeiras, e no próprio processo industrial (SABESP, 2008).

No município de São Caetano do Sul, a água produzida na ETE é reutilizada para lavagem de ruas e pátios, irrigação de áreas verdes, desobstrução de rede de esgotos e águas pluviais e lavagem de veículos (SABESP, 2008).

O reúso planejado de água representa a possibilidade de ganhos pela economia de investimentos e pela comercialização de efluentes que são atualmente descartados. A partir de soluções tecnológicas apropriadas, toda essa água pode ser fornecida para usos específicos, poupando-se grandes volumes de água potável (Hespanhol, et al., 2002; PROSAB, 2006; SABESP, 2008; Toze, 1997; USEPA, 2004).

1.2.3 Regulamentações e recomendações para o reúso, aspectos microbiológicos

As normas ou orientações para a utilização do esgoto doméstico tratado para diversos fins são observadas em inúmeros países e variam de acordo com o tipo de aplicação, contexto regional e percepção de risco global. No entanto, o ponto de partida para qualquer aplicação é garantir a saúde pública. Por esta razão, os parâmetros microbiológicos têm recebido grande atenção na regulamentação da reutilização da água (PROSAB, 2006; USEPA, 2004).

Desde a década de 70 a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem se dedicado ao estabelecimento de critérios e recomendações de saúde para a utilização de esgotos sanitários, tendo sido realizadas duas atualizações, em 1989 e, posteriormente, no ano de 2006 (WHO, 1973; WHO, 1989; WHO 2006a, b).

Em 1989, os critérios básicos e as diretrizes estabelecidas para a reutilização de efluentes líquidos na agricultura restringiam-se à sugestão de padrões bacteriológicos e parasitológicos. As recomendações baseavam-se na conclusão de que os principais riscos do reúso em países em desenvolvimento estavam associados às doenças provocadas por helmintos. Segundo o PROSAB (2006) os critérios abordados pela OMS, publicados em 1989 e vigentes até recentemente, são considerados relativamente rigorosos em relação à remoção de helmintos, sendo estes menos rigorosos no tocante à qualidade bacteriológica e omissos em relação aos vírus e protozoários, sob o argumento de estarem fundamentados em evidências epidemiológicas.

Ao longo do contínuo processo de avaliação das diretrizes da OMS foram incorporadas ferramentas de avaliação de risco, resultando na publicação das novas diretrizes para a utilização de águas residuárias na agricultura (WHO 2006 a). As novas diretrizes passaram a considerar a presença de patógenos virais como um fator de risco. Para tanto, foram elaborados modelos de exposição utilizando rotavírus como modelo, assumindo que a remoção necessária deste patógeno garantiria suficiente proteção contra infecções causadas por bactérias e protozoários.

A Tabela 1 apresenta as diretrizes atualizadas recomendadas pela OMS para o reúso agrícola de esgotos sanitários.

Tabela 1. Diretrizes microbiológicas recomendadas pela OMS, para o reúso agrícola de esgotos sanitários

Irrigação	Opção	Tipo de irrigação e cultura	⁽¹⁾ remoção patógenos (log ₁₀)	Qualidade do efluente	
				<i>E. coli</i> / 100 mL	Ovos de helmintos/L
Irrestrita		Cultivo de raízes e tubérculos			
	A		4	< 10 ³	
	B	Cultivo de folhosas	3	<10 ⁴	
	C	Irrigação localizada de plantas que se desenvolvem distantes do nível do solo	2	<10 ⁵	
	D	Irrigação localizada de plantas que se desenvolvem rentes ao nível do solo	4	<10 ³	<1
Restrita	E	Qualidade de efluentes alcançável com o uso de técnicas de tratamento, como, tratamento secundário + coagulação + filtração + desinfecção	6 ou 7	<10 ¹ ou 10 ⁰	
	F	Agricultura de baixo nível tecnológico e mão de obra intensiva	4	< 10 ⁴	
	G	Agricultura de alto nível tecnológico e altamente mecanizada	3	<10 ⁵	
	H	Técnicas de tratamento com reduzida capacidade de remoção de patógenos, (tanques sépticos ou reatores UASAB) associada ao uso de técnicas de irrigação com elevado potencial de minimização da exposição (irrigação subsuperficial)	< 1	<10 ⁶	<1

Legenda: ⁽¹⁾ remoção de vírus que associada a outras medidas de proteção à saúde corresponderia à uma carga de doenças virais tolerável $\leq 10^6$ e riscos menores de infecções bacterianas e por protozoários.

Fonte: adaptado de PROSAB (2006); WHO (2006)

Nos Estados Unidos, a USEPA elaborou um manual intitulado *Guidelines for water reuse*, para ajudar as agências reguladoras no desenvolvimento de programas para a reutilização da água, não substituindo as legislações existentes em cada estado. Esse manual elaborado no ano de 1992 passou por atualizações, dando origem à versão atualizada de 2004 (USEPA, 2004).

A USEPA, além de classificar o reúso de efluentes em categorias, sugere os requisitos mínimos de qualidade para cada tipo de aplicação, bem como o tratamento requerido. Os parâmetros microbiológicos e tipos de tratamento sugeridos para as categorias de reúso de esgoto estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros microbiológicos e tipos de tratamento sugeridos para as categorias de reúso de esgoto municipal.

Categoria de reúso	Tratamento	Parâmetro microbiológico Coliformes termotolerantes/ 100 mL
Reúso urbano irrestrito	Secundário, filtração, desinfecção	ND/100 mL
Reúso urbano restrito	Secundário e desinfecção	< 200/100 mL
Reúso agrícola de culturas alimentícias ⁽¹⁾	Secundário, filtração, desinfecção	ND/100 mL
Reúso agrícola de culturas não alimentícias	Secundário e desinfecção	< 200/100 mL
Reúso recreacional irrestrito	Secundário, filtração, desinfecção	ND/100 mL
Reúso recreacional restrito	Secundário e desinfecção	< 200/100 mL
Reúso ambiental	Variável, geralmente secundário e desinfecção	< 200/100 mL
Reúso industrial	Secundário ou secundário e desinfecção, depende do uso específico (coagulação química e filtração podem ser necessárias)	< 200/100 mL
Reúso para recarga de aquíferos	Primário para infiltração e percolação. Secundário para injeção direta	Variável, dependendo do local e dos usos da água

Legenda: ND não detectável; ⁽¹⁾ Culturas alimentícias processadas comercialmente são aquelas que recebem processamento físico ou químico, prévio à comercialização, suficiente para a destruição de patógenos.

Fonte: adaptado USEPA (2004); PROSAB (2006).

Apesar das recomendações da USEPA, o estabelecimento de normas é de responsabilidade dos estados individuais, os quais assumem diferentes abordagens (Blumenthal et al., 2000; CMHC, 2005). A maioria dos estados tem publicado normas ou orientações para um ou mais tipos de reúso da água, exigindo processos específicos de tratamento ou adotando critérios de qualidade específicos. Alguns estados exigem ambos (USEPA, 2004).

O estado da Califórnia foi o primeiro a desenvolver regulamentações para a utilização de esgotos sanitários na agricultura em 1918 (PROSAB, 2006). Atualmente, os critérios vigentes estão sob o *Título 22 do código da Califórnia*, criado em 1978. Os critérios adotados são considerados os mais rigorosos, e baseiam-se principalmente na eficiência do tratamento disponibilizado para a reciclagem da água, de forma que, de acordo com a finalidade do reúso, o esgoto deve ser tratado por processos específicos, para que sejam atingidos valores aceitáveis de parâmetros físico-químicos e microbiológicos estipulados pelo Departamento de Saúde Pública do Estado da Califórnia (CDHS) (USEPA, 2004).

Apesar de o estado da Califórnia não possuir parâmetros definidos para a análise de patógenos virais, este recomenda para a reutilização de efluentes para represamento o

tratamento terciário e o monitoramento de coliformes fecais e totais, bem como o monitoramento de organismos patogênicos, como vírus entéricos e criptosporídeo. O monitoramento deve ser realizado mensalmente nos doze primeiros meses e, em seguida, trimestralmente. O acompanhamento contínuo pode ser interrompido após os primeiros dois anos de funcionamento com a aprovação do CDHS (CMHC, 2005).

Na Tabela 3 são apresentadas as diretrizes contidas no código da Califórnia para reúso em agricultura e paisagismo.

Tabela 3. Diretrizes contidas no código da Califórnia para a prática do reúso na agricultura e paisagismo.

Tipos de Reúso	Tratamento	Parâmetros microbiológicos
Irrigação de cultura de grãos, plantas forrageiras, ração para animais, jardins e vinhedos.	Primário	-
Irrigação de pastagens para gado leiteiro, campos de golf, cemitério, canteiros centrais de auto-estradas, cinturões verdes e lagos recreacionais paisagísticos	Secundário e desinfecção por cloro	Coliformes totais $\leq 23/100$ mL
Lagos recreativos de acesso restrito	Secundário e desinfecção	Coliformes totais $\leq 2,2/ 100$ mL
Irrigação de culturas alimentícias, parques, playgrounds, gramados de pátios escolares e para lagos recreativos de acesso restrito	Secundário, filtração e desinfecção	Coliformes totais $\leq 2,2/ 100$ mL

Fonte: adaptado de CMHC, 2005

A Tabela 4 apresenta os parâmetros microbiológicos, número mais provável (NMP) de coliformes fecais e totais, adotados em vários estados americanos. Porém, somente o estado do Arizona apresenta parâmetros virais definidos para o reúso da água. Os outros estados apenas sugerem o monitoramento para vírus, pois os valores a serem atingidos ainda precisam ser definidos por cálculos de risco (CMHC, 2005).

Tabela 4. Parâmetros microbiológicos usados por vários estados americanos.

Rota de exposição	Coliformes totais por 100 mL		Coliformes fecais por 100 mL		⁽¹⁾ Vírus entérico por 40 L	
	Número	Valores	Número	Valores	Número	Valores
Irrigação por spray	4	2,0 – 100	3	2,2 – 200	1	1
Irrigação subsuperficial	2	100	9	10 – 1.000	0	-
Parques e playgrounds	8	2,2 – 100	3	10 – 100	1	125
Campos de golf e espaços abertos	6	2, 2 – 1.000	5	0 – 100	0	-

Legenda: ⁽¹⁾ Arizona é o único estado que possui parâmetros estabelecidos para vírus

Fonte: adaptado de CMHC, 2005.

As normas e recomendações da OMS, USEPA e a Título 22 da Califórnia (EUA) têm servido de referência e são adotados como normas em diversos países, seja como mera cópia ou adaptada às características locais.

As orientações da OMS de 1989 têm servido como direcionamento para inúmeros países, incluindo países pertencentes à União Européia, como a França, por exemplo, que adota categorias para o reúso da água, classificando-o em A, B e C, além de empregar limites microbiológicos semelhantes. Contudo, difere na adição de regras rigorosas de aplicação do efluente. Para a categoria A, por exemplo, nas orientações francesas, o requisito de qualidade deve ser complementado através da utilização de técnicas de irrigação evitando o contato do efluente com as frutas e hortaliças.

Outros países têm modificado os critérios sugeridos pela OMS, adaptando-os às suas condições econômicas. O México, por exemplo, introduziu padrões menos restritivos, tornando viável sua implementação com os recursos e tecnologias disponíveis no país, com valores de ≤ 5 ovos de nematóide/L, e uma média diária de ≤ 2.000 coliformes fecais/100 mL para irrigação irrestrita (Blumenthal et al., 2000).

De forma geral, observa-se que a maioria dos países desenvolvidos estabeleceu baixo risco para a saúde pública, com base em orientações ou normas, utilizando tecnologias e abordagens geralmente de alto custo, como as normas da Califórnia. Por outro lado, uma série de países em desenvolvimento preconiza uma estratégia de controle de riscos para a saúde pública através da adoção de tecnologias de baixo custo e abordagens baseadas nas recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) (CMHC, 2005; USEPA, 2004).

Em muitos países, incluindo os Estados Unidos, os órgãos reguladores ainda adotam exclusivamente coliformes fecais e coliformes totais como indicadores para avaliar a qualidade microbiológica da água. Entretanto, estudos têm demonstrado que a ausência de coliformes fecais não é um indicador fiel para a ausência de patógenos importantes, como protozoários e vírus (Bosch et al., 2008; CMHC, 2005; Yates et al., 2007). Desta forma, o que vem sendo abordado é a necessidade de que patógenos virais e protozoários, assim como coliformes fecais e helmintos, também devam ser usados como indicadores da qualidade microbiológica da água potável, recreacional e “água de reúso” (Bosch et al., 2008).

A necessidade de monitoramento desses patógenos se deve ao fato de estes oferecerem elevado risco à saúde pública, por causarem infecção em baixas doses, especialmente em pessoas imunodeprimidas, idosos, crianças, etc. Além disso, são de difícil remoção e inativação por processos convencionais de tratamento e ainda resistem por vários meses ou por anos no meio ambiente (Carter, 2005; Cisneros et al., 2001; Crockett, 2007).

Em 1998, o adenovírus foi incluído na "Lista de Candidatos Contaminantes", pela USEPA, dentre outros, como, por exemplo, os calicivírus e os coxsackievírus. Os adenovírus foram incluídos devido às suas implicações para a saúde pública e sua freqüente ocorrência em inúmeros ambientes aquáticos (Bosch et al., 2008; Crockett, 2007; Wyn-Jones e Sellwood 2001).

Atualmente países como Tasmânia e Austrália são os únicos países que possuem parâmetros definidos para vírus, mostrados na Tabela 5.

Como pode ser observado nesta mesma Tabela, para algumas jurisdições, como a Tasmânia, não existe um padrão específico para parâmetros microbiológicos, porém este estado exige acompanhamento de parasitas e patógenos virais, pelo menos, duas vezes ao ano.

Tabela 5. Locais com parâmetros definidos para vírus

Locais	Parâmetro microbiológico			
	<i>E. coli</i> / 100 mL	Helmintos	Protozoários	Vírus
Austrália (Aurora - reuso classe A)	10	1/ L	-	1/ 50L
Tasmânia ^(a)	< 10	^(b) 2 x ano	^(b) 2 x ano	^(b) 2 x ano
Havaí	< 2,2	-	-	< 1/40L
Arizona	< 2,2	-	-	<1/40 L

Legenda: ^(a) Quantidade de partículas virais por litro, não estipuladas; ^(b) Análise duas vezes ao ano.

Fonte: CMHC, 2005

A regulamentação da prática do reúso no Brasil ocorreu a partir da publicação da Resolução N. 54, de Novembro de 2005, pelo Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH), que estabelece modalidades, diretrizes e critérios gerais para a prática do reúso direto não potável de água. De acordo com essa resolução, a prática do reúso de água favorece a racionalização e a conservação de recursos hídricos, conforme princípios estabelecidos na Agenda 21. Entretanto, remete à necessidade de regulamentação complementar de padrões de qualidade e códigos de práticas para as diversas modalidades de reúso, para fins agrícolas e florestais; reúso para fins urbanos; reúso para fins ambientais; reúso para fins industriais e reúso na agricultura. Portanto, a regulamentação do reúso da água encontra-se em pleno curso no Brasil (BRASIL, 2006; PROSAB, 2006).

