**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM**

CAROLINE LOPES CIOFI SILVA

**RECUPERAÇÃO DE NOROVIRUS NO PISO E NO AR APÓS
DIFERENTES PROTOCOLOS DE DESCONTAMINAÇÃO**

**SÃO PAULO
2017**

CAROLINE LOPES CIOFI SILVA

**RECUPERAÇÃO DE NOROVIRUS NO PISO E NO AR APÓS
DIFERENTES PROTOCOLOS DE DESCONTAMINAÇÃO**

Versão corrigida da tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Enfermagem na Saúde do Adulto (PROESA)
da Escola de Enfermagem da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Enfermagem na Saúde
do Adulto

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kazuko Uchikawa
Graziano

VERSÃO CORRIGIDA

A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da Escola de
Enfermagem da Universidade de São Paulo e na Biblioteca Digital de
Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo.

SÃO PAULO

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Catálogo na Publicação (CIP)
Biblioteca “Wanda de Aguiar Horta”
Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo

Ciofi-Silva, Caroline Lopes

Recuperação de norovirus no piso e no ar após diferentes protocolos de descontaminação: estudo experimental / Caroline Lopes Ciofi Silva. São Paulo, 2017.

134p.

Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kazuko Uchikawa Graziano

Área de concentração: Enfermagem na Saúde do Adulto

1. Serviço hospitalar de limpeza. 2. Transmissão de doenças. 3. Doenças infecciosas. 4. Enfermagem. I. Título.

Nome: Caroline Lopes Ciofi Silva

Título: Recuperação de norovirus no piso e no ar após diferentes protocolos de descontaminação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto (PROESA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Nome: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, que me capacitou e abriu as oportunidades. O meu desejo é que os frutos deste trabalho sejam para Sua honra e glória.

À minha filha Eduarda. Desculpe-me pela ausência em momentos preciosos e espero que ainda desfrutemos desta e de muitas outras conquistas ao longo de nossas vidas como família.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À querida profa. dra Kazuko Uchikawa Graziano.

Como aprendi com a senhora durante esses anos e, definitivamente, os seus ensinamentos ultrapassam as fronteiras da Ciência. Quero me espelhar na sua bondade, humildade, integridade e dedicação, trilhando minha carreira buscando excelência como a senhora. Obrigada por ser tão forte diante dos meus momentos de fraqueza! Agradeço a Deus pelo nosso encontro, e desejo que caminhemos juntas por muitos anos e muitos projetos.

AGRADECIMENTOS

A Deus. O Senhor me sustentou, concedeu saúde, me fortaleceu nos momentos em que pensei que não fosse conseguir, me orientou, me deu sabedoria para tomar as decisões e escolher os caminhos a serem seguidos.

Ao meu amado esposo, Alex. Mais uma vez continuamos dividindo sonhos, conquistas, alegrias e dificuldades. Esta jornada foi mais serena porque você estava ao meu lado! Obrigada pelo companheirismo, apoio, pelas palavras de incentivo, pela paciência e por entender minhas ausências.

Aos meus pais, Ronaldo e Tânia. Vocês não mediram esforços durante toda a minha existência e a do Dudu para que tivéssemos uma boa formação, que vai muito além da educacional. Pai, obrigada por me ensinar a ser perseverante, mesmo diante dos obstáculos. Mãe, que bom que Deus soprou em suas narinas e te fez forte para lutar pela vida. Obrigada por ser tão amorosa e cuidadosa!

Ao Dudu. "Ermão", agradeço por ser sempre tão disposto a me ajudar, independentemente da situação, me trazendo palavras de ânimo em momentos difíceis.

Aos meus sogros, Lourdes e Geraldo. Obrigada pela dedicação e prontidão em ajudar nos cuidados com a Eduarda, e em qualquer outra coisa em que tivemos necessidade durante esses anos.

À Alda. Você foi o presente que o doutorado me deu. Obrigada pela ajuda nos diversos momentos, por me acolher em sua casa e pela parceria, pois, com certeza, o seu olhar contribuiu para o aprimoramento deste trabalho.

À Camila Quartim. Obrigada pela sinceridade, pelas reflexões desde a concepção deste projeto, pela ajuda durante uma fase tão delicada da coleta de dados.

À Maíra. Obrigada pelas conversas inspiradoras e por se fazer perto, mesmo distante fisicamente em alguns momentos.

À dra. Rita de Cássia Compagnoli Carmona. Sua atuação foi essencial para a concretização deste estudo. Obrigada por ser sempre tão disposta desde o nosso primeiro encontro, incansável na busca pelo primor durante todas as fases desta pesquisa.

À Fabiana Cristina Pereira dos Santos, pesquisadora do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio e paciência na análise dos resultados.

Aos profissionais do Núcleo de Doenças Entéricas do Instituto Adolfo Lutz. Agradeço por me receberem, por terem flexibilizado suas rotinas de trabalho e pela disponibilidade em me ajudar. Em especial à Simone Morillo, pelo treinamento realizado e conhecimento transmitido.