Todavia, o reúso deve ser realizado de forma criteriosa e consciente para não gerar mais problemas às cidades, especialmente no setor de saúde, e para que a economia nos cofres públicos proporcionada por sua prática não tenha que ser redirecionada para cobrir custos com a saúde de munícipes, decorrentes da disseminação de doenças de veiculação hídrica como

hepatites, gastroenterites, eczemas, meningite, etc (Fong e Lipp, 2005; USEPA, 2004). Essa preocupação se deve ao fato de o esgoto urbano doméstico servir como matéria-prima usada no reúso urbano para fins não potáveis. Assim, o risco envolvendo o reúso urbano para fins não potáveis está diretamente relacionado aos patógenos presentes no esgoto doméstico e à resistência destes aos tratamentos de água (Crockett, 2007).

1.3 O Esgoto doméstico como matriz para gerar água de reúso

O termo esgoto define tanto a tubulação condutora das águas servidas de uma comunidade como, também, o próprio líquido que flui pelas tubulações. Esse termo é usado para caracterizar os efluentes provenientes de diversas modalidades do uso de água, tais como as de uso doméstico, comercial, hospitalar, industrial, de utilidade pública, de áreas agrícolas, de superfície, de infiltração, pluviais e outras fontes (Chagas, 2000).

O esgoto doméstico provém principalmente de residências, edifícios comerciais, instituições ou quaisquer edificações que contenham instalações de banheiros, lavanderias, cozinhas, ou qualquer dispositivo de utilização de água para fins domésticos (PROSAB, 2006). Sua composição é formada principalmente por proteínas (40-60%), carboidratos (25-50%), óleos e gorduras (10%), além de outros componentes como a uréia derivada da urina e traços de diversos compostos orgânicos como pesticidas, surfactantes, fenóis e poluentes, compostos de benzeno (benzeno, etilbenzeno) e compostos clorados (clorobenzeno, tetracloroetano, tricloroetano) (Bitton, 1997). A matéria orgânica, especialmente fezes humanas, confere as principais características ao esgoto, cuja composição é bastante variável, apresentando maior teor de impurezas durante o dia, ou seja, em horários mais comuns para banho e trabalhos domésticos, e menores durante a noite (Bitton, 1997; Mehnert, 1988).

No esgoto doméstico são encontrados inúmeros patógenos de extrema importância epidemiológica, como vírus, cistos de protozoários, ovos de helmintos e bactérias patogênicas (Bitton et al., 1997b; Bosch, 1998; Carter, 2005; Crockett, 2007; Gerba e Smith, 2005; Griffin et al., 2003; Haas et al., 1999).

A Tabela 6 apresenta uma indicação geral do número dos principais patógenos encontrados no esgoto.

Tabela 6. Principais patógenos eliminados presentes no esgoto bruto e seus respectivos sintomas

Patógenos	Doenças ou sintomas causados no organismo	Número microrganismos por grama de fezes	Número por 100 mL de esgoto
Vírus			
Enterovírus (poliovírus, coxsackevírus, e echovírus)	Infecção respiratória, meningites, diarreia, encefalites, paralisia	$10^3 - 10^7$ ^a	180 – 500.000
Rotavírus	Diarreia, vômito, dores abdominais	10^{10}	400 – 85.000
Adenovírus	Infecção respiratória e gastroenterites	10^{10}	^(b) Não enumerado
Norovírus	Diarreia e vômito	10^{12}	^(b) Não enumerado
Hepatite A	Hepatite	10^8	^(b) Não enumerado
Bactérias			
<i>Campylobacter</i> spp.	Gastroenterite		$10^4 - 10^5$
<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica	Gastroenterite (organismo indicador)	$10^7 - 10^9$	$10^6 - 10^7$
<i>Salmonella</i> spp.	Febre tifóide e gastroenterite	^(a) Não enumerado	0,2 – 8.000
<i>Shigella</i> spp.	Disenteria bacilar	^(a) Não enumerado	0,1 – 1.000
<i>Yersinia</i> spp	Gastroenterite aguda		$6 \times 10^4 - 8 \times 10^4$
<i>Ascaris</i> spp.	Distúrbios digestivos e dores abdominais	^(a) Não enumerado	0,5-11
<i>Vibrio cholera</i>	Cólera	^(a) Não enumerado	^(b) Não enumerado
Helmintos (ovo)			
<i>Ancylostoma</i> spp.e <i>Necator</i> sp.	Anemia	^(a) Não enumerado	0,6 -19
<i>Trichuris</i> spp.	Diarreia	^(a) Não enumerado	1-4
<i>Trichuris</i> spp.	Dores abdominais, diarreias, anemia, perda de peso	^(a) Não enumerado	1 – 4
<i>Taenia solium</i>	Teníase, cisticercose	^(a) Não enumerado	^(b) Não enumerado
<i>Taeniorhynchus saginata</i> (antigamente denominada <i>Taenia saginata</i>)	Teníase	^(a) Não enumerado	^(b) Não enumerado
Protozoários			
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disenteria amebica	^(a) Não enumerado	0,4
<i>Cryptosporidium parvum</i> (oocistos)	Gastroenterite	$10^6 - 10^7$	0,1 – 39
<i>Giardia lamblia</i> (cistos)	Diarreia	$10^5 - 10^7$	12,5 – 20.000

Legenda : ^(a) Patógenos presentes nas fezes dos indivíduos infectados, dados não disponíveis; ^(b) Patógenos importantes presentes no esgoto, ainda precisam ser corretamente enumerados.

Fonte: Bitton et al. (1997b); Bosch, (1998); Crockett (2007) ; Gerba e Smith, 2005 ; Griffin et al. (2003); Haas et al. (1999); Höller (1988).

Os tipos e a quantidade de agentes patogênicos presentes nos esgotos variam muito, dependendo da incidência da doença na população, bem como da sazonalidade das infecções (Carter, 2005).

1.4 Tratamento de esgoto

A escolha entre as diversas alternativas disponíveis é ampla e depende de diversos fatores, entre eles: a área disponível para implantação da ETE, volumes diários a serem tratados, variações da vazão de esgotos, características do corpo receptor de esgotos tratados, etc (Tonani, 2008).

O tratamento de esgoto pode ser dividido em níveis de acordo com o grau de remoção de poluentes que se deseja atingir, compreendendo de três a quatro etapas, denominadas tratamento preliminar, primário, secundário e terciário ou avançado (Bitton, 1997a; FUNASA, 2004).

O tratamento preliminar, constituído por processos físicos, remove fragmentos e materiais grosseiros através da retenção por grelhas de crivos grossos, além da separação da água residual e da areia, a partir da utilização de caixas de areia para retenção deste material (Bitton, 1997a). A remoção dos grandes sólidos e areia protege as demais unidades de tratamento, os dispositivos de transporte (bomba e tubulações) e os corpos receptores. A remoção da areia previne, ainda, a abrasão nos equipamentos e tubulações e facilita o transporte dos líquidos. Por outro lado, os tanques de flotação funcionam como alternativa para retirada de óleos e graxas em casos de esgoto industrial com alto teor destas substâncias (Biton, 1997a; FUNASA, 2004)

O tratamento primário é constituído por processos físico-químicos. Nesta etapa o esgoto ainda contém sólidos em suspensão não grosseiros cuja remoção pode ser feita em unidades de sedimentação (processos de floculação e sedimentação, utilizando um sedimentador primário), reduzindo a matéria orgânica contida no efluente. Os sólidos sedimentáveis e flutuantes são retirados através de mecanismos físicos. Os esgotos fluem vagarosamente, permitindo que os sólidos de maior densidade em suspensão sedimentem gradualmente no fundo, formando o lodo primário bruto. O lodo resultante deste tratamento está sujeito a um processo de digestão anaeróbia num digestor anaeróbio ou tanque séptico. Os materiais flutuantes como graxas e óleos, de menor densidade, são removidos na superfície. A eliminação média da DBO é de 30% (Gerba, 2000).

O tratamento secundário consiste de processos unitários biológicos (lodo ativado, lagoas de estabilização), seguidos de processos físico-químicos. Nessa etapa normalmente ocorre a remoção de sólidos e matéria orgânica não sedimentável e, eventualmente, a remoção de nutrientes como nitrogênio e fósforo por processos biológicos, que podem ser aeróbios ou anaeróbios (Bitton, 1997a). Os processos aeróbios podem utilizar sistema de lodo ativado,

lagoas aeróbias com macrófitas, leitos de percolação ou biodiscos, enquanto que os processos anaeróbios utilizam lagoas ou digestores anaeróbios (Bitton, 1997a).

O processo físico-químico é constituído por um ou mais sedimentadores secundários, onde ocorre a sedimentação dos flocos biológicos, de onde o líquido sai isento de sólidos ou flocos biológicos. Os lodos resultantes desse tratamento são secados em leitos de secagem ou filtros prensa (Bitton, 1997).

Dentre os processos de tratamento de esgoto, o sistema de lodos ativados é um dos mais utilizados. Nesse sistema, o efluente proveniente do decantador primário é bombeado para um tanque de aeração onde o esgoto é agitado com o ar injetado e uma massa líquida de microrganismos contida no efluente. Nesta etapa, a remoção da matéria orgânica é realizada pelas bactérias que crescem no tanque de aeração e formam uma biomassa a ser sedimentada no decantador. O lodo do decantador secundário é retornado, por bombeamento, ao tanque de aeração, para aumentar a eficiência do sistema. O oxigênio é fornecido por aeradores mecânicos superficiais ou por tubulações de ar no fundo do tanque. Tais sistemas podem operar continuamente ou de forma intermitente, e quase não produzem maus odores, insetos ou vermes. A eliminação de DBO alcança entre 85 e 98% e a de organismos patogênicos entre 60 e 90%. A instalação requer área reduzida, no entanto, necessita de diversos equipamentos, como aeradores, elevatórias de recirculação, raspadores de lodo, misturador de digestor, etc (Bitton, 1997a).

O tratamento terciário é constituído unicamente por processos físico-químicos. Nesta fase ocorre a remoção complementar de microrganismos patogênicos, de DBO, nutrientes e poluentes específicos, e desinfecção dos esgotos tratados (Bitton, 1997).

O processo de desinfecção é um dos mais importantes, pois tem como objetivo garantir a proteção à saúde pública. É nesta etapa que ocorre a inativação dos microrganismos patogênicos presentes no efluente, minimizando, portanto, o risco de proliferação de doenças de veiculação hídrica para os usuários do corpo d'água receptor e para o ambiente. Além de ser um mecanismo primário de destruição de organismos patogênicos, as técnicas de desinfecção podem promover a oxidação da matéria orgânica no esgoto, remover ferro e manganês, assim como eliminar gosto e odor (Bitton, 1997a). Existem vários tipos de desinfetantes de ação física, fotoquímica ou química que podem ser empregados na desinfecção de esgotos sanitários (Gerba, 2000).

A retenção dos microrganismos por filtração (membranas sintéticas ou areia) é um método de desinfecção física utilizado normalmente em combinação com outras técnicas visando aumentar eficiência do tratamento. Já a aplicação de calor, que tem ação dissecante

nos microrganismos, não é praticada em tratamento de esgotos devido ao seu alto custo (Acher et al., 1997).

A radiação ultravioleta e a radiação solar são os agentes desinfetantes de ação fotoquímica utilizados com certa frequência na desinfecção de esgoto sanitário, apesar de ainda serem considerados alternativos (Crockett, 2007; USEPA, 2004). A inativação dos microrganismos pelo uso da radiação UV se dá em nível cromossômico, pois a radiação penetra na célula e é absorvida pelos ácidos nucleicos, interrompendo a sua reprodução e sua capacidade de causar infecção. A radiação também pode afetar as proteínas das células, causando morte aos microrganismos (Crockett, 2007).

Os agentes desinfetantes químicos mais utilizados são os oxidantes que, por causarem danos à parede celular, interferir na biossíntese ou inibir a atividade enzimática dos microrganismos, acabam por destruir ou impossibilitar a reprodução dos patógenos (Crockett, 2007). O mais comumente utilizado é o cloro na forma líquida, gasosa ou sólida. A cloração é o processo de desinfecção de menor custo, no entanto, apresenta a desvantagem de gerar subprodutos tóxicos, como organoclorados (Lapoli et al., 2005; PROSAB, 2006).

O cloro residual livre e combinado é o agente ativo da desinfecção que reage quimicamente com substratos orgânicos e inorgânicos, e seu uso em águas de abastecimento é necessário para que não ocorram novas contaminações por organismos patogênicos (PROSAB, 2006).

Entre os vírus entéricos, os norovírus, seguido do vírus da hepatite A são mais resistentes à inativação por cloro, permanecem 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, sendo inativados com tratamento de cloro de 10 mg/L e 5mg/L respectivamente (Appleton, 2000).

A presença de material orgânico na água protege as partículas virais da inativação, principalmente por ação de desinfetantes. Desde que a adsorção de vírus às partículas sólidas em suspensão nas águas foi proposta, alguns estudos foram realizados com o objetivo de detectar o número de vírus adsorvidos a estes sólidos, assim como estabelecer um método de eluição. Cerca de 68% dos vírus presentes no esgoto bruto estão adsorvidos às partículas sólidas, e um estudo realizado por Rao et al., demonstrou que o SiRV-A/SA11 pode sobreviver dessa forma por até 19 dias. (Mehnert, 1988).

Estudos apontam que o tratamento por lodos ativados reduz em 95% os vírus presentes no esgoto. No entanto, muitos vírus podem permanecer viáveis, contaminando outros corpos hídricos, onde são despejados. Os níveis de contaminação podem atingir até 100 PFU/L em

casos mais graves e 1/10 PFU/100 L em casos mais brandos (Bloch et al., 1990; Gerba et al., 1985; Jothikumar et al., 2000; Pina et al., 2001; Scipioni et al., 2000).

A Tabela 7 apresenta estimativas da eficiência esperada nos diversos níveis de tratamento incorporados em uma ETE.

Tabela 7. Estimativas da eficiência esperada nos diversos níveis de tratamento de esgoto.

Tipo de tratamento	% de remoção			
	Matéria orgânica (DBO)	Sólidos em suspensão (SS)	Nutrientes	Bactérias
Preliminar	5 – 10	5 – 20	Não remove	10 – 20
Primário	25 – 50	40 – 70	Não remove	25 – 75
Secundário	80 – 95	65 – 95	Pode remover	70 – 99
Terciário	40 – 99	80 – 99	Até 99	Até 99,999

Fonte: CETESB, 1988

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.

Asano (1984) observou que, para atingir a remoção eficiente de vírus dois critérios principais devem ser cumpridos. O efluente deve possuir baixo teor de sólidos suspensos e turbidez antes do processo de desinfecção, para evitar a blindagem de vírus, que tendem a aderir ao material particulado. Além disso, uma demanda suficiente de cloro ou outro agente desinfetante deve ser aplicada.