À dra. Natália Inada e prof. dr. Vanderlei Bagnato, do Instituto de Física de São Carlos, pela bela parceria durante este projeto e disponibilidade em atenderem nossas necessidades.

A todos os colegas do grupo de pesquisa. Obrigada por promoverem debates e discussões que sempre agregaram conhecimento e me fizeram crescer como pesquisadora.

Às minhas queridas primas Larissa e Vivian, e às amigas Karen, Geisa, Laura e Kátia que me receberam em suas casas, cuidando de mim com tanto carinho.

À querida tia Marília, que sempre se manteve disposta e incansável para cuidar de mim, da Eduarda e de minha mãe.

Às minhas avós Edwiges e Irene, que sempre se preocuparam com o meu bem-estar e o de minha família.

À querida tia Raquel, pelas palavras de apoio e por ter se dedicado com tanta excelência para a correção deste trabalho.

Às minhas amigas-mães Priscila, Ana Maria, Dulcy, Aline e Thais. O mês de janeiro de 2014 foi especial para todas nós; foi muito importante dividir os desafios de ser mãe e estudante com vocês.

Aos queridos colegas do Hospital Estadual Sumaré. Serei eternamente grata a vocês por me apoiarem no início desta caminhada e em uma das fases mais difíceis da minha vida.

Ao estatístico Bernardo, pelas análises realizadas neste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão do auxílio financeiro que viabilizou a realização desta pesquisa.

"Venham a mim, todos os que estão cansados e sobrecarregados, e eu lhes darei descanso. Tomem sobre vocês o meu jugo e aprendam de mim, pois sou manso e humilde de coração, e vocês encontrarão descanso para as suas almas. Pois o meu jugo é suave e o meu fardo é leve".

(Jesus – Mateus 11.28-30)

Ciofi-Silva CL. Recuperação de norovirus no piso e no ar após diferentes protocolos de descontaminação [tese]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2017.

RESUMO

Introdução: O enfermeiro é responsável em atuar no controle da contaminação do ambiente, visando a prevenção de transmissão de infecções relacionadas à assistência à saúde. Surto de gastroenterite causados por norovirus (NoV) em locais fechados são caracterizados pela persistência do vírus no ambiente, aerolização das partículas virais e baixa dose infectante, mesmo em indivíduos saudáveis. Portanto, há necessidade de definição de um protocolo seguro para limpeza e desinfecção do piso contaminado com vômito e fezes, considerando a possibilidade de dispersão de aerossóis a partir do piso.

Objetivo: Avaliar a presença residual de partículas de NoV-GII no ar e no piso quando implementados diferentes protocolos de descontaminação do piso, após contaminação intencional. **Método:** Trata-se de um estudo experimental laboratorial. Dois tipos de piso, vinil e granito (matérias primas frequentemente utilizadas nos pisos dos serviços de saúde), foram contaminados intencionalmente com fezes humanas positivas 10% para NoV-GII, dissolvidas em 500ml de solução tampão salino-fosfato. Os pisos foram submetidos a três tipos de tratamento: limpeza padronizada com fricção manual, água e detergente neutro; limpeza seguida de desinfecção com hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos; limpeza seguida de desinfecção com dispositivo portátil de luz ultravioleta por cinco minutos (SURFACE-UV®). Amostras foram obtidas do piso, por meio do *swab*, e do ar, por meio de um coletador de ar (Coriolis® - Bertin Technologies, França), nos seguintes momentos: antes e após a contaminação intencional; após a limpeza e após os métodos de desinfecção. Para detecção de NoV-GII nas amostras, utilizou-se a técnica 4.6.2. Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa precedida de Transcrição Reversa (RT-qPCR), pelo método TaqMan®. **Resultados:** Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os tipos de piso após os protocolos de descontaminação, tanto para o residual de NoV-GII no piso, quanto no ar. Os valores médios de Cycle Threshold (Ct) após limpeza seguida de desinfecção foram maiores (38,75 – 40,00) comparados aos de após limpeza (35,67 – 38,66), comprovando a maior eficácia desse protocolo ($p < 0,001$). Em algumas amostras, a limpeza isolada foi capaz de reduzir a contaminação por NoV do piso até níveis indetectáveis. Quando houve residual de NoV-GII após a limpeza do piso, o protocolo cuja desinfecção foi realizada com hipoclorito de sódio foi mais eficaz do que a luz ultravioleta ($p < 0,001$), sendo que os valores de Ct de todas as amostras foram acima de 40. Em 27 das 36 (75%) amostras de ar coletadas após a limpeza do piso, foram detectadas partículas de NoV, com diferenças estatisticamente significantes entre as segundas e terceiras amostras, coletadas a 150cm do piso. Foram identificadas que, em média, 17 cópias de RNA viral/ μ L estavam presentes no ar após a limpeza, com redução gradual após a desinfecção. **Conclusões:** Quando vômito e fezes com NoV-GII contaminam o piso, há aerolização desse vírus já no ato da limpeza. Essas partículas podem ser inaladas ou depositarem em superfícies frequentemente tocadas pelas mãos, estabelecendo o ciclo de transmissão oro-fecal. As partículas virais residuais no piso após a limpeza, indiscutivelmente devem ser eliminadas, evitando assim a reaerolização do NoV a partir dessa fonte. Nesse sentido, a limpeza seguida de desinfecção com hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos mostra superioridade como protocolo de descontaminação do piso, quando comparado ao protocolo com limpeza seguida de desinfecção com luz ultravioleta por 5 minutos de exposição.

PALAVRAS-CHAVE: Norovirus. Serviço Hospitalar de Limpeza. Transmissão de Doença Infecciosa. Enfermagem.

Ciofi-Silva CL. Norovirus recovery from the floor and air after different decontamination protocols [thesis]. São Paulo: Nursing School, University of São Paulo; 2017.

ABSTRACT

Introduction: Nurses are responsible for controlling contamination of the environment, working to prevent the transmission of health-care-associated infections. Gastroenteritis outbreaks caused by Norovirus (NoV) in closed settings are characterized as the result of persistence of the virus in the environment, aerosolization of viral particles, and small infectious dose, even in healthy individuals. Therefore, a safe protocol to decontaminate the floor after vomit or feces have spilled must be defined, considering that subsequent aerosol dispersal may occur. **Objective:** To assess the presence of residual NoV-GII particles in the air and on the floor after different decontamination protocols are conducted on a deliberately contaminated floor. **Method:** This is an experimental laboratory study. Two types of floor, vinyl and granite (materials which are often used in the flooring of healthcare facilities), were intentionally contaminated with 10% NoV-GII-positive human feces dissolved in 500ml of a saline-phosphate buffer solution. The floors received three types of treatment: standard cleaning, with manual friction, water, and neutral detergent; cleaning followed by a ten-minute disinfection procedure using 1% sodium hypochlorite; and cleaning followed by a five-minute disinfection procedure using a portable ultraviolet light device (SURFACE-UV®). Swab samples were taken from the floor, and air samples were obtained using an air sampler (Coriolis®µ - Bertin Technologies, France) at the following moments: before and after the intentional contamination, after cleaning, and after disinfection. The TaqMan® method for real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction was used to detect NoV-GII in the samples. **Results:** No statistically significant difference between the two types of floor was found for residual NoV-GII, either in the air or on the floor, after the decontamination protocols. The average Cycle Threshold (Ct) values found after cleaning followed by disinfection were higher (38.75 - 40.00) than those recorded after cleaning (35.67 - 38.66), thus attesting to the greater effectiveness of the latter protocol ($p < 0.001$). In some samples, cleaning alone was enough to reduce floor contamination by NoV to undetectable levels. When residual NoV-GII was found after cleaning the floor, the disinfection protocol that involved using sodium hypochlorite proved more effective than UV-light exposure ($p < 0.001$), and Ct values were higher than 40 for all samples. NoV particles were detected in 27 of the 36 (75%) air samples obtained after cleaning the floor, and significant statistical differences were found between the second and third samples, collected 150cm from the floor. An average of 17 copies of viral RNA/µL were identified in the air after cleaning, gradually decreasing after disinfection. **Conclusions:** When NoV-GII-infected vomit or feces contaminate the floor, the virus is aerosolized even during cleaning. These particles may then be inhaled or settle on frequently touched surfaces, establishing the fecal-oral transmission cycle. Residual viral particles on the floor must undoubtedly be eliminated, thereby preventing NoV aerosolization from this source. Along these lines, cleaning followed by disinfection by 1% sodium hypochlorite for ten minutes proved to be a superior floor decontamination protocol when compared with cleaning followed by disinfection by UV-light exposure for five minutes.

KEYWORDS: Norovirus. Hospital Cleaning Service. Infectious Disease Transmission. Nursing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS SURTOS DE DIARREIA NOTIFICADOS NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, SEGUNDO MÊS DE NOTIFICAÇÃO, ENTRE OS ANOS DE 2013 E 2016.....	32
FIGURA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ÁGUA E ALIMENTO, CONFORME O MODO PROVÁVEL DE TRANSMISSÃO E MÊS DE OCORRÊNCIA, NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO.....	33
FIGURA 3 - ESTRUTURA DO CAPSÍDEO DO NOROVIRUS	36
FIGURA 4 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO NOROVIRUS	37
FIGURA 5 - DEMONSTRAÇÃO DE UM ENSAIO DE RT-PCR EM TEMPO REAL PELO MÉTODO TAQMAN®.....	42
FIGURA 6 - MODELO REPRESENTATIVO DE GRÁFICO RESULTANTE DE UMA RT-PCR EM TEMPO REAL.	43
FIGURA 7 – FUNCIONAMENTO DO COLETADOR DE AR DO TIPO CICLONE ...	66
FIGURA 8 - COLETADOR DE AR CORIOLIS®μ.....	66
FIGURA 9 - CILINDRO E POSICIONAMENTO DO COLETAR DE AR.....	67
FIGURA 10 - APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO CONTAMINANTE SOBRE A SUPERFÍCIE DE GRANITO, NO INTERIOR DO CILINDRO.	68
FIGURA 11 - PROCEDIMENTO DE LIMPEZA DO PISO.....	72
FIGURA 12 - DESINFECÇÃO COM HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%.....	73
FIGURA 13 - DESINFECÇÃO COM UV-C E AMOSTRAGEM DA ÁREA DELIMITADA.....	73
FIGURA 14 - UTILIZAÇÃO DO CONCENTRADOR DE AMOSTRAS DE AR.....	74
FIGURA 15 – FLUXOGRAMA DESCRITIVO DO DELINEAMENTO DO ESTUDO .	75
FIGURA 16 - RESULTADOS DOS TESTES COLORIMÉTRICOS PARA VALIDAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO AGENTE NEUTRALIZANTE. SÃO PAULO, 2017.	85
FIGURA 17 - GRÁFICO COM AS MÉDIAS DOS VALORES DE CT ENCONTRADOS APÓS CADA ETAPA DOS TRATAMENTOS. SÃO PAULO, 2017.	90
FIGURA 18 - CURVA-PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DAS AMOSTRAS (CÓPIAS DE RNA/REAÇÃO). SÃO PAULO, 2017.....	92