Apesar de o tratamento ser eficiente na remoção de alguns patógenos, em diversos estudos já foi comprovada a existência de vírus entéricos humanos no efluente de esgoto doméstico mesmo depois de um tratamento secundário, o qual inclui cloração (Feachem et al., 1981; Leong, 1983; Margolis et al., 1997; Rusin et al., 2000), favorecendo a contaminação do ambiente e, por consequência, da população, podendo, assim, vir a desencadear doenças de grande importância epidemiológica como gastroenterites, hepatites, poliomielite e meningites assépticas (Crockett, 2007). Portanto, fica claro que o esgoto doméstico necessita obrigatoriamente de um tratamento antes de ser reutilizado.

1.5 Doenças de veiculação hídrica

As doenças de veiculação hídrica são transmitidas principalmente através da ingestão de água contaminada, pela rota fecal-oral, sendo a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo (WHO, 2006). Estas doenças têm grande impacto socioeconômico, tanto em países em

desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, entretanto a gravidade e a prevalência da doença são maiores em regiões com ambientes altamente contaminados com dejetos fecais humanos, contendo protozoários, helmintos, bactérias patogênicas e patógenos virais, e seu número e distribuição no esgoto e em águas poluídas dependem tanto da carga viral da doença na população, quanto da disponibilidade de tratamentos adequados de esgoto (Metcalf et al., 1995).

Um dos fatores importantes na compreensão das doenças de veiculação hídrica refere-se ao número de microrganismos (ou dose infectante) necessários para causar infecção ou doença, o qual dependerá do agente patogênico específico, das condições de exposição e da suscetibilidade do hospedeiro, ou seja, de seu estado imunológico (Teunis, 1999). Contudo, é importante salientar que os indivíduos raramente vivenciam um encontro isolado com um agente patogênico, e os efeitos de múltiplas e simultâneas exposições a patógenos são mal compreendidos (Bosch et al., 2008).

Dentre os patógenos responsáveis pelas inúmeras doenças de veiculação hídrica, os vírus merecem destaque devido à sua alta resistência aos fatores ambientais e a alguns métodos de tratamento, bem como a sua baixa dose infectante (Bosch et al., 2008). A dose infectante para patógenos virais é de aproximadamente 1 a 10 unidades formadoras de placa (UFP) (Haas et al., 1999; Teunis et al., 1999).

Muitos grupos de vírus podem habitar o intestino humano e replicar-se nas células epiteliais que cobrem as vilosidades. Entretanto, apenas alguns causam dano suficiente para resultar em gastroenterite ou em alguma outra doença. O termo "vírus entéricos" engloba todos os grupos de vírus que podem estar presentes no trato gastrointestinal, e podem provocar doenças ou infecção, que pode ser assintomática ou sintomática. Sendo eliminado nas fezes, estes também estarão presentes no esgoto doméstico, entretanto, por serem considerados parasitas intracelulares obrigatórios, não podem se multiplicar no ambiente (Bosch et al., 2008, Carter, 2005).

Os vírus podem ser transmitidos por uma variedade de rotas, incluindo contato direto e indireto, transmissão por vetores, e veículos de transmissão (Carter, 2005; Christovão et al., 1967; Holmes, 1990; Rao e Melnick, 1986). A Figura 1 ilustra as possíveis rotas de transmissão aquática de vírus entéricos.

Figura 1. Rotas de transmissão de vírus entéricos no meio ambiente.
Fonte: Adaptado de Metcalf et al. (1995).

A água e o esgoto doméstico podem estar contaminados por aproximadamente 150 tipos de vírus entéricos humanos, que são excretados em grande número nas fezes dos indivíduos infectados (Bosch et al., 2008; Carter, 2005; Fong e Lipp, 2005; Gerba e Smith, 2005).

Indivíduos com diarreia ou hepatite podem excretar de 10^5 a 10^{11} partículas virais por grama de fezes (Carter, 2005). Além disso, em um simples episódio de vômito, um indivíduo infectado por norovírus pode eliminar cerca de 30 milhões de partículas virais (Bosch et al., 2008). Esses vírus são responsáveis por um amplo espectro de doenças, tais como erupções cutâneas, febre, infecções respiratórias, conjuntivite, gastroenterites e meningites (Bitton, 1997b; Bosch, 1998; Carter, 2005; Fong e Lipp, 2005). A Tabela 8 apresenta os principais patógenos virais encontrados no esgoto, bem como suas características morfológicas e doenças relacionadas.

Tabela 8. Patógenos virais, classificação, características gerais e principais infecções associadas.

Família	Gênero	Genoma	Diâmetro	Principais vírus	Infecções associadas
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovírus</i>	DNA dupla fita	70-90 nm	Adenovírus humano	Infecções respiratórias, oculares, urinárias, gastroenterites
<i>Polyomaviridae</i>	<i>Poliomavirus</i>	DNA dupla fita	42-45 nm	JC BK	Leucoencefalopatia multifocal progressiva Nefropatia, cistites hemorrágica,
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	RNA	27-30 nm	Poliovírus Coxsackievírus A e B Echovírus humanos Vírus da hepatite A Parechovírus 1 e 2	Infecção do sistema nervoso, oculares e respiratórias, meningite asséptica, pericardite, miocardite, febre e erupções na pele. Hepatite A Gastroenterite, infecções respiratórias
	<i>Hepatovirus</i> <i>Parechovirus</i>				
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i> <i>Sapovirus</i>	RNA	35-40 nm	Vírus de Norwalk Vírus de Sapporo	Gastroenterite Gastroenterite
<i>Em processo de classificação</i>	<i>Vírus da Hepatite E</i>	RNA	28 -32 nm	Vírus da Hepatite E	Hepatite E
<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i> <i>Rotavírus</i>	RNA	65-80 nm	Reovírus Rotavírus Humanos	Gastroenterite Gastroenterite
<i>Astroviridae</i>	<i>Astrovírus</i>	RNA	28 nm	Astrovírus	Gastroenterite
<i>Parvoviridae</i>	<i>Parvovirus</i>	DNA		Parvovírus humano	Gastroenterite

Fonte: Bitton, 1997b; Fong e Lipp, 2005.

Inúmeros estudos documentaram a presença de vírus entéricos em água de abastecimento bruta e tratada, no efluente de esgoto doméstico e no lodo de estações de tratamento de esgoto (Abbaszadegan et al., 1999; Garrafa, 2001; Keswick et al., 1984; Keswick et al., 1990; Mehnert e Stewien, 1993; Mehnert et al., 1997; Payment, 1981; Sassaroli, 2002).

Villena et al. (2003) estudando amostras de esgoto na cidade do Cairo, Egito (novembro de 1998 a outubro de 1999), e na cidade de Barcelona, Espanha (novembro de 1998 a dezembro de 2002) detectaram rotavírus em 85,7% e 66,9% das amostras de ambas as cidades, respectivamente. Embora 30% das amostras positivas do Cairo não tenham sido genotipadas foram obtidas as seguintes distribuições G1 (69,6%), G3 (13%), G4 (8,7%) e G9 (8,7%). A porcentagem de amostras não genotipáveis foi muito maior na cidade de Barcelona, sendo em 56,5% das amostras. A distribuição de amostras positivas foi de G1 (56,4%), G3 (31,5%), G9 (6%), G2 (4%) e G5 (2%).

Pina et al. (1998), analisando amostras de esgoto com metodologia semelhante à empregada no presente estudo detectaram índices de positividade para adenovírus relativamente superiores, onde adenovírus foram detectados em 14 (93%) das 15 amostras analisadas.

Cho et al. (2000) em estudo realizado na China detectaram adenovírus em 87,5% das amostras de águas de rio. Lee et al. (2002) analisando água de abastecimento obtiveram um índice de positividade de 60,9 %.

No Brasil estudos têm detectado a presença de vírus entéricos em águas de córrego e esgoto. Christovão et al. (1967) detectaram na década de 60 a presença de vírus da poliomielite tipo I e III, além de coxsakievírus em águas utilizadas na irrigação de hortas do município da cidade de São Paulo. Nos anos seguintes, um estudo realizado por Stewien (1979) detectou e quantificou *Enterovirus* em amostras de esgoto em dois subdistritos da cidade de São Paulo. Os valores obtidos por Stewien (1979) variaram de 0 a 1.365 UFP/L. Marques (1987) detectou e quantificou vírus entéricos no esgoto, tendo obtido valores de 20 a 4.490 UFP/L.

Já na década de 90, Mehnert e Stewien (1993) detectaram e quantificaram rotavírus em esgoto e córregos poluídos. Os rotavírus foram detectados em 20,6% das amostras de esgoto e 34,5% das amostras de córrego na cidade de São Paulo, com valores máximos de 63 UFF/L no esgoto e de 30 UFF/L em amostras de córrego.

Queiroz (1999), utilizando o mesmo método de concentração aplicado por Mehnert e Stewien (1993), mas associado à detecção por PCR, determinou a presença de rotavírus em

44,4% das amostras de esgoto e 46,4% das amostras de água de córrego, ao longo de doze meses, também na cidade de São Paulo.

Seguindo a mesma linha de pesquisa de Queiroz (1999), Sassaroli (2002) e Santos et al. (2004) realizaram estudos nos quais coletaram amostras provenientes dos mesmos pontos na cidade de São Paulo e analisaram a presença do vírus da hepatite A e adenovírus, respectivamente. Sassaroli (2002) detectou vírus da Hepatite A em 44,9% das amostras de esgoto e em 63% das amostras de córrego analisadas. Enquanto Santos et al. (2004) detectaram adenovírus humanos em 69,4% das amostras de esgoto e em 76,1% das de córrego, sendo 89,85% destes entéricos (HAdV-F).

1.5.1 Rotavírus

Em 1973, Bishop et al., analisando a biópsia de mucosa duodenal de lactantes e crianças pequenas com quadro severo da diarreia não bacteriana, observaram através de microscopia eletrônica partículas virais de aproximadamente 70 nm (Bishop et al., 1973a, 1973b, 1974). Nesse mesmo ano, Flewett et al. também isolaram partículas virais nas fezes de crianças com diarreia aguda, estudadas através de microscopia eletrônica, e sugeriram o nome rotavírus devido à semelhança morfológica da partícula viral com uma roda (em latim, *rota*) (Flewett et al., 1974).

1.5.1.1 Características da partícula viral e Taxonomia

Os rotavírus são vírus não envelopados, de aproximadamente 90 nm de diâmetro, com capsídeo de simetria icosaédrica, constituído por três camadas protéicas: cápside interno, intermediário e externo com 60 espículas distribuídas na superfície, contendo RNA fita dupla composto por 11 segmentos (dsRNA), que variam de 667 a 3.302 pares de bases (pb) e são responsáveis pela síntese das proteínas virais estruturais e não estruturais.

A partícula viral possui seis proteínas estruturais designadas pela sigla VP (proteína viral - VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e seis não estruturais (NPS1 a NSP5) sintetizadas nas células infectadas (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática da partícula do rotavírus humano e localização de suas proteínas não estruturais (A). Imagem de partícula de rotavírus observada ao microscópio eletrônico (aumento de 163.600X) (B).

Fontes: www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n7/fig_tab/nrmicro1692_F1.html;
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/Images/Queensun/vsd6_c.htm.

O gênero *Rotavirus* foi oficialmente reconhecido em 1976 pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*) e incluído na Família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, classificação mantida até hoje (Fauquet et al., 2007).

Atualmente, os rotavírus são divididos em cinco espécies designadas Rotavírus A a E (RV-A a RV-E), com duas possíveis espécies adicionais (RV-F e RV-G) (Fauquet et al., 2007). Desta forma, a denominação das amostras de rotavírus é feita pela abreviatura da espécie de origem, humana ou animal, da amostra, seguida da espécie de rotavírus à qual ela pertence, e do nome da amostra estabelecido pelo laboratório onde foi isolada. Assim, por exemplo, a amostra humana protótipo Hu/Wa é atualmente denominada HuRV-A/Wa, sendo que Hu refere-se à espécie de origem humana; RV-A refere-se espécie Rotavírus espécie A e Wa ao nome original da amostra (Fauquet et al., 2007).

Os rotavírus são classificados sorologicamente e molecularmente em grupos (de A a G), subgrupos e sorotipos/genótipos. As principais proteínas estruturais, VP4, VP6 e VP7, atuam como antígenos na indução de anticorpos neutralizantes, levando à resposta imunológica, e formam a base da classificação atual dos rotavírus em grupos, subgrupos e, em genótipos/sorotipos. Até o momento foram identificados sete grupos sorológicos de rotavírus, denominados de A a G, baseados em diferenças antigênicas em sítios localizados na proteína VP6

(Estes, 1996). Os rotavírus dos grupos A, B e C são encontrados tanto em humanos como em animais, enquanto que os rotavírus dos grupos D, E, F e G têm sido descritos apenas em animais (Estes e Kapikian, 2007; Fauquet et al., 2007).

Para *Rotavirus A*, a VP6 mostra também variações de subgrupos, dos quais, até o momento, foram descritos quatro: I, II, I e II e não I-não II. As variações para sorotipo/genótipo se devem à VP4 e à VP7 (Estes e Kapikian, 2007).

A proteína VP7 é glicosilada e os sorotipos determinados por esta proteína são chamados tipos G – já foram identificados quinze sorotipos/genótipos G. A proteína VP4 pode ser clivada pela protease tripsina e os sorotipos/genótipos determinados por essa proteína são chamados tipos P. A identificação dos genótipos P e G pode ser feita atualmente usando a técnicas de RT-PCR e seqüenciamento (Estes, 1996; Gouvea et al., 1994; Nakagomi et al., 1993; Parwani et al., 1993).

1.5.1.2 Estabilidade da partícula viral no meio ambiente

Diversos estudos têm demonstrado a grande resistência dos rotavírus aos fatores ambientais e aos diversos tratamentos físico-químicos empregados no tratamento de água para abastecimento e tratamento de esgoto (Estes et al., 1979; Pauli, 2003; Rao e Melnick, 1986).

Os rotavírus de origem humana são resistentes a variações de pH, sendo inativados apenas em pH 11,5 (Meng et al., 1987), concentrações de cloro entre 1,5 a 1,7 mg/L (Rao e Melnick, 1986) e ação da luz ultravioleta. A resistência à ação da luz ultravioleta provavelmente ocorre em decorrência de seu genoma de RNA de fita dupla.

1.5.1.3 Epidemiologia

O rotavírus é a causa mais freqüente de diarreia grave entre as crianças, das quais 600.000 são atingidas anualmente em todo o mundo (Estes e Kapikian, 2007). O período de incubação do rotavírus é de aproximadamente dois dias. A doença é caracterizada por vômitos e diarreia aquosa com duração média de 3 a 8 dias, contudo, febre e dor abdominal ocorrem com freqüência (Estes e Kapikian, 2007; Villena, 2003). Um efeito colateral grave é a ocorrência de intussuscepção intestinal, uma condição na qual uma porção do intestino invagina em outra porção produzindo obstrução intestinal (Nakagomi, 2000).