FIGURA 19 - GRÁFICOS COM AS CURVAS-PADRÃO E CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS APÓS LIMPEZA DO PISO (CÓPIAS DE RNA/REAÇÃO). SÃO PAULO, 2017..... 94

FIGURA 20 - GRÁFICOS COM AS CURVAS-PADRÃO E CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS APÓS PROTOCOLO DE DESCONTAMINAÇÃO "U" POR TRÊS E CINCO MINUTOS (CÓPIAS DE RNA/REAÇÃO). SÃO PAULO, 2017..... 95

FIGURA 21 - CURVAS-PADRÃO E CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DO AR APÓS LIMPEZA (QUANTIDADE DE RNA/REAÇÃO).. SÃO PAULO, 2017. 96

-

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VALORES DE <i>CYCLE THRESHOLD</i> (CT) DAS AMOSTRAS COLETADAS DURANTE A VALIDAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE DESCONTAMINAÇÃO. SÃO PAULO, 2017.....	83
TABELA 2 - VALORES DE <i>CYCLE THRESHOLD</i> (CT) DAS AMOSTRAS OBTIDAS DURANTE VALIDAÇÃO DO TEMPO DE AÇÃO DA LUZ ULTRAVIOLETA. SÃO PAULO, 2017.	84
TABELA 3 - DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE COLORIMÉTRICO PARA CONCENTRAÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO PARA VALIDAÇÃO POR DILUIÇÃO DO AGENTE NEUTRALIZANTE. SÃO PAULO, 2017.....	85
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES E MÉDIAS DE <i>CYCLE THRESHOLD</i> (CT) DAS AMOSTRAS OBTIDAS PARA VALIDAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO NEUTRALIZANTE DO HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%. SÃO PAULO, 2017.	86
TABELA 5 - VALORES DE <i>CYCLE THRESHOLD</i> (CT) DAS AMOSTRAS APÓS A LIMPEZA SEGUNDO O TIPO DE PISO. SÃO PAULO, 2017.	89
TABELA 6 - VALORES DE <i>CYCLE THRESHOLD</i> (CT) SEGUNDO O TIPO DE TRATAMENTO E PISO IMPLEMENTADOS NA SUPERFÍCIE. SÃO PAULO, 2017.	90
TABELA 7 - VALORES DE <i>CYCLE THRESHOLD</i> DAS AMOSTRAS DE AR OBTIDAS APÓS LIMPEZA E DESINFECÇÃO SEGUNDO O MOMENTO DA COLETA. SÃO PAULO, 2017.	92

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DISTRIBUIÇÃO DE SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS, SEGUNDO AGENTE ETIOLÓGICO, NOTIFICADOS NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, ENTRE 2009 E 2016.	35
QUADRO 2 - IDENTIFICAÇÃO DAS SOLUÇÕES DAS AMOSTRAS OBTIDAS PARA VALIDAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO AGENTE NEUTRALIZANTE. SÃO PAULO, 2017.	64
QUADRO 3 - DESCRIÇÃO DE <i>PRIMERS</i> E <i>PROBES</i> UTILIZADOS NO RT-PCR EM TEMPO REAL. SÃO PAULO, 2017.	78
QUADRO 4 - QUADRO DESCRITIVO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CÓPIAS DE RNA DE NOROVIRUS. SÃO PAULO, 2017.	81
QUADRO 5 - VALORES DOS <i>CYCLE THRESHOLD</i> DAS AMOSTRAS OBTIDAS DURANTEVALIDAÇÃO DA COLETA DE AR. SÃO PAULO, 2017	87

LISTA DE ABREVIATURAS

SS	serviços de saúde
H_0	hipótese nula
H_1	hipótese alternativa
NoV	norovirus humano
PS	Profissionais da Saúde
UV-C	ultravioleta C