O principal modo de transmissão é a via fecal-oral, embora existam relatos da presença de rotavírus, mesmo que em baixos títulos, nas secreções das vias respiratórias e outros fluidos corporais. O rotavírus é estável no meio ambiente, e a transmissão pode ocorrer através da ingestão de água ou alimentos contaminados e do contato com superfícies contaminadas (Estes e Kapikian, 2007; Gerba et al., 1996).

O rotavírus é o principal responsável pelos casos de gastroenterite infantil no mundo, acometendo todos os grupos etários (Bosch et al., 2008). Nos países em desenvolvimento, estima-se a ocorrência de mais de 125 milhões de casos de gastroenterite por rotavírus em crianças ao longo do ano, sendo mais de 18 milhões considerados de moderadamente severos a severos (Gerba et al., 1996). No Brasil, os rotavírus são os principais causadores de gastroenterite infantil, sendo responsáveis pela alta taxa de morbidade e mortalidade em regiões onde a população é de baixa renda e mal nutrida. Foi descrito por Linhares et al. em 1977, que detectaram a presença de partículas virais nas fezes de duas em treze crianças com diarreia aguda, pesquisadas através de microscopia eletrônica, na cidade de Belém, Pará. Em 1978, Candeias et al. (1978) identificaram, através de técnica de contra-imunoeletroforese, 34 amostras de rotavírus de um total de 162, provenientes de crianças com diarreia aguda com até um ano de idade na cidade de São Paulo.

1.5.2 Adenovírus

Em 1953, Rowe et al., durante a manutenção de culturas primárias de adenóides e tonsilas removidas cirurgicamente de crianças, observaram a presença de um vírus desconhecido capaz de causar a degeneração celular. Em 1954, Hilleman e Werne, em um estudo envolvendo recrutas americanos com quadros de infecção respiratória, isolaram um agente capaz de induzir mudanças citopáticas em culturas de células humanas. Mais tarde, esses vírus foram relacionados como agentes da degeneração da adenóide, de infecção respiratória, da febre faringo-conjuntiva e de doença respiratória aguda. Em 1956, esses agentes foram denominados adenovírus, devido ao tecido do qual foram isolados (Enders et al., 1956).

1.5.2.1 Características da partícula viral e Taxonomia

Os adenovírus são vírus de 70 a 90 nm de diâmetro, não envelopados, de simetria icosaédrica. Seu material genético é composto por DNA de filamento duplo associado a

proteínas, contendo em média 36 Kb. O virion é constituído por onze proteínas, sete das quais estão presentes no capsídeo, que é formado por 252 subunidades chamadas capsômeros. Destes, 240 são constituídos pela proteína *hexon*, que formam as faces do icosaedro, e os 12 restantes são compostos pelas proteínas *penton-base* e fibra, que formam os vértices (Jiang, 2006). A Figura 3 apresenta um modelo esquemático da partícula viral dos adenovírus e uma micrografia de adenovírus em microscopia eletrônica.

Figura 3. Representação esquemática da partícula de adenovírus humano e localização de suas proteínas (A); Imagem de microscopia eletrônica de adenovírus (aumento de 250.000 x) (B).

Fontes: <http://home.debitel.net/user/pbuttgerit/adenoschema.htm>;
www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/Images/Queensun/vsd1_c.htm.

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), os adenovírus pertencem à família *Adenoviridae*, que pode ser filogeneticamente dividida em quatro gêneros: *Aviadenovirus*, constituído por vírus que infectam somente aves; *Siadenovirus*, constituído por vírus que infectam aves, peixes e anfíbios; *Atadenovirus*, constituído por vírus que infectam ruminantes, marsupiais e aves; e *Mastadenovirus*, constituída por vírus que infectam mamíferos (ICTV, 2008). A criação de um novo gênero tem sido discutida, pois as características de um novo adenovírus, isolado na espécie de peixe conhecida como esturjão (*Acipenser ssp.*), não se enquadram em nenhum dos gêneros existentes. Este quinto gênero seria denominado *Fishadenovirus*. (Davison et al., 2003).

O gênero *Mastadenovirus* é formado por mais de 90 sorotipos, dos quais 51 infectam humanos. Estes são divididos em 6 espécies (de A a F), baseados na homologia de DNA,

características morfológicas, propriedades biológicas e bioquímicas (ICTV, 2008). Recentemente, foi isolado um novo sorotipo de adenovírus humano (HAdV-52) que não atende às características de nenhuma espécie até hoje descrita, sendo sugerida sua classificação em uma nova espécie, G (Jones II et al., 2007). A Tabela 9 apresenta as espécies de adenovírus, seus respectivos sorotipos e as infecções geralmente relacionadas a cada espécie.

Tabela 9. Classificação dos adenovírus humanos.

Espécie	Sorotipo	Infecções mais comuns
A	12, 18, 31	Diarréia
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	Infecções do trato respiratório superior e inferior, febre faringoconjuntival
C	1, 2, 5, 6	Infecções em crianças do trato respiratório superior e inferior
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	Ceratoconjuntivite epidêmica, conjuntivite
E	4	Infecção respiratória aguda, febre faringoconjuntival
F	40, 41	Gastroenterites
Não classificado	52	

Fonte: Adaptado de Jiang (2006).

1.5.2.2 Estabilidade da partícula viral no meio ambiente

Diversos grupos de pesquisa têm apontado o HAdV como um dos candidatos a indicador viral de contaminação fecal no meio ambiente, pois este apresenta maior estabilidade que espécies de bactérias adotadas atualmente como indicadoras de contaminação fecal e outros vírus entéricos (Pina et al., 1998; Jiang, 2006; Bofill-Mass et al., 2006).

O HAdV possui elevada estabilidade à ação de agentes físicos, químicos, condições adversas de pH (faixa de 5,0 – 9,0), variações de temperatura de 4°C a 36°C, possibilitando uma permanência prolongada no meio ambiente (Jiang, 2006).

Estudos têm demonstrado que os adenovírus apresentam resistência aos tratamentos primário e secundário de esgoto, bem como ao tratamento terciário e à radiação UV no esgoto tratado (Thompson et al., 2003; Thurston- Enriquez et al., 2003).

1.5.2.3 Epidemiologia

Os adenovírus podem infectar e se multiplicar em várias partes do organismo, trato respiratório, trato gastrointestinal e olhos. Apesar de ocorrer com menor frequência, os

adenovírus também podem infectar o fígado, bexiga urinária, pâncreas, miocárdio e o sistema nervoso central (Jiang, 2006). As infecções por adenovírus incluem conjuntivite, infecção do aparelho respiratório, faringite, pneumonia, bronquiolite e gastroenterite, e dependendo do sorotipo infectante, eles também podem causar diversas outras doenças, tais como cistite, miocardites, meningites (Jiang, 2006).

As infecções por adenovírus geralmente são persistentes, caracterizadas pela excreção fecal prolongada e intermitente. Alguns sorotipos são capazes de estabelecer infecções persistentes assintomáticas em amígdalas, adenóides e intestino dos indivíduos infectados. Após uma infecção a imunidade é conferida ao sorotipo específico e, por isso, os adultos são mais suscetíveis às infecções que são menos comuns na infância (Horwitz, 1996). Embora as características epidemiológicas dos adenovírus variem de acordo com o sorotipo, todos são transmitidos por contato direto ou via fecal-oral (Carter, 2005).

Muitos dos sorotipos de adenovírus podem se multiplicar no intestino delgado, mas apenas os membros da espécie F estão associados a gastroenterites (Grimwood et al., 1995). O adenovírus é considerado o segundo agente em significância com relação aos casos de gastroenterite na infância, atrás dos rotavírus (Jiang, 2006). Padrões sazonais dos genótipos virais foram evidenciados, com sorotipo HAdV-41 sendo prevalente no fim do outono e o sorotipo HAdV-40, durante o ano todo (Grimwood et al., 1995).

Os adenovírus da espécie F são responsáveis por 5 a 20% dos casos de internações por diarreia nos EUA, principalmente em crianças com menos de dois anos (Kotloff et al., 1989; Uhnou et al., 1984). Os adenovírus são comuns no esgoto bruto e no lodo de esgoto primário, no qual foram encontrados em concentração dez vezes maior que as de enterovírus (Rusin et al., 2000). Estudo realizado por Santos et al. (2004) na cidade de São Paulo detectou a presença de diferentes tipos de adenovírus na água de esgoto ao longo do ano.

1.5.3 Norovírus

Zahorsky et al., em 1929, descreveram a primeira doença associada aos Calicivírus humanos (HuCV) denominada *winter vomiting disease*. Alguns anos depois, dois grupos de pesquisa induziram diarreia em voluntários com administração de filtrados de amostras de fezes provenientes de casos diarreicos. Como as amostras não continham bactérias, os vírus foram apontados como causadores da doença (Reiman et al., 1945; Gordon et al., 1947).

No ano de 1968, um surto de gastroenterite caracterizado principalmente por náusea, vômito e dor abdominal ocorreu em uma escola em Norwalk, Ohio, EUA, onde 50% dos estudantes e professores desenvolveram a doença após um período de incubação de 48 horas, com manifestação dos sintomas durante 24 horas. Esta doença também foi denominada *winter vomiting disease*, devido a sua semelhança com a síndrome descrita por Zahorsky et al. Entretanto, estudos laboratoriais realizados naquela época não permitiram detectar o agente etiológico (Adler e Zickl, 1969). Foi apenas em 1972 que Kapikian et al. isolaram uma partícula viral de 27 nm de diâmetro após a análise por imunomicroscopia eletrônica (IME) das suspensões de fezes provenientes daquele surto e denominaram-na agente Norwalk.

1.5.3.1 Características da partícula viral e Taxonomia

Os norovírus são vírus não envelopados, com 26 a 35 nm de diâmetro e simetria icosaédrica. O material genético é composto por RNA fita simples positiva com 7900 nucleotídeos de tamanho. A extremidade 5' do genoma apresenta uma proteína ligada ao genoma (VPg) e na extremidade 3' tem uma poliamina, tornando estes vírus altamente infecciosos (Treanor et al., 1993; Vinje et al., 1997). A Figura 4 apresenta um modelo esquemático da partícula viral dos norovírus e uma micrografia de norovírus em microscopia eletrônica.

Figura 4. Representação esquemática de partícula de Calicivírus (A); Imagem de microscopia eletrônica de Calicivírus bovino (aumento de 33.000), partículas virais extraídas de amostra de fezes (B).

Fonte: www.unsw.edu.au/.../pad/2005/jun/norovirus_1.jpg; <http://www.epa.gov/nerlcwww/norwalk.htm>.

Segundo o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), a família *Caliciviridae* é composta por quatro gêneros: *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Sapovirus* e *Norovirus*, baseado em suas características genômicas. Os vírus dos gêneros *Lagovirus* (vírus da doença hemorrágica em coelho) e *Vesivirus* (vírus de suíno, bovino, canino e felino) são, até o momento, exclusivos de animais, enquanto os vírus dos gêneros *Sapovirus* (SV) e *Norovirus* (NV) infectam principalmente seres humanos (ICTV, 2009).

Norovírus é a denominação oficial do gênero de vírus previamente descrito como “Norwalk-like virus”. Até recentemente era conhecido como calicivírus devido a sua relação com a família *Caliciviridae* e, também, como *Small Round Structure Viruses* por suas características morfológicas.

Atualmente os norovírus são classificados como pertencentes à família *Caliciviridae*, Gênero *Norovirus*, o qual subdivide-se em cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV). Destes, a maioria dos norovírus humanos está incluída nos grupos G1 e G2. No grupo G1 estão incluídos o vírus Norwalk (NV), Southampton (SOB) e Desert Shield (DSV); já no genogrupo G2 estão incluídos os Lordsdale (LV), México (MX), Toronto (TV), Hawaii (HV), Grimsby (GRV), Gwnedd (GV), White River (WRV) e Snow Mountain Agent (SMA) (Castilho, 2006, ICTV, 2009).

1.5.3.2 Estabilidade no meio ambiente

Os norovírus mantêm a infectividade após o tratamento com éter 20% a 4°C durante 18 horas ou quando incubados a 60°C por 30 minutos (Green et al., 2001), entretanto, sua inativação é diretamente proporcional ao aumento da temperatura, apresentando alta taxa de inativação a temperaturas superiores a 56°C. Em suspensão fecal podem permanecer infecciosos por até uma semana em temperaturas menores que 20°C (Duizer et al., 2004).

A inativação utilizando radiação ultravioleta (UV) é dose-dependente. Os calicivírus são considerados resistentes a pH ácido, em função de sua habilidade em permanecerem infecciosos após passagem pelo estômago, porém são inativados em faixas de pH abaixo de 5 ou acima de 10 e após 30 minutos em etanol 70%. São considerados os vírus mais resistentes à cloração, mantendo-se infecciosos mesmo em concentrações de cloro residual superiores a 3,75 mg/L à temperatura ambiente, durante 30 minutos (Shin e Sobsey, 2008).

1.5.3.3 Epidemiologia

Os norovírus infectam indivíduos de todas as faixas etárias, o que os distingue de outros vírus causadores de gastroenterite, como os rotavírus, astrovírus e adenovírus, que infectam, preferencialmente, crianças de até cinco anos de idade (Glass et al., 2000). Estes vírus freqüentemente causam surtos de gastroenterite associados com água e alimentos contaminados, provocando diarreia grave. São transmitidos via oral, principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminados, contato pessoa-pessoa ou mesmo por aerossóis produzidos durante o vômito (Wilhelmi et al., 2008; Castilho, 2006).

A doença é caracterizada por náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, cefaléia e febre. Embora estes sintomas sejam vistos em pacientes de todas as faixas etárias, o vômito é mais freqüente em crianças, enquanto a diarreia atinge mais os adultos (Wilhelmi et al., 2008; Kaplan et al., 1982).

A infecção por HuCV é autolimitada, apresenta um período de incubação de 24 a 48 horas e curso que pode variar horas a vários dias. A média de duração foi estimada em cinco dias. Os vírus são excretados nas fezes em baixas concentrações, com início 15 horas após a ingestão, com um pico de excreção após 25-72 horas. Por outro lado, tem sido observado que a excreção de norovírus pode ocorrer até três semanas após o desaparecimento dos sintomas da doença. Esses vírus circulam durante todo o ano, embora sejam mais freqüentes no inverno (Wilhelmi et al., 2008).

1.5.4 Vírus da hepatite A

Antigas civilizações, como a chinesa, a grega e a romana, relataram a ocorrência de uma doença até então desconhecida, cuja principal manifestação clínica era a icterícia, caracterizada pela coloração amarelada dos tecidos e das secreções orgânicas, resultante da presença anormal de pigmentos biliares (WHO, 2000).

A primeira descrição da doença ocorreu no século 18, segundo revisão feita por Cockayne (1912), após uma epidemia na ilha de Minorca (Epidemic Diseases of Minorca, 1744 to 1749). A seguir, muitos outros relatos de epidemias foram descritos e a denominação de *icterícia catarral* foi dada por Virchow, sendo utilizada até a década de 40.

McDonalds (1908) e Cockayne (1912) utilizaram a expressão *agente virulento* no sentido genérico para se referir à etiologia da *icterícia catarral*. Em 1931, Findlay et al. em um relato a *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, discorreram sobre uma epidemia ocorrida naquele período e, também, sobre o histórico da *icterícia catarral*, admitindo que esta fosse causada por um vírus (Fausto et al., 2003).

Experimentos em voluntários e estudos epidemiológicos realizados durante e após a Segunda Guerra Mundial confirmaram a etiologia viral desta doença (Melnick e Boggs, 1972). MacCallum, em 1947, introduziu o termo hepatite A para definir a hepatite infecciosa transmitida pela via fecal-oral, e hepatite B para classificar a hepatite transmitida pelo soro, termos adotados pelo Comitê de Hepatites Virais da Organização Mundial de Saúde (OMS) para substituir as descrições até então utilizadas (Fausto et al., 2003).

Em 1973, Feinstone et al. identificaram o VHA por meio de imunomicroscopia eletrônica após análise das fezes de voluntários. Foi em humanos que o grupo da Universidade de Yale não só confirmou a transmissão fecal-oral, como também observou que o período de incubação do VHA, resultante da inoculação de soro contaminado, era muito maior.

1.5.4.1 Características da partícula viral e Taxonomia

O vírus da hepatite A é um vírus não envelopado, com simetria icosaédrica e cerca de 27 nm de diâmetro. O material genético consiste de RNA fita simples, com sentido positivo cauda poli A por se tratar de RNAm, portanto, pronto para a tradução. O RNA genômico está associado covalentemente à proteína VPg na extremidade 5' não codificante, cujo papel é importante na iniciação da transcrição (forma o sítio de entrada do ribossoma). A cadeia de RNA tem 7,5 Kb e consiste de três regiões: uma região não codificadora na extremidade 5' de 732 a 740 nucleotídeos, uma parte intermediária, codificadora, com 2.225 a 2.227 nucleotídeos e uma parte não codificadora na extremidade 3' com 40 a 80 nucleotídeos (Cuthbert, 2001; WHO, 2000). A Figura 5 apresenta um modelo esquemático da partícula viral dos vírus da hepatite A e uma micrografia do vírus da hepatite A em microscopia eletrônica.

Figura 5. Representação esquemática da partícula do vírus da hepatite A (A); Imagem de micrografia eletrônica do vírus da hepatite A (B).

Fontes: http://education.expasy.org/images/Picornaviridae_virion.jpg;
http://gsbs.utmb.edu/microbook/images/fig70_1.JPG.

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), o vírus da hepatite A é classificado como pertencente à família *Picornaviridae* e único membro do gênero *Hepatitisvirus*. Existem sete genótipos (identidade de 85% ou mais nos nucleotídeos), dos quais três infectam naturalmente primatas não humanos e quatro infectam o homem. Os genótipos mais frequentemente encontrados nas infecções humanas são os genótipos I, III e V (Fausto et al., 2003).

1.5.4.2 Estabilidade da partícula viral no meio ambiente

O vírus da hepatite A é altamente estável ao tratamento com soluções ácidas em faixas de pH 1,0 e 2,0, como por exemplo, quando incubados por 15 minutos em ácido percloroacético na concentração de 300 mg/L a 20°C (Scholz et al., 1989). Por não possuir envelope, é resistente também ao tratamento com éter a 20%, clorofórmio, diclorometano (Freon), triclorotrifluoretano (Arklone) e em solução de SDS a 1% a 37°C por 30 minutos (Siegl, 1984). É relativamente resistente a desnaturação térmica (60°C em pH neutro por 60 minutos, sendo inativado após 10-12 horas). Sua infectividade é preservada mais de um mês quando hidratado a 25°C ou por anos a -20°C. São relativamente resistentes à desinfecção com cloro, em particular se associados a matéria orgânica (Rusin et al., 2000) de modo que podem resistir ao tratamento convencional da água de abastecimento (Casteel et al., 2008; Siegl et al., 1984).

A inativação do vírus da hepatite A pode ser obtida por diferentes metodologias, tais como aquecimento a 85°C durante 1 minuto, em autoclave a 121°C por 20 minutos; radiação ultravioleta (1,1 W, a uma profundidade de 0,9 cm por 1 minuto); formalina (8% para 1 min. a 25 °C); permanganato de potássio (30 mg/L para 5 min.), iodo (3 mg/L para 5 min.), cloro (concentração de cloro residual livre de 2,0 a 2,5 mg/L por 15 min.) contendo compostos de cloro (3 a 10 mg/L solução de hipoclorito de sódio a 20 °C durante 5 a 15 min.) (Casteel et al., 2008).

1.5.4.3 Epidemiologia

A infecção pelo vírus da hepatite A é caracterizada por um surto repentino de febre, náuseas, anorexia, desconforto abdominal, mal estar, seguido, em alguns dias, por icterícia, porém difere da Hepatite B por não ser crônica (Rusin et al., 2000).

A hepatite do tipo A é uma doença de ampla distribuição geográfica, sua epidemiologia é caracterizada e influenciada pelas condições de saneamento básico e desenvolvimento socioeconômico de uma população (Costa-Mattioli et al., 2001; Melnick, 1957; Pintó et al., 2007; Rusin et al., 2000). Estudos têm demonstrado a existência e a alta prevalência deste vírus em populações de países em desenvolvimento, entretanto baixa prevalência em países desenvolvidos (Pintó et al., 2007).

A maior parte dos casos de infecção por VHA ocorre entre crianças, podendo ser assintomáticos ou sintomáticos, sem manifestação de icterícia. A gravidade da doença aumenta de acordo com a idade do indivíduo, sendo que cerca de 2/3 dos casos de infecção em adultos relatam icterícia, e 0,5% dos casos são fatais, resultado da falência do fígado (Rusin et al., 2000; White e Fenner, 1994). Uma vez que a infecção por hepatite A confere imunidade ao longo da vida do indivíduo, infecções graves são raras entre os adultos em regiões altamente endêmicas, onde a maior parte das crianças é infectada nos primeiros anos de vida, geralmente sem sintomas clínicos. Em contrapartida, em regiões pouco endêmicas, a doença ocorre principalmente como uma consequência de viagens a regiões endêmicas ou pela ingestão de alimentos contaminados, portanto, a probabilidade de desenvolver a doença sintomática grave é elevada (Cuthbert, 2001; Pintó et al., 2007).

Os indivíduos infectados excretam cerca de 10^8 partículas de VHA por grama de fezes, podendo contaminar águas de abastecimento, recreação e as águas de irrigação, já que são relativamente estáveis no ambiente (WHO, 2000).

1.6 Métodos de concentração viral de amostras ambientais

A maioria dos métodos para concentração de vírus em amostras ambientais baseia-se nas propriedades macromoleculares das proteínas virais. Certas proteínas estruturais conferem aos vírus, em um ambiente aquático, as propriedades de um colóide hidrofílico de natureza anfotérica, podendo agir como um ácido ou base, cuja carga elétrica varia em função do pH e da força iônica do meio ambiente (Bosch, 1998; Bosch et al., 2005).

As partículas virais apresentam polaridade, permitindo sua adsorção a uma ampla variedade de matrizes carregadas como, por exemplo, membranas. Além disso, assim como as proteínas, as partículas virais possuem massa molecular relativamente elevada, possibilitando sua concentração por métodos de ultrafiltração e ultracentrifugação. (Bosch et al., 2008; Wyn-Jones et al., 2001). Considerando estas propriedades, numerosos métodos têm sido desenvolvidos para a concentração de partículas virais de amostras ambientais, os quais são divididos considerando quatro principais abordagens, sendo elas, adsorção/eluição, ultrafiltração, ultracentrifugação e imunoafinidade. Na Tabela 9 são apresentas as principais técnicas de concentração de vírus em amostras ambientais.

Tabela 10. Resumo das principais técnicas de concentração de vírus em amostras ambientais

Técnica	Método	Tipo de água	Volume inicial (L)	Quantidade inicial de vírus	Recuperação	Custo	2ª etapa	Comentário
Adsorção/ eluição	Chumaço de gaze	Esgoto	Grande	Alta	Baixo para médio	Nulo	Não	Não quantitativo
	Membrana eletronegativa	Todas	1-1000	Baixa/ média	50-60% com prática	Médio	Sim	Necessários grandes volumes de água e bombas dosadoras
	Membrana eletropositiva	Todas	1-1000	Baixa/ média	50 – 60% com prática	Médio	Sim	Não necessita de pré requisito
	Cartuchos eletronegativos	Baixa turbidez	1 – 50	Baixa/ média	Variável: alta em águas limpas	Baixo	Sim	Podem entupir mais rapidamente que as membranas
	Cartuchos eletropositivos	Todas	1 – 1000	Baixa/ média	Variável	Médio	Sim	Ampla gama de vírus
	Lã de vidro	Todas	1 – 1000	Baixa/ média	Variável	Baixo	Sim	Não necessita de pré requisitos
	Vidro em pó	Todas	< 100	Indiferente	20 - 60%	Médio	Sim, quando Vol. > 100 L	Aparelhos especiais
	Membranas de alginato	Limpa	Baixa	Boa	Baixa	Baixo	Não	Muito lento. Pode entupir rapidamente com amostras turbias
Ultrafiltração	Membrana simples	Limpa	Baixa	Indiferente	Variável	Médio	Não	Lento
	Fluxo tangencial e fibras ocas	Efluente tratado	Alto	Baixa	Variável	Alto	Não	Necessita de pré filtros para águas turbias
Ultracentrifugação		Limpo	Baixa	Alta	Média	Alto	Não	Vasta gama de vírus, apresenta boa recuperação para amostras limpas, entretanto requer tempo e apresenta alto custo
Imunoafinidade	Imunoafinidade e esferas magnéticas	Desconhecido	Baixa	Baixa	Boa recuperação para volumes pequenos	Alto	Não	Requer ensaio específico para cada vírus. Poucos dados na literatura

Fonte: Bosch et al., 2008; Wyn-Jones et al., 2001

Um bom método de concentração deve ser tecnicamente simples, rápido, possuir uma alta taxa de recuperação viral, ser adequado para uma grande variedade de vírus entéricos, produzir um volume pequeno de concentrado e ser de baixo custo. No entanto, conforme observado na Tabela 9, cada método de concentração viral apresenta vantagens e desvantagens, e é importante reconhecer que não existe um único método que atenda a todos os requisitos (Bosch et al., 2008).

O método do chumaço de gaze, por exemplo, consiste em mergulhar um chumaço de gaze contendo algodão, por um período de 24 horas, em uma corrente de água de forma que os vírus fiquem adsorvidos, para em seguida serem eluídos com solução de hidróxido de sódio fracamente alcalina. Este método é simples e econômico, entretanto não apresenta uma abordagem quantitativa e aplica-se apenas a amostras com muito material em suspensão (Fattal e Katzenelson, 1976; Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

Já o método de ultrafiltração consiste na retenção de partículas virais por filtros de porosidade muito reduzida, no entanto, este método permite apenas a filtragem de volumes pequenos, pois ocorre obstrução dos poros da membrana, o que dificulta a sua utilização para a concentração de amostras de água de esgoto (Stewien, 1979).

O método de ultracentrifugação consiste na utilização de força gravitacional superior a $100.000 \times g$ por 1 hora para possibilitar a sedimentação de partículas virais. No entanto, este método apresenta a desvantagem de permitir apenas a concentração de volumes pequenos, sendo, portanto, reservado para a segunda etapa de concentração (Mehnert et al., 1997; Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

O método de concentração viral por adsorção a sais baseia-se na propriedade dos vírus de se adsorverem eletrostaticamente a estas substâncias. Diferentes tipos de materiais têm sido empregados para a concentração de vírus, como o óxido de ferro, fosfato, hidróxido de alumínio ou carvão ativado (Fong e Lipp, 2005; Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

Atualmente, os métodos mais utilizados para a concentração de vírus baseiam-se na adsorção das partículas virais a filtros de microporosidade, carregados eletricamente, e posterior eluição com pequenos volumes (Bosch et al., 2008). Desde a 14^a edição do *Standard Methods for Evaluation of Water and Wastewater*, o que vem sendo sugerido para concentração de vírus de amostras ambientais é o método Viradel (*vírus - adsorption - elution*), e para muitos autores ainda é considerada a melhor alternativa para concentração de vírus presentes em amostras ambientais (Bosch et al., 2008). O método Viradel baseia-se na

adsorção das partículas virais a filtros de microporosidade, carregados eletricamente, e posterior eluição com pequenos volumes (Hill et al., 2009).

Diferentes tipos de filtros têm sido propostos para a recuperação de vírus de amostras de água, sejam sob a forma de membranas planas ou sob a forma de cartuchos. Estes apresentam composição química, diâmetro e porosidade diversificados, além disso, podem ser carregados negativamente ou positivamente. No entanto sua eficácia depende da natureza da água a ser filtrada (Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

O uso de membranas ou cartuchos carregados negativamente tem o inconveniente de que as amostras de água devem ser previamente ajustadas, ou seja, a água tem que ser acidificada e, muitas vezes, sais precisam ser adicionados para facilitar a adsorção dos vírus aos filtros eletronegativos. Isso ocorre porque a maioria dos vírus entéricos são carregados negativamente no pH do meio ambiente (Bosch et al., 2005).

Alguns grupos de pesquisa utilizaram filtros de microporosidade eletronegativos para a concentração de *Enterovirus* de diferentes tipos de água, com eficiência de recuperação em torno de 52% (Gerba et al., 1978; Smith e Gerba, 1982). Smith e Gerba (1982) empregaram este tipo de filtro para a concentração de rotavírus de água de esgoto, através da inoculação experimental de rotavírus SA11 e obtiveram um índice de recuperação de 29%; este trabalho permitiu verificar-se tratar de um método de concentração para *Enterovirus* por serem mais resistentes ao pH alcalino.

Atualmente, este é o método mais utilizado para recuperar enterovírus a partir de amostras de esgoto bruto, tratado e águas superficiais, na maioria dos laboratórios de virologia ambiental da União Européia, e é o método recomendado pelo Reino Unido. É também um método padrão tentativo para a recuperação de vírus em amostras de água e águas residuais, conforme publicado pela American Public Health Association (Hill et al., 2009).

O uso de filtros eletronegativos é limitado, por um lado, devido a inativação de alguns vírus pelo pH ácido e em parte pela necessidade de acidificar muito grandes volumes. Esta dificuldade foi superada com a utilização de filtros carregados positivamente (Bosch et al., 2005).

A utilização de filtros carregados positivamente é uma das técnicas mais comumente utilizadas e é o método utilizado pela USEPA para recuperação de vírus entéricos de água potável (Hill et al., 2009).

Sobsey e Jones (1979) desenvolveram um método utilizando um filtro de celulose e terra de diatomáceas carregado positivamente para a concentração de poliovírus. A eficiência de recuperação deste método é comparável à do método da filtração através de filtros de carga negativa, contudo, a adsorção das partículas virais à superfície do filtro ocorre em um intervalo amplo de pH sem a necessidade de aplicação de sais (Estes et al., 1979; Rao e Melnick, 1986).