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	adenosina trifosfato
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DNA	ácido dextrorribonucleico
dNTP	dextrorribonucleotídeos fosfatados
DTHA	Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
FCV	Calicivirus felino
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IAL	Instituto Adolfo Lutz
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotássico
MgSO ₄	sulfato de magnésio
MNV	norovirus murino
Na ₂ HPO ₄	fosfato dissódico anidro
NaCl	cloreto de sódio
NDE	Núcleo de Doenças Entéricas
ORF	<i>open reading frames</i>
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PMDDA	Programa de Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas
PVC	policloreto de polivinila
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	Transcrição Reversa-Reação em Cadeia pela Polimerase
RT-qPCR	Transcrição Reversa-Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
SCIH	Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

cm	centímetro
L/min	litro por minuto
$\log_{10}$	logaritmo de base 10
m	metro
m/h	metro por hora
m^3	metro cúbico
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
MW	megawatt
mW/cm^2	miliwatt por centímetros quadrados
nM	nanomolar
nm	nanômetro
°C	graus Celsius
ppm	partes por milhão
x g	força centrífuga
μm	micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REFERENCIAL TEÓRICO-METODOLÓGICO	28
2.1. INFECÇÕES VIRAIS	28
2.2. GASTROENTERITES AGUDAS	32
2.3. NOROVIRUS	35
2.4. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE NOROVIRUS	39
2.5. OCORRÊNCIA DE SURTOS POR NOROVIRUS.....	43
2.6. MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE NOROVIROSES	46
2.7. LIMPEZA E DESINFECÇÃO DE PISO	50
2.8. CONTAMINAÇÃO DO AR APÓS PROCEDIMENTOS DE LIMPEZA	54
3. OBJETIVO.....	57
3.1. OBJETIVO GERAL	57
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4. MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1. NATUREZA DO ESTUDO	59
4.2. LOCAL DO ESTUDO	59
4.3. PRINCIPAIS MATERIAIS	59
4.4. VALIDAÇÕES METODOLÓGICAS	60
4.5. DELINEAMENTO DO ESTUDO	68
4.6. DETECÇÃO DE NOROVIRUS NAS AMOSTRAS	76
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	81
4.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	81
5. RESULTADOS	83
5.1. ETAPAS DE VALIDAÇÃO	83
5.2. ETAPA DE COLETA DE DADOS	88
6. DISCUSSÃO	98
7. CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS.....	115
APÊNDICE A – PROTOCOLO PARA VALIDAÇÃO DO AGENTE NEUTRALIZANTE	126
APÊNDICE B – PROTOCOLO PARA VALIDAÇÃO DA COLETA DE AR	129
APÊNDICE C – PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS	132
APÊNDICE D – RESULTADOS DAS COLETAS DE DADOS	134

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Para Florence Nightingale, o primeiro aspecto que o enfermeiro deveria estar atento era a ventilação. Manter o ar puro semelhante ao ar externo, com janelas e portas abertas, seria essencial para a recuperação do paciente. Da mesma forma, a limpeza era uma das suas preocupações, considerando a organização do ambiente de assistência à saúde como um dos aspectos vitais para o ser humano na recuperação da doença. Florence Nightingale foi a precursora na busca por modificação das práticas habituais de sua época e, em seu livro “Notes on nursing: What it is, what it is not”, ela destaca o papel do enfermeiro nessas atividades (NIGHTINGALE, 1865)

O controle das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) abrange diversos aspectos e compreende a implementação de múltiplas medidas, dentre elas a limpeza das superfícies. Sabe-se que o conceito de limpeza no ambiente hospitalar extrapola as ações de controle de infecção, pois envolve aspectos estéticos e culturais. Um ambiente considerado visualmente não limpo é frequentemente associado ao risco de infecções. Portanto, ressalta-se a importância da percepção de limpeza entre pacientes, familiares e a própria equipe de profissionais. No entanto, a presença de microrganismos nas superfícies não é detectada a olho nu e nem sempre está associada à existência de sujidades visíveis (DANCER, 2009).

O serviço de higiene e limpeza dos serviços de saúde (SS) visa garantir a permanência de um local limpo e um ambiente que minimize o risco de transmissão de infecções oriundas de fontes inanimadas. Ele também prepara o ambiente para os procedimentos que serão realizados, preocupa-se com a manutenção da ordem, conservação de equipamentos e instalações. Dessa forma, serão garantidos o conforto e a segurança dos usuários, familiares e acompanhantes, bem como dos profissionais (BRASIL, 2010).

A limpeza de superfícies consiste na remoção da matéria orgânica e inorgânica, visíveis ou não, que interferem na ação dos desinfetantes. Trata-se de uma ação física de fricção, associada ao uso de solução de detergentes ou outros agentes de limpeza contendo surfactantes, seguida de enxague com água. A

limpeza é capaz de reduzir um número expressivo de microrganismos e, se inadequada, compromete o procedimento de desinfecção. Já a desinfecção de superfícies consiste na utilização de agentes físicos ou químicos para eliminação dos patógenos; a indicação do desinfetante depende da criticidade das superfícies quanto ao risco de transmissão de infecções (SEHULSTER et al., 2004).