Posteriormente, outros pesquisadores demonstraram a eficiência deste método para a concentração de outros vírus menos resistentes a pH ácido, como os rotavírus, pois permite a adsorção das partículas virais num amplo intervalo de pH entre 3 e 6, evitando com que os mesmos sejam inativados rapidamente em pH ácido (Bosch et al., 2005). Embora em valores de pH acima de 7 a adsorção decresça rapidamente, de modo que o pH ainda precise ser monitorado. Estas características tornam o uso de filtros carregados positivamente atraentes, não apenas pela conveniência de não necessitar ajustar o pH das amostras mas, também, por possibilitar a concentração de vírus como o rotavírus e colifagos, que são sensíveis ao pH baixo, condição fundamental para a adsorção a filtros carregados negativamente (Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

Vários grupos de pesquisa empregaram estes filtros para a concentração de enterovírus de águas cloradas e de esgoto, observando uma eficiência de recuperação de aproximadamente 50% (Chang et al., 1981; Sobsey e Glass, 1980; Sobsey e Jones, 1979).

Sobsey e Jones (1979) relataram a recuperação de 22 a 50%, usando um procedimento em duas fases na concentração do poliovírus de água potável. Pina et al. (1998) recuperaram adenovírus, enterovírus e VHA da água do mar, rio e água de esgoto utilizando membrana Zeta-plus, no entanto não avaliaram a recuperação do método.

Chapron et al. (2000), utilizando cartuchos 1MDS Zetapor em associação com PCR e cultura celular, detectaram astrovírus, enterovírus e adenovírus tipo 40 infecciosos de amostras de águas superficiais. Bosch et al. (1988) e Rafael et al. (1985) concentraram com sucesso rotavírus, utilizando cartuchos carregados positivamente.

No Brasil, Mehnert e Stewien (1993) e Queiroz (2001) utilizaram o método Viradel com membrana eletropositiva para a detecção de rotavírus em amostras de esgoto e água de córrego. Queiroz (2001) avaliou a taxa de recuperação para rotavírus em amostras de córrego e esgoto obtendo valores de 90,7% e 58,8%, respectivamente. Este método também foi aplicado para a detecção de adenovírus (Santos et al., 2004) e VHA (Barrella et al., 2008;

Sassaroli, 2002) em amostras de esgoto e também para pesquisa de vírus em amostras de água de poço (Piranha et al., 2006), e os resultados se mostraram promissores.

1.7 Métodos de detecção e quantificação de vírus em amostras ambientais

A utilização de métodos de detecção de vírus entéricos humanos em amostras ambientais teve início na década de 1940, com pesquisas sobre a presença e distribuição de poliovírus no ambiente, e representam o início da virologia ambiental (Metcalf et al., 1995).

Os primeiros estudos sobre a ocorrência de vírus entéricos humanos em ambientes aquáticos eram realizados mediante a administração de amostras ambientais a animais de laboratório (Metcalf et al., 1995). No entanto, anos mais tarde novos métodos de detecção e isolamento viral passaram a ser desenvolvidos, alguns envolvendo a visualização de efeitos citopáticos, ou seja, alterações morfológicas de células previamente inoculadas, outros utilizando ensaios imunológicos e, finalmente, os métodos de detecção do genoma viral ou ácido nucléico viral (Carter, 2005; Metcalf et al., 1995; Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

A utilização de métodos imunológicos como as reações de imunofluorescência e imunoperoxidase permitem a detecção e quantificação de partículas virais infecciosas de amostras ambientais e vêm sendo empregadas por grupos de pesquisa na área de virologia ambiental (Mehnert e Stewien, 1993; Payment e Trudel, 1985; Queiroz et al., 2001; Steinman, 1981). Outros métodos normalmente utilizados para a detecção de vírus em amostras clínicas, tais como radioimunoensaio, fixação do complemento e imunoabsorbância, ou eram onerosas ou não possuíam a sensibilidade necessária para detectar patógenos virais em amostras ambientais (Bosch, 1998; Bosch et al, 2005; Jiang, 2006; Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

A reação de imunofluorescência consiste na detecção de células infectadas através de um anticorpo específico conjugado a uma substância que quando submetida à luz ultravioleta torna-se fluorescente. Katzenelson (1976), e Smith e Gerba (1982) foram os primeiros a adaptar esta reação para a detecção de rotavírus em amostras ambientais.

A reação de imunoperoxidase baseia-se no mesmo princípio da reação de imunofluorescência, diferindo quanto ao tipo de cromógeno utilizado. Neste método, uma enzima, a peroxidase, é conjugada com o anticorpo específico e, ao reagir com o substrato (peróxido de hidrogênio) na presença de um cromógeno como o tetrahidroclorato de diaminobenzidina, produz um precipitado de coloração marrom (Herrman et al., 1974).

Segundo Rao e Melnick (1986), esta reação é considerada de 100 a 1.000 vezes mais sensível que a reação de imunofluorescência.

No Brasil, Mehnert e Stewien, (1993) detectaram e quantificaram rotavírus em amostras de água de córrego e esgoto no período de novembro de 1987 a julho de 1988, empregando a técnica de imunoperoxidase. A presença de rotavírus foi evidenciada em 25 (29,8%) amostras de um total de 84 analisadas e os valores obtidos quanto à quantidade de rotavírus no esgoto foram de 3 a 73 UFF/L. Queiroz et al. (2001), utilizando a mesma técnica para detecção e quantificação de rotavírus em amostras de córrego e esgoto, obtiveram valores de 3 a 196,7 UFF/L.

Os métodos de biologia molecular, como PCR e RT-PCR, vêm sendo utilizados com sucesso na virologia ambiental desde a década de 90 (Abbaszadegan et al., 1993; Gajardo et al., 1995; Fong e Lipp, 2005). Sua vantagem é possibilitar a amplificação e a detecção de quantidades de partículas virais até 1.000 vezes menores do que os métodos tradicionais, uma vez que uma única cópia do genoma viral é suficiente (Buesa et al., 1996). Além disso, estes também permitem recolher informações quanto aos genótipos dos vírus, proporcionando, assim, informações epidemiológicas relevantes, particularmente importantes para a implementação e acompanhamento de programas de vacinação (Bosch, 1998; Bosch et al., 2008; Carter, 2005). Segundo Bosch et al. (2008), estas técnicas permanecem ainda hoje como as melhores para detecção de vírus.

Numerosas investigações têm utilizado RT-PCR para detectar enterovírus em diferentes amostras ambientais, incluindo águas fluviais e marítimas (Wyn-Jones et al., 1995), águas subterrâneas (Abbaszadegan et al., 1993), lodo (Straub et al., 1995) e ostras (Le Guyader et al., 1994). A técnica foi amplamente aplicada para detectar outros grupos de vírus presentes na água, incluindo adenovírus (Pina et al., 2008; Piranha et al., 2006; Puig et al., 1994; Santos et al., 2004), vírus da hepatite A (Barrella et al., 2008; Garrafa 2001; Sassaroli, 2002) e rotavírus (Gajardo et al., 1995; Queiroz et al., 2001).

Algumas variações da PCR convencional incluem a *Nested PCR*, *seminested PCR*, a PCR em tempo real utilizada para a quantificação, entre outras (Jiang, 2006; Wyn-Jones e Sellwood, 2001). As reações de *Seminested PCR* e *Nested PCR* aumentam a sensibilidade e a especificidade da PCR, por utilizar oligonucleotídeos iniciadores internos ou em conjunto de oligonucleotídeos iniciadores, que por vezes são utilizados como uma confirmação da reação de PCR (Pina et al., 1998).

Os ensaios de *Nested* PCR para adenovírus como relatado por Allard et al. (1994) mostraram ter aumentado a sensibilidade das reações em relação ao PCR convencional, com limites de detecção de uma partícula de adenovírus.

Atualmente, além da PCR tradicional, vários pesquisadores vêm utilizando a técnica de PCR em tempo real para detecção e, principalmente, quantificação de vírus não cultiváveis em culturas celulares, como norovírus, vírus da hepatite A e outros (Costa-Mattioli et al., 2002; Mackay et al., 2002; Richards et al., 2004).

A técnica de PCR em tempo real determina a quantidade inicial de DNA ou RNA através do comportamento da cinética de amplificação das diferentes fases ao longo dos ciclos de uma PCR, ou seja, detecta e quantifica, em tempo real, ácidos nucleicos enquanto são amplificados. A amplificação é dividida em três fases, a linha basal na qual não há produtos de PCR suficientes para detectar fluorescência, a fase *log* em que a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo e a fase platô onde não há mais aumento no número de produtos (Applied Biosystems, 2007)

A técnica baseia-se na detecção da fluorescência produzida por uma sonda repórter, o que aumenta a molécula, como a reação avança. Isto ocorre devido ao acúmulo do produto da PCR com cada ciclo de amplificação. Estes incluem corantes fluorescentes moléculas repórter que se ligam ao DNA dupla fita, como o SYBR® Green, ou sondas com seqüências específicas, como o molecular Beacons TaqMan® ou sondas. A quantificação pode ser absoluta, quando os valores numéricos obtidos possuem alguma unidade (nanogramas ou número de cópias de DNA, por exemplo) ou relativa, quando os Cts de cada amostra são comparados e os resultados representam ordens de grandeza (cinco vezes mais expressão, por exemplo) sem saber o que estas representam em termos de número de cópias ou quantidade em nanogramas. É, portanto, necessária a quantificação prévia das amostras padrões por outros métodos, como a espectrofotometria. Por fim, o *software* do equipamento coleta, processa e analisa os sinais fluorescentes e os converte em gráficos para posterior análise (Applied Biosystems, 2007; Mackay et al., 202).

As técnicas da PCR e PCR em tempo real têm como limitação a não diferenciação entre partículas virais infecciosas e não infecciosas, o que tem levado ao emprego destas técnicas em conjunto com técnicas de cultura celular. Atualmente, este é o método recomendado pela USEPA para o monitoramento de vírus no meio ambiente (Carter, 2005).

A presença de patógenos virais no esgoto tratado revela o potencial destas águas em disseminar estes agentes no meio ambiente. Contudo, o risco real à saúde pública só pode ser avaliado com base em dados de infectividade e número de partículas virais por volume em face à modalidade de aplicação da água de reúso.

Atualmente, apesar da Resolução N. 54, de Novembro de 2005, pelo Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH), ter estabelecido as modalidades, diretrizes e critérios gerais para a prática do reúso direto não potável de água, há a necessidade de regulamentação complementar de padrões de qualidade e códigos de práticas para as diversas modalidades de reúso. Portanto, a regulamentação do reúso da água encontra-se em pleno curso no Brasil (BRASIL, 2006; PROSAB, 2006).

Este estudo é pioneiro no país em se tratando de vírus entéricos no esgoto tratado e os resultados, além de revelarem potenciais indicadores virais de contaminação fecal nestas águas, têm aplicações importantes para programas de controle da qualidade da água de reúso produzida em todo o país, apresentando dados para subsidiar uma futura legislação.

2 CONCLUSÕES

- Rotavírus, adenovírus e vírus da hepatite A foram detectados no esgoto tratado disponibilizado para reúso urbano na cidade de São Paulo pelos métodos moleculares de PCR e RT-PCR. Estes também foram detectados no esgoto bruto.
- Os genótipos G1-G5 de rotavírus foram identificados nas amostras de ambos os efluentes pelo método de *duplex-sn* RT-PCR evidenciando a prevalência do genótipo G1.
- O método de RFLP possibilitou a distinção de adenovírus da espécie F dentre os demais detectados em ambos os efluentes, evidenciando a presença desta espécie em maior proporção em relação às demais.
- A reação de PCR em tempo real, apesar de padronizada, não possibilitou a quantificação dos vírus da hepatite A devido à degradação das partículas virais durante o processo de estocagem das amostras.
- A PCR para detecção de norovírus no esgoto bruto e tratado foi padronizada. No entanto, estes vírus não foram detectados em ambos os efluentes provavelmente em decorrência de problemas de estocagem, sendo recomendada a análise das amostras recém coletadas.
- A infectividade de adenovírus e rotavírus detectados pelos métodos moleculares no esgoto tratado e bruto foi comprovada, evidenciando que estes vírus podem permanecer infecciosos mesmo após o tratamento disponibilizado na estação de tratamento de esgoto.
- A redução do índice de positividade para rotavírus e adenovírus no esgoto tratado foi estatisticamente significativa, mas o mesmo não ocorreu para o vírus da hepatite A, indicando a maior resistência deste aos métodos de tratamento adotados na ETE.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP, Pepper IL. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59:1318-24.
- Abbaszadegan M, Stewart P, LeChevallier M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:444-9.
- Acher R, Chauvet J, Rouillé Y. Adaptive evolution of water homeostasis regulation in amphibians: vasotocin and hydrins. *Biol Cell.* 1997; 89:283-91.
- Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis.* 1969; 119:668-73.
- Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenovirus in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step Polymerase Chain Reaction. *J Med Virol.* 1992; 37:149-57.
- Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. Polymerase Chain Reaction for detection of adenoviruses in stool samples. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:2659-67.
- Allard A, Kajon A, Wadell G. Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1994; 44:250-7.
- Appleton H. Control of food-borne viruses. *Br Med Bull.* 2000; 56:172-83.
- American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19 ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, 1995.
- American Type Culture Collection™ - ATCC. FRhK-4. <http://www.atcc.org/mon/catalog/numSearch/numResults.cfm?atc cNum=CRL-1688>. [2008a, Abr 15].
- American Type Culture Collection™ - ATCC. MA-104. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2378>. [2008b, Abr 15].
- American Type Culture Collection™-ATCC. HEp-2. <http://www.atcc.org/commo n/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CCL-23>. [2008b, Abr 15].
- Andrade GI, Lobato ZIP, Leite RC, Barbosa-Stancioli EF. Padronização da técnica de imunoperoxidase para detecção do vírus da diarreia bovina a vírus em cultura de células. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2002; 54.
- Applied biosystems. Expressão gênica empregando PCR quantitativo. São Paulo: ABI expert training center; 2007. 70p.
- Asano, T, Pettygrove, GS. Irrigation with reclaimed municipal wastewater - a guidance manual. NTIS, Springfield, VA (USA). 1984.
- Asano, T.; Maeda, M.; Takaki, M. Wastewater reclamation and reuse in Japan: overview and implementation examples. *Water Science and Technology.* 1996; 34:219-26.
- Asano T. Water from (waste) water – the dependable water resource. *Water Science and Technology.* 2002; 45:23-33.
- Barnes GL, Uren E, Stevens KB, Bishop RF. Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Melbourne, Australia, from april 1980 to march 1993. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:133-8.

Barrella KM, Garrafa P, Monezi TA, Hársi CM, Salvi C, Violante PABC, Mehnert DU. Longitudinal study on the occurrence of adenoviruses and hepatitis A virus in raw domestic sewage in the city of Limeira, São Paulo. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008. In press.

Barrella KM. Pesquisa de vírus entéricos humanos em lodos de esgoto originários de duas ETES do estado de São Paulo: estabelecimento de metodologia para recuperação e detecção viral. [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2008. 151p.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Detection of new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*. 1974; 1:149-51.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Evidence for viral gastroenteritis. *New Engl J Med*. 1973b; 289:1096-7.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of a duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973; 2:1281-3.

Bitton D. Introduction to wastewater treatment. In: *Wastewater microbiology*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss. 1997b. Chapter 7.

Bitton D. Pathogens and parasites in domestic wastewater. In: *Wastewater microbiology*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 1997. Chapter 4.

Biziagos E, Pasagot J, Crance J, Deloince R. Long-term survival of Hepatitis A Virus and Poliovirus Type 1 in Mineral Water. *Appl Environ Microbiol*. 1988; 54:2705-10.

Bloch AB, Stramer SL, Smith JD, Margolis HS, Fields HA, McKinley TW, Gerba CP, Maynard JE. Recovery of hepatitis A virus from water-supply responsible for a common source outbreak of hepatitis A. *Am J Public Health*. 1990; 84:2705-10.

Blumenthal UJ, Mara DD, Peasey A, Ruiz-Palacios G, Stott R. Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. *Bull World Health*. 2000; 78:1104-16.

Bofill-Mass S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hunders A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72:7894-96.

Bosch A, Abad FX, Pintó RM. Human pathogenic viruses in the marine environment. In: *Oceans and health: Pathogens in the marine environment*. 1st ed. New York: Springer. 2005. Chapter 5.

Bosch A, Guix S, Sano D, Pintó RM. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Elsevier*. 2008; 19:295-301.

Bosch A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol*. 1998; 1:191-6.

Bosch A, Pintó RM, Blanch AR, Jofre JT. Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures. *Water Research*. 1988; 22: 343-8.

Brega Filho D, Mancuso PCS. Conceito de reúso de água. In: Mancuso PCS, dos Santos HF. *Reúso de água*. Universidade de São Paulo- Faculdade de Saúde Pública, Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental-ABES. São Paulo, 2002.

Buesa J, Colomina J, Raga J, Villanueva A, Prat J. Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. *Res Viro*. 1996; 147:353-361.

Candeias JAN, Baldacci ER, Breviglieri JC, Grisi SJE, Rácz ML. Identificação por contraímunoelctroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil. *Rev Saúde Publ São Paulo*. 1978; 12:99-103.

- Carducci A, Morici P, Pizzi R, Battistini R, Rovini E, Verani M. Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Water Science & Technology*. 2008; 58:893-7.
- Carducci A, Verani M, Battistini R, Pizzi F, Rovini E, Andreoli E, Casini B. Epidemiological surveillance of human enteric viruses by monitoring of different environmental matrices. *Water Sci Technol*. 2006; 54:239-44.
- Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinje J, Rácz ML. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:3947-53.
- Carmona RCC, Timenetsky MCST, Silva FF, Granto CFH. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in São Paulo, Brazil. *J Med Virol*. 2004; 74:166-72.
- Carter MJ. A Review: Enterically infection viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol*. 2005; 98:1354-80.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). Rotavirus Surveillance – Worldwide, 2001-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008; 57:1255-7.
- Casteel MJ, Schmidt CE, Sobsey MD. Chlorine disinfection of produce to inactivate hepatitis A virus and coliphage MS2. *International Journal of Food Microbiology*. 2008;125:267-73.
- Chagas, WF. Estudo de patógenos e metais em lodo digerido bruto e higienizado para fins agrícolas, das Estações de Tratamento de Esgoto da Ilha de Governador e da Penha no Estado do rio de Janeiro. [dissertação (Mestrado)]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. 2000. 89p.
- Chang, LT, Farrah, SR, Bitton, G. Positively charged filters for virus recovery from wastewater treatment plant effluents. *Appl. Environ. Microbiol*. 1981; 42:921-4.
- Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin AB. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and na integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66:2520-5.
- Cho HB, Lee S, Cho J, Kim S. Detection of adenovirus and enteroviruses in tap water and river water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Can J Microbiol*. 2000; 46:417-24.
- Christovão DA, Candeias JAN, Iaria ST. Condições sanitárias das águas de irrigação de hortas do município de S. Paulo. II. Isolamento de vírus entéricos. *Rev Saúde Pública*. 1967;1:12-7.
- Cisneros BEJ, Rendón CM, Velásquez GS. The elimination of helminth ova, faecal coliforms, Salmonella and protozoan cysts by various physicochemical processes in wastewater and sludge. *Water Science and Technology*. 2001; 43:179-82.
- Centro internacional de referência em reúso de água (Cirra). Reúso de água. Reúso de água. Universidade de São Paulo. 2002. www.usp.br/cirra/reuso [2004 Abr 15].
- Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD. Microbiological Examination – Detection of enteric viruses. In: *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 20 Ed. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF). Washington; 1998. p. 9-131.
- Canada Mortgage and Housing Corporation (CMHC). Research report. Water reuse standards and verification protocol. Ottawa. CMHC 2005.
- Cockayne EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Q J Med*. 1912; 6:1-28.

- Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - Sabesp. Informações sobre as estações de tratamento de esgotos da empresa. Disponível em <http://www.sabesp.com.br>. [2008 Dez 10].
- Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Nicand E, Aleman M, Billaudel S, Ferré V. Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by Real-Time RT-PCR. *J Viral Hepat*. 2002; 9:101-6.
- Crockett CS. The role of wastewater treatment in protecting water supplies against emerging pathogens. *Water Environ. Research*. 2007; 79:221-32.
- Cuthbert JA. Hepatitis A: old and news. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14:38-58.
- Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*. 2003; 84:2895-908.
- Dahling DR and Wright BA. Processing and transport of environmental virus samples. *Appl Environ Microbiol*. 1984; 47:1272-6.
- DeGroot M. Probability and statistics. 2 ed. Addison-Wesley: New York; 1986. 723 p.
- De Leon R, Shieh C, Baric RS, Sobsey MD. Detection of enterovirus and hepatitis A virus in environmental samples by gene probes and polymerase chain reaction. In: *Adv Wat Anal Treat. Proceedings of the Water Quality Technology Conference*. Denver: American Water Works Association; 1990. 20 p.
- Duarte AS. Reuso de água residual tratada na irrigação da cultura do pimentão (*Capsicum annuum* L.) [Tese (Doutorado)]. Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz; 2006. 188p.
- Duizend E, Bijkerk P, Rockx B, deGroot A, Twisk F, and Koopmans M. Inactivation of Caliciviruses. 2004; 70:4538-43.
- Enders JF, Bell JA, Dingle JH, Francis T Jr, Hilleman MR, Huebner RJ, Payne AM Adenoviruses: Group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*. 1956; 124:119-20.
- Enriquez CE, Gerba CP. Concentration of enteric adenovirus 40 from tap, sea and waste water. *Wat Res*. 1995a; 29:2554-60.
- Enriquez CE, Hurst CJ, Gerba CP. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and waste water. *Wat Res*. 1995b; 29:2548-53.
- Espigares M, García F, Fernández-Crehuet M, Álvarez A, Gálvez. Detection of hepatitis A virus in wastewater. *Environ. Toxicol. Water Qual*. 1998; 14: 391-6.
- Estes MK, Grahan DY, Smith EM, Gerba CP. Rotavirus stability and inactivation. *J Gen Virol*. 1979; 43:403-9.
- Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses In: Kinip DM, Howley PM (Ed.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1917-1974.
- Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Ed.). *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996. p. 1625-1655.
- Fattal B, Katzenelson E. Evaluation of gauze pad method to recover viruses from water. *Water Res*. 1976; 10: 1135 -1140.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy. Eighth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press; 2007. 49 p.
- Fausto EL, Pereira; Goçálves CS. Hepatite A. *Rev. Soc. Bras. Med Trop*. 2003; 36:387-400.
- Feachem R, Garelick H, Slade D. Enteroviruses in the environment. *Trop Dis Bull*. 1981; 78:185-230.

- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immunoelectromicroscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science*. 1973; 182:1026-28.
- Findlay GM, Dunlop JL, Brown HC. Observations on epidemic catarrhal jaundice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1931; 25:7-24.
- Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woods GN, Bridger JC, Derrick JM. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*. 1974; 2:61-3.
- Fong TT, Lipp EK. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005; 69:2:357-371.
- Fundação Nacional da Saúde. Esgotamento sanitário. In: *Manual de Saneamento*. Brasília: FUNASA; 2004. Cap. 3.
- Gajardo R, Díez JM, Jofre J, Bosch A. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61:3460-2.
- Garrafa, P. Pesquisa do vírus da Hepatite A em águas de córrego e esgoto utilizando métodos de RT-PCR e RFLP. Monografia (Bacharelado) – Faculdade de Ciências Biológicas, Exatas e Experimentais da Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo; 2001. 51p.
- Gerba CP. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv Appl Microbiol*. 1984; 30:133-68.
- Gerba CP, Goyal SM. Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: a review. *J Food Prot*. 1978; 41:743-5.
- Gerba CP, Rose JB, Singh SN. Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. *Crit Rev Environ Control*. 1985; 15:213-36.
- Gerba CP, Smith Jr JE. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J Environ Qual*. 2005; 34:42-8.
- Gerba CP. Risk assessment. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP (ED.). *Environmental microbiology*. Academic Press: San Diego; 2000. p. 557-570.
- Gerba CP, Rose JB, Haas CN, Crabtree KD. Waterborne rotavirus: a risk assessment. *Wat Res*. 1996; 30:2929-40.
- Girones R, Puig M, Allard A, Lucena F, Wadell G, Jofre J. Detection of adenovirus and enterovirus by PCR amplification in polluted waters. *Wat Sci Tech*. 1995; 31:351-7.
- Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Breese JN, Monroe SS. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis*. 2000; 181 Suppl 2:S254-61.
- Gordon L, Ingraham HS, Korn RF. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J Clin Microbiol*. 1947; 86:409-22.
- Gouvea V, Castro L, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994; 32:1338-40.
- Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang Z. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*. 1990; 28:276-82.
- Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994b; 32:1333-7.

Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human caliciviruses. In: Knipe DE, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: 4 ed. Lippincott Williams e Wilkins; 2001. p 841-874.

Griffin DW, Gibson III, CJ, Lipp EK, Riley K, PAUL III, JH, 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*. 1999; 65:4118-25.

Griffin DW, Donaldson KA, Paul JH, Rose JB. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16:129-43.

Grimwood K, Carzino R, Barnes GL, Bishop RF. Patients with enteric adenovirus gastroenteritis admitted to an Australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:131-6.

Guttaman-bass N and Catalano-Sherman J. Humic Acid Interference with Virus Recovery by Electropositive Microporous Filters. *Appl Environ Microbiol*. 1986; 52:556-61.

Haas CN. Disinfection. In: Letterman RD (Ed.). *Water Quality and Treatment: A Handbook of Community Water Supplies*. 5 ed. New York: American Water Works Association. McGraw-Hill, Inc; 1999. p. 14.1-14.60.

Harwood VJ, Levine AD, Scott TM, Chivukula V, Lukasik J, Farrah SR, Rose JB. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71:3163-70.

He XQ, Cheg L, Li W, Xie XM, MA M, Wang ZJ. Detection and distribution of rotavirus in municipal sewage treatment plants (STPS) and surface water in Beijing. *Jornal of Environmental Science and Health*. 2008; 43:424-29.

Herrman JE, Morse SA, Collins MF. Comparison of techniques and immunoreagents used for indirect immunofluorescence and immunoperoxidase identification of enterovirus. *Infec Immun*. 1974; 10:220-6.

Hespanhol, I. Água e saneamento básico-uma visão realista. In: Braga B, Tundisi JG. *Águas doces do Brasil: capital ecológico, uso e conservação*. São Paulo: Escrituras, 1999.

Hespanhol I. Potencial de Reúso de Água no Brasil. *Agricultura, Indústria, Municípios, Recarga de Aquíferos. RBRH*. 2002; 7:75-95.

Hilleman MR, Werner JH. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954; 85:1983-8.

Hill VR, Polaczyk AL, Kahler AM, Cromeans TL, Hahn D, Amburgey JE. Comparasion of hollow-fiber ultrafiltration to the USEPA Viradel technique and USEPA method 1623. *J. Environ. Qual*. 2009; 38:822-5.

Höller C. Quantitative and qualitative investigation on *Campylobacter* in sewage treatment plant. *Zbl Bakt Hyg B*. 1988; 185:326-39.

Holmes KV. Coronaviridae and their replication In: Fields BN, et al. (Eds.). *Virology*. New York: Raven Press, 1990. p.841-856.

Horwitz MS. Adenovirus. In: Fields BN, Howley PM (Ed.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. Chapter 68.

International Committee on Taxonomy of Viruses. Norovirus. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_calic.htm [2009 jan 10].

Irvin LS, Smith FA. One-year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Appl Environ Microbiol*. 1981; 41:51-9.

- Jiang SC. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environ Sci Technol*. 2006; 40:7132-40.
- Jones MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM, Dela Cruz WP, Riedel B, Pan C, Delwart EL, Schnurr DP. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol*. 2007; 81:5978-84.
- Jothikumar N, Paulmurugan R, Padmanabhan çP, Sundari RB, Kamatchiammal S and Rao KS. Duplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis A and hepatitis E virus isolated from drinking water samples. *J Environ Monit*. 2000; 2:587-90.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *J Virol*. 1972; 10:1075-81.
- Kaplan JE, Goodman RA, Schonbereger LB. Gastroenteritis due to Norwalk virus: na outbreak associated with a municipal water system. *Journal of Infectious Diseases*. 1982; 146:190-3.
- Katzenelson EA. A rapid method for quantitative assay of poliovirus from water with the aid of the fluorescent antibody technique. *Arch. Virol*. 1976; 50:197-206.
- Keller R, Gonçalves RT. Molecular techniques monitoring rotavirus in wastewater treatment plants. *Virus Reviews and Research* 6: Abstract n. EV 4; 2001. p.96.
- Keswick BH, Gerba CP, Dupont HL, Rose JB. Detection of enterovirus in treated drinking water. *Appl Environ Microbiol*. 1984; 47:1290-94.
- Keswick BH Gerba CP, Secor SL. Survival of enteric viruses and newer enteroviruses. In: Fields BN (Ed.). *Virology*. New York: Raven Press, 1990. p. 549-605.
- Kotloff KL, Losonky GA, Morris JG, Wasserman SS, Singh-Naz N, Levine MM. Enteric adenovirus infection and childhood diarrhoea: na epidemiological survey in three clinical settings. *Pediatric*. 1989; 84:219-25.
- Lapoli FR, Hassemer MEN, Camargo JG, Damásio DLD, Lobo-Recio MA. Desinfecção de efluentes sanitários através de dióxido de cloro. *Eng Sanit Ambient*. 2005; 10:200-8.
- Lee SH, Kim SJ. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res*. 2002; 36:248-56.
- Le Guyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M. Detection of hepatitis A virus, rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-seminested PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60:3665-71.
- Leite JPG, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol*. 1996; 141:2365-74.
- Leong LYC. Removal and inactivation of viruses by treatment processes for potable water and wastewater – a review. *Wat Sci Technol*. 1983; 15:91-114.
- Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JDP, Freitas RBT, Oliveira N, Bellesi N et al. Epidemiology of rotavírus gastroenteritis in the Amazon region and the need for a specific vaccine. *J Braz Assoc Adv of Sci*. 1992; 44:152-7.
- Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JDP, Feitas RBT, Oliveira CS, Bellesi N, Monteiro TAF, Lins-Lainson Z, Ramos FLP, Vasente AS. Estudo prospectivo das infecções por rotavírus em Belém, Pará, Brasil: uma abordagem clínico-epidemiológica. *J Ped*. 1994; 70:220-4.
- Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Müller G, Peters D. Duovirus (rotavirus) em Belém do Pará, Brasil. *Rev. Inst Med trop S Paulo*. 1977; 19:278-9.