Evidências científicas recentes demonstram a importância do papel das superfícies na transmissão de IRAS. Há uma grande preocupação quanto à eliminação de patógenos do ambiente, principalmente quando se diz respeito àqueles que podem sobreviver dias ou semanas intactos na mesma superfície, ou em equipamentos utilizados na Saúde, entre eles *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, *Enterococcus* spp. resistente à Vancomicina, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter* spp. e norovírus humano (NoV), agentes etiológicos desafiadores no combate a IRAS. A principal via de transmissão são as mãos ou luvas contaminadas dos Profissionais de Saúde (PS) que entram em contato com o próprio paciente ou superfícies, objetos e equipamentos (DANCER, 2014; WEBER; ANDERSON; RUTALA, 2013). Definitivamente, a higiene das mãos dos PS falha, assim como a disciplina da retirada imediata das luvas de procedimento após a sua utilização.

O processo de descontaminação de superfícies, muitas vezes, é deficiente, fato comprovado pelo aumento do risco de um paciente ser infectado se for internado em um quarto previamente ocupado por um paciente colonizado ou infectado por patógenos multidroga resistentes (MITCHELL et al., 2015). A limpeza seguida de desinfecção, com método de eficiência cientificamente comprovada, das superfícies frequentemente tocadas é essencial para um ambiente seguro. O advento de tecnologias para descontaminação do ambiente, como dispersão de peróxido de hidrogênio ou irradiação com luz ultravioleta (UV-C) apresentam vantagens e limitações. Contudo, não substituem a limpeza, o melhor planejamento de ocupação dos leitos e o envolvimento de todos os profissionais responsáveis pelo controle da contaminação ambiental (DANCER, 2013; OTTER; YEZLI; FRENCH, 2011).

Existem dissensos entre especialistas no controle de IRAS quanto à necessidade de apenas limpeza ou limpeza seguida de desinfecção, quando se referem ao piso. A preocupação com o uso indiscriminado e rotineiro de desinfetantes decorre principalmente dos danos potenciais aos materiais e equipamentos, toxicidade para os profissionais, contaminação ambiental com

resíduos químicos e seleção dos microrganismos resistentes ao microbicida (DANCER, 2014; OTTER; YEZLI; FRENCH, 2011).

O piso dos SS apresenta altos níveis de contaminação e com grande diversidade microbiológica. Microrganismos foram identificados no piso (MAHIDA; BOSWELL, 2016), nas solas de calçados (RASHID et al., 2016), propés (GALVIN et al., 2016) e nas meias antiderrapantes (MAHIDA; BOSWELL, 2016), mesmo quando não havia notificação de casos ou surtos associados aos patógenos encontrados. No piso, mesmo quando implementado protocolo de limpeza e desinfecção, ocorre rápida recontaminação devido à transferência de microrganismos via sola de calçados, deposição de gotículas ou aerossóis (AYLIFFE; COLLINS; LOWBURY, 1966). As hipóteses são que a disseminação ocorra de algumas formas: patógenos presentes no piso são ressuspensos a partir da circulação de pessoas e movimento de equipamentos; transferência de patógenos para as mãos do PS quando tocam no piso ou tocam objetos que caem ou estão próximos ao piso; pacientes deitam com calçados ou meias contaminados e os patógenos são transferidos para o leito (KOGANTI et al., 2016; MAHIDA; BOSWELL, 2016).

Entre os microrganismos citados como epidemiologicamente importantes para o homem, atualmente destacam-se os NoV como a principal causa de surtos epidêmicos de gastroenterite viral mundial, tanto em crianças como em adultos. O *Centers for Disease Control and Prevention* dos Estados Unidos da América (CDC - EUA), por meio de um sistema de registro de surtos ocorridos no território norte-americano, apresentaram que, até 2009, os surtos de gastroenterites agudas eram predominantemente associados à água e alimentos contaminados. No entanto, ao analisarem os surtos ocorridos entre 2009 e 2013, cuja transmissão ocorreu via pessoa-pessoa e contaminação ambiental, identificou-se que NoV foi o único agente etiológico suspeito ou confirmado em 62% (n = 5.720) de 9.193 surtos; e em 86% (n = 2.888) de 3.362 surtos com pelo menos um teste laboratorial confirmado. Adicionalmente, quando o modo de transmissão era desconhecido, o NoV esteve relacionado a 32% (n = 503) de 1.563 surtos no total e 44% (n = 327) de 750 surtos, com pelo menos um teste laboratorial confirmado (WIKSWO et al., 2015).

No Brasil, o Instituto Adolfo Lutz (IAL), através do Núcleo de Doenças Entéricas (NDE-IAL), participa do Programa Nacional de Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas (PMDDA), juntamente com outros laboratórios de referência. Esse programa tem identificado que os NoV também têm sido

frequentemente associados a surtos de gastroenterite em todo país (MORILLO; TIMENETSKY, 2011). O aumento de casos confirmados e surtos de doenças transmitidas por água e alimentos associados aos NoV foi observado no estado de São Paulo nos últimos anos (CVE, 2016). Há que se considerar a possibilidade do viés de implementação de novas tecnologias diagnósticas, que pode não significar necessariamente aumento de casos, mas sim maior acurácia diagnóstica.