- Lodder WJ, Vinje J, Van de Heide R, Roda-Husman AM, Leenen EJTM and Koopmans MPG. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:5624-7.
- Loisy F, Le-Cann P, Pommepuy M, Le Guyader F. An improved method for the detection of Norwalk-like caliciviruses in environmental samples. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 31:411-415.
- MacCallum FO, Bradley WH. Transmission of infective hepatitis to human volunteers. *Lancet.* 1944; 2:228.
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Survey and summary: Real-Time PCR in virology. *Nucl Acids Res.* 2002; 30:1292-305.
- Margolis HS, Alter MJ, Hadler SC. Viral hepatitis. In: *Viral infections of humans, epidemiology and control.* 4 ed. New York: Plenum. 1997.
- Marques, E. Levantamento do número e dos tipos de Enterovírus em diferentes águas de esgoto da capital de São Paulo [dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1987.
- 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; 2003. p. 99-100.
- Marzouk, Y., Goyal, S.M., Gerba, C.P. Relationship of viruses and indicator bacteria in water and wastewater in Israel. *Water Res.* 1980; 14:1585-90.
- McDonald S. Acute yellow atrophy of the liver. *Edin Med J.* 1908; 1:83-8.
- Mehnert, D.U. Determinação da presença e do número de rotavírus em amostras de água de esgoto e de córregos poluídos da cidade de São Paulo. [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 1988. 214 p.
- Mehnert DU, Stewien KE. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59:140-3.
- Mehnert DU, Stewien KE, Hársi CM, Queiroz APS, Candeias JMG. Detection of rotavirus in sewage and creek Water: Efficiency of the Concentration Method. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1997; 92:97-100.
- Melnick JL. A waterborne urban epidemic of hepatitis. In: LoGrippo GA, Mateer JG, Barron J (Ed.). *Hepatitis Frontiers.* Boston: Little, Brown; 1957. p. 211-225.
- Melnick JL, Boggs JD. Human volunteer and tissue culture studies of viral hepatitis. *Can Med Assoc J.* 1972; 106:461-7.
- Meng Z, Birch C; Heath R, Gust I. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53: 727-30.
- Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology - a trip of over 50 years. *Ann Rev Microbiol.* 1995; 49:461-87.
- Morace G, Aulicino FA, Angelozzi C, Costanzo L, Donadio F, Rapicetta M. Microbial quality of wastewater: detection of hepatitis A virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol.* 2002; 92:826-36.
- Morillo SG. Identificação e caracterização molecular de norovírus em surtos de gastroenterites no Estado de São Paulo [Dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007. 121 p.

- Munford V. Diversidade sorológica e molecular de rotavírus identificados em humanos em São Paulo, Brasil. [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas de Universidade de São Paulo; 2007. 145 p.
- Nakagomi O, Isegawa Y, Hoshino Y, Aboudy Y, Shif I, Silberstein I, Nakagomi T, Ueda S, Sears J, Flores J. A new serotype of the outer capsid protein VP4 shared by an unusual human rotavirus strain Ro1845 and canine rotaviruses. *J Gen Virol.* 1993; 2771-4.
- Nakagomi T. Rotavirus infection and intussusception: a view from retrospect. *Microbiol Immunol.* 2000; 44: 619-28.
- Nwachcuku N, Gerba CP. Emerging waterborne pathogens: can we kill them all? *Elsevier.* 2004; 15:175-80.
- Olson MR, Axler RP and Hicks RE. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *Journal of Virological Methods.* 2004; 122:142-152.
- Parwani AV, Hussien HA, Rosen BI, Lucchelli A, Navarro L, Saif L. Characterization of field strains of group A bovine rotaviruses by using polymerase chain reaction-generated G and P type-specific cDNA probes. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:2010-5.
- Pauli, V. Ocorrência e distribuição de genótipos G e P de rotavírus em efluente doméstico e córrego da cidade de São Paulo. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2003. 121 p.
- Payment P and Trudel M. Immunoperoxidase method with human immune serum globulin for broad-spectrum detection of cultivable human enteric viruses: application to enumeration of cultivable virus in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 1985; 50:1308-10.
- Payment P. Isolation of viruses from drinking water at the Pont-Viau Water Treatment Plant. *Can J Microbiol.* 1981; 27:417-20.
- Payment P. Waterborne viruses and parasites: resistance to treatment and disinfection. In: OECD. Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water. Available from: Interlaken. 1998; 1-11.
- Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral Pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:3376-82.
- Pina S, Buti M, Jardi R, Clemente-Casares P, Jofre J, Girones R. Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *J Gen Virol.* 2001; 82:2955-63.
- Pintó RM, Alegre D, Domínguez, A, El-Senousy, WM, Sánchez G, Villena C, Costafreda MI, Aragonès L, Bosch A. Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiology and Infection.* 2007; 135:270-3.
- Pirinha JM, Pacheco A, Gamba R, Mehnert DU, Garrafa P, Barrella KM. Faecal Contamination (Viral and Bacteria) Detection in Groundwater used for Drinking Purposes in São Paulo, Brazil. *Geomicrobiology Journal.* 2006; 23:279-83.
- Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (PROSAB). Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas. Aplicações para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidroponia. Rio de Janeiro. ABES 2003.
- Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (PROSAB). Tratamento e utilização de esgotos sanitários. Rio de Janeiro. ABES 2006.
- Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted water by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60:2963-70.

- Queiroz, APS. Detecção e genotipagem de rotavírus presentes em amostras de águas de esgoto e de córrego da cidade de São Paulo, através da reação de RT-PCR. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas de Universidade de São Paulo. 1999. 166p.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67:4614-8.
- Rao VC, Metcalf TG, Melnick JL. Development of a method for concentration of rotavirus and its application to recovery of rotavirus from estuarine water. *Appl Environ Microbiol*. 1986; 52:484-8.
- Rao VC, Sullivan R, Read RB, Clarke NA. A simple method for concentrating and detecting viruses in water. *J Am Water Works Assoc*. 1968; 60:1288-94.
- Reiman HA, Price AH, Hodges JH. The cause of epidemic diarrhea, nausea and vomiting (viral dysentery?). *Proc Soc Exp Biol Med*. 1945; 59:8-9.
- Richards CP, Watson MA, Fankhauser RL, Monroe SS. Genogroup I and II Noroviruses detected in stool samples by Real-Time Reverse transcription-PCR using highly degenerate universal primers. *App Environ Microbiol*. 2004; 70:7179-84.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrot RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953; 84:570-3.
- Rusin P, Enriquez CE, Johnson D, Gerba CP. Environmentally transmitted pathogens. In : Maier RM, Pepper IL, Gerba CP (Ed.). *Environmental microbiology*. Academic Press: San Diego, 2000. p. 447-85.
- Santos FM. Detecção e caracterização genotípica de adenovírus humanos presentes em amostras de água de esgoto e córrego da cidade de São Paulo, utilizando PCR-RFLP. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2002. 118p.
- Santos FM, Vieira MJ, Garrafa P, Monezi, TA, Pellizari VH, Hársi CM, Mehnert DU. Discrimination of adenovirus types circulating in urban sewage and surface polluted waters in São Paulo city, Brazil. *Wat Sci Tech: Water Supply*. 2004; 4:79-85
- Sassaroli A. Vírus da Hepatite A: A presença e identificação dos genótipos circulantes nas águas de esgoto e de superfície da cidade de São Paulo, Brasil. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2002. 118p.
- Scholz E, Heinricy U, Flehmig B. Acid stability of hepatitis A virus. *J Gen Virol*. 1989; 70:2481-5.
- Schwab KJ, De Leon R, Sobsey MD. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61:531-7.
- Scipioni A, Daube G, Thiry E. Contamination of food and water by human pathogenic viruses. *Ann Med Vet*. 2000; 144:207-21.
- Seckler D, Barker R, Amarasinghe U. Water scarcity in the twenty-first century. *Int J Wat Res Dev*. 1999; 15:29-42.
- Sedmack G, Bina D, MacDonald J. Assessment of Enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from Milwaukee, Wisconsin, collected August 1994 to December 2002. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69:7181-7.
- Setti AA, Lima JEFW, Chaves AGM, Pereira IC. Introdução ao Gerenciamento de Recursos Hídricos. Brasília: Agência Nacional de Energia Elétrica; Agência Nacional de Águas. 2001; 12:63-75.
- Shiklomanov I. Appraisal and assessment of world water resources. *Wat Int*. 2000; 25:11-32.

- Shin GA and Sobsey MD. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water research*. 2008; 42: 4562-8.
- Siegl G, De Chastonay J, Kronauer G. Propagation and assay of hepatitis A virus in vitro. *J Virol Methods*. 1984; 9:53-67.
- Siegl G, Weitz M, Kronauer G. Stability of hepatitis A virus. *Intervir*. 1984; 22:218-26.
- Smith EM, Gerba CP. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Appl Environ Microbiol*. 1982; 43:1440-50.
- Sobsey MD, Jones BL. Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Appl Environ Microbiol*. 1979; 37:588-95.
- Steinmann J. Detection of rotavirus in sewage. *Appl Environ Microbiol*. 1981; 41:1043-5.
- Stewien KE. Análise virológica da água: estudo comparativo entre dois métodos para concentração de vírus de água de esgoto e determinação da razão entre os números de Enterovírus e de coliformes. [tese (livre-docência)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1979. 95p.
- Straub TM, Pepper IL, Gerba CP. Comparison of PCR and cell culture for detection of enteroviruses in sludge-amended field soils and determination of their transport. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61:2066-8.
- Symonds EM, Griffin DW and Breitbart M. Eukaryotic Viruses in wastewater samples from the United States. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75:1402-9.
- Taylor MB, Cox N, Very MA, Grabow OK. The occurrence of hepatitis A and astroviruses in selected river and dam waters in South Africa. *Wat Res*. 2001; 35:2653-60.
- Teunis PF, Nagelkerke NJ, Haas CN. Dose response models for infectious gastroenteritis. *Risk Anal*. 1999; 19:1251-60.
- Thompson SS, Jackson JL, Suava-Castillo M, Yanko WA, El-Jack Z, Kuo J, Chen CL, Williams FP, Schnurr DP. Detection of infectious human adenoviruses in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. *Water Environ*. 2003; 75: 163-70.
- Thurston-Enriquez JÁ, Hass CN, Jacangelo J, Riley K, Gerba CP. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69:577-82.
- Timenetsky MCST, Kisieliuss JJ, Grisi SJFE, EscobarAMU, Ueda M, Tanaka H. Rotavirus, adenovirus, astrovirus, calicivirus e small round virus particles em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na Grande São Paulo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1993; 35:275-80.
- Timenetsky MCST, Santos N, Gouveia V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol*. 1994; 32:2622-4.
- Tonani, K A A. Identificação e quantificação de metais pesados, parasitas e bactérias em esgoto bruto e tratado da Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto - SP. 2008. Dissertação (Mestrado). Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (EERP) da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. B168
- Toze S. Microbial pathogens in the wastewater. Literature review for urban water systems. C SIRO Land and Water. Australia. Technical report n°1/97. June 1997.
- Treanor JJ, Jiang X, Madore HP, Estes MK. Subclass-specific serum antibody responses to recombinant Norwalk - virus capsid antigen (rNV) in adults infected with Norwalk, Snow Mountain, or Hawaii virus. *J Clin Microbiol*. 1993; 31:1630-4.

- Tsai YL, Sobsey MD, Sangermano LR, Palmer CJ. A simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59:3488-91.
- Tsai Y, Tran B, Sangermano LR, Palmer CJ. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60:2400-7.
- Tucci CEM, Hespanhol I, Netto OMC. *Gestão de água no Brasil*. Brasília: UNESCO; 2001. 156 p.
- Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, Johansson ME. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol.* 1984; 20:365-72.
- Unesco. Facts and Figures, Water and Health. International Year of Freshwater. 2003. Disponível em: www.wateryear2003.org. Acessado em: Janeiro de 2008.
- United States Environmental Protection Agency. Guideline for Water Reuse, Manual, Technology Transfer – EPA/625/R-92/004, 1992.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Drinking Water Contaminant Candidate List 2; Final Notice. Federal Register; 70. U.S. Environmental Protection Agency: Washington. 2005a; 36:9071-7.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Microbial Source Tracking Guide Document, EPA-600/R-05-064; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development: Cincinnati. 2005b
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Guidelines for water reuse. EPA-625-R-04-108. Washington DC: EPA. 2004.
- Villena C, El-Senousy WM, Abad, FX, Pintó RM, Bosch A. Group A Rotavirus in Sewage Samples from Barcelona and Cairo: Emergence of Unusual Genotypes. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69:3919-23.
- Vinje J, Altena SA, Koopmans MPG. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis.* 1997;176:1374-8.
- Wallis C, Melnick JL. Concentration of viruses from sewage by adsorption on to millipore membranes. *Bulletin of the world Health organisation.* 1967a; 36:219-25.
- Wallis C, Melnick JL. Concentration of viruses on aluminium and calcium salts. *American Journal of Epidemiology.* 1967b; 85:459-68.
- White DO, Fenner FJ. Viral Syndromes. In: *Medical Virology*, California: Academic Press; 1994. p. 569.
- Wilhelmi de Cal I, Mohedano del Pozo RB, Sánchez-Fauquier A. Rotavirus and other viruses causing acute childhood gastroenteritis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 13:61-5.
- World Health Organization (WHO). Reuse of effluents: methods of wastewater treatment and health safeguards. Of a WHO meeting of experts. Technical report series N° 517. Geneva. WHO; 1973.
- World Health Organization. Health guidelines for use of wastewater in agriculture and aquaculture. Technical Report Series. 778. WHO, 1989, Geneva.
- World Health Organization (WHO). Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater. Volume 2: Wastewater Use in Agriculture. Geneva WHO; 2006a.
- World Health Organization (WHO). Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater - Volume 3: Wastewater Use in Aquaculture. WHO, Geneva; 2006b.
- World Health Organization - WHO. Hepatitis A. Bull WHO/CDC/CSR/ EDC/2000.7. 2000. Geneva:WHO. 38p Disponível em: <http://www.who.int>. Acessado em Setembro de 2008.

Wyn-Jones AP, Sellwood J. Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol.* 2001; 91:945-62.

Wyn-Jones AP, Pallin R, Sellwood J, Tougianidou D. Use of the polymerase chain reaction for the detection of enteroviruses in river and marine recreational waters. *Water Science and Technology.* 1995; 31:337-44.

Yates MV. Classical indicators in the 21st century-far and beyond the coliform. *Water Environment Research.* 2007; 79:279-86.

Zahorsky J. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr.* 1929; 46:391-5.