A preocupação com a prevenção e controle das noroviroses (gastroenterite ocasionada por NoV) é oriunda dos diversos relatos de surtos em hospitais e outros locais, como navios, escolas, hotéis e casas de repouso. Os surtos provavelmente são provocados pela associação de fatores característicos aos NoV, conferindo alta transmissibilidade a esses vírus: aerolização das partículas virais; persistência no ambiente; tolerância aos desinfetantes; dose infectante baixa, mesmo em indivíduos considerados saudáveis; alta carga viral eliminada pelo indivíduo infectado e ausência de imunidade prolongada após infecção prévia (CHEESBROUGH et al., 2000; TUNG-THOMPSON, 2015). Aerossóis com NoV foram identificados não só em quartos de pacientes com sintomas de gastroenterite, mas também em áreas de circulação comum e próximos ao posto de enfermagem (BONIFAIT et al., 2015).

O enfermeiro é responsável em atuar na gestão da segurança do ambiente contra as IRAS, seja os que atuam na assistência direta ao paciente como aqueles envolvidos nos processos gestores. Assim sendo, deve participar ativamente no direcionamento, na elaboração, implementação e avaliação dos procedimentos de descontaminação de superfícies dos SS e controle da contaminação ambiental. A preocupação com o controle da transmissão de NoV nos SS procede da falta de padronização de protocolo de descontaminação do piso. Questiona-se sobre a possibilidade do piso, quando contaminado, atuar como fonte de partículas virais que podem dispersar na forma de aerossóis, disseminando NoV para outros ambientes. Dessa forma, este estudo foi realizado com o intuito de avaliar diferentes protocolos de descontaminação de piso contaminado com NoV e se há dispersão de aerossóis com partículas virais após esses procedimentos.

2. Referencial Teórico- Metodológico

2. REFERENCIAL TEÓRICO-METODOLÓGICO

2.1. INFECÇÕES VIRAIS

As doenças virais constituem causa considerável de morbi-mortalidade, sendo que muitos casos não são notificados. O impacto das suas incidências relaciona-se a aspectos econômicos e sociais, como absenteísmo no trabalho e escola; diminuição da produtividade e custos do tratamento médico (MORAWSKA, 2006). Nos últimos anos, doenças virais emergentes são motivo de grande preocupação internacional e são assuntos de destaque tanto na mídia popular, como entre as autoridades sanitárias.

Os vírus possuem estrutura simples, são parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, dependem da maquinaria bioquímica de uma célula hospedeira para fazer a replicação do seu genoma e sintetizar proteínas. A infecção ocorre quando o vírus se multiplica dentro da célula. No entanto, também são capazes de adquirir uma forma extracelular (ácido nucleico livre) e de sobreviver fora do hospedeiro por períodos prolongados, sem replicação (MADIGAN et al., 2009).

O vírion, partícula do vírus que se move da célula onde é produzido para outra, consiste em um genoma de ácido nucleico (ácido dextrorribonucleico - DNA ou ácido ribonucleico - RNA) circundado por uma camada de proteínas chamada capsídeo. O capsídeo pode estar desnudo ou coberto por um envoltório composto por lipídeos, proteínas e glicoproteínas. Os vírus sem envoltórios são mais tolerantes ao ressecamento, ao ácido e menos suscetíveis aos agentes químicos virucidas. Os vírus com envoltórios são mais facilmente inativados, pois a estrutura membranosa do envoltório é mantida apenas em soluções aquosas, sendo prontamente rompida em condições de ressecamento, meios ácidos, detergentes ou solventes (MADIGAN et al., 2009; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

A replicação viral é iniciada após o reconhecimento da célula-alvo de acordo com o tropismo tecidual. Ocorre então a fixação do vírion a partir da interação de uma parte ou proteína do capsídeo (vírus sem envoltório), ou proteínas de fixação viral (vírus com envoltório) com os receptores da célula-alvo. Após a penetração, o capsídeo ou envoltório é removido e o genoma viral é liberado no citoplasma ou

núcleo, dependendo do tipo de vírus. Inicia-se uma fase denominada tardia, quando ocorre a síntese de RNA mensageiro (RNAm) e proteínas para a replicação viral. As proteínas estruturais são sintetizadas tardiamente e, após a montagem, os vírus são liberados por lise celular, exocitose ou brotamento da membrana plasmática. Algumas etapas da replicação viral apresentam diferenças entre os tipos de vírus (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Quanto aos mecanismos de patogênese, de modo geral, a replicação viral leva à destruição da célula, seja por inibição da síntese de macromoléculas ou pela produção de enzimas de degradação e proteínas tóxicas. Outros efeitos celulares da infecção viral são descritos como: fusão de células (sincícios) e acúmulo de proteínas e estruturas virais (corpos de inclusão); infecção latente (não há síntese viral); infecção persistente (quando não há morte celular e novos vírus são liberados lentamente); transformação ou imortalização da célula (vírus oncogênicos) (MADIGAN et al., 2009; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Apesar das alterações teciduais relatadas, na maior parte das vezes, os sinais e sintomas da infecção viral são decorrentes das reações inflamatórias, locais e sistêmicas. As reações inflamatórias desencadeadas pelo sistema imune levam a danos teciduais. A virulência (capacidade do vírus de causar a doença) depende da espécie do vírus, da carga viral, da via de inoculação e suscetibilidade do hospedeiro (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Geralmente, os vírus apresentam dose infecciosa baixa; indisponibilidade de vacinas seguras e efetivas contra muitas infecções virais; e as terapias medicamentosas apresentam sucesso limitado. Esses fatores, associados à seleção de vírus resistentes aos fármacos, demonstram a necessidade de virucidas eficazes para o controle e prevenção da propagação dessas doenças (MAILLARD; SATTAR; PINTO, 2013).

As doenças virais são transmitidas pelas seguintes vias: 1 - contato direto com secreção, excreção ou sangue de indivíduo infectado; 2 - contato com veículos vivos ou objetos inanimados contaminados; 3 - transmissão por via aérea, através de gotículas e aerossóis eliminados durante espirro, tosse, vômitos ou aerolização das fezes; 4 - infecção endógena; 5 - transmissão por animal vetor (MORAWSKA, 2006, MAILLARD; SATTAR; PINTO, 2013).

Portanto, existem os vírus de transmissão respiratória, fecal-oral e parenteral. Os vírus de transmissão fecal-oral podem contaminar os fômites, definidos como

superfícies ou objetos porosos ou não-porosos que podem servir como veículo de transmissão de doenças. Esses se tornam contaminados por contato direto com secreções e fluidos, contato com mãos previamente contaminadas, aerossóis ou outros fômites contaminados. Em geral, os vírus de transmissão fecal-oral podem sobreviver por longos períodos (até dois meses) nos fômites (MUNFORD et al., 2013).

A transmissão de doenças virais em ambientes fechados é influenciada por diversos fatores, como: tipo de vírus e seus potenciais efeitos na saúde humana; forma de eliminação pelo corpo; nível de concentração do agente patológico; tamanho e distribuição do aerossol que contém o vírus; características físicas do ambiente, como temperatura, umidade, oxigenação, luz UV-C, meio de suspensão; padrão de circulação de ar; sistema de aquecimento, ventilação ou de ar condicionado (MORAWSKA, 2006).

A gotícula é um dos veículos de transmissão das doenças virais e seu tamanho é o fator que mais influencia no deslocamento e nas propriedades biológicas. Os tamanhos das gotículas contendo vírus variam entre 0,02 a 0,3µm, bactérias entre 0,5 a 10µm e fungos entre 0,5 a 30µm. A atomização, ou seja, produção de aerossóis por meio da transformação de um volume de líquido para a fase gasosa, ocorre por combinar forças físicas como tensão superficial e viscosidade do líquido versus força aerodinâmica. Tanto a produção dos aerossóis como o processo para sua desintegração são importantes. Exemplificando, partículas menores são mais rapidamente submetidas à aceleração ou desaceleração; no entanto, seus tempos de aquecimento e vaporização são menores. Cabe destacar que, após a evaporação, partículas residuais (secas) podem permanecer suspensas no ar por períodos prolongados. Já as partículas maiores são mais facilmente depositadas em superfícies em decorrência da gravidade (MORAWSKA, 2006).

Existem distinções nas definições de gotículas, aerossóis e núcleo goticular (*"droplet nuclei"*) entre os pesquisadores do tema. Aerossóis podem ser definidos como a suspensão de um líquido ou partícula de líquido em forma de gás, de tamanho variável entre 0,001µm a 100µm. Quando contém um microrganismo são chamados aerossóis infecciosos ou bioaerossóis. O núcleo goticular é entendido como a partícula residual de um bioaerossol, quando a maior parte do líquido evaporou-se (TANG et al., 2006), restando essencialmente o microrganismo ou

vírus. Qian e colaboradores (2006) afirmam que o núcleo goticular é tolerante à secagem ou desidratação, são menores que 5µm, podem ser facilmente inalados e se deslocam lentamente com velocidade inferior de 1m/h. Para este estudo, padronizou-se a utilização das definições da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2000): transmissão de microrganismos por gotículas (partículas maiores que 5µm) e aerossóis (menor ou igual a 5µm).

Os vírus estão presentes no ambiente dos SS e ambientes comuns. Verani e colaboradores (2014) coletaram amostras das superfícies habitualmente tocadas (assento e tampa do vaso sanitário, botão da descarga e maçaneta interna), da água e do ar. Vírus como adenovírus humano, toque-tenovírus ou NoV foram identificados em 82% das superfícies testadas em banheiros de um hospital e 71% de um escritório; 85% e 75%, respectivamente, das amostras de ar; não foram encontradas diferenças entre o hospital e o escritório para as amostras de água. Observou-se alta correspondência nas cepas de adenovírus das amostras de ar e água, sugerindo que as gotículas e aerossóis dispersados pela descarga do vaso sanitário são importantes fontes de contaminação.

Além das doenças do trato respiratório, aerossóis e gotículas exercem papel importante em doenças diarreicas de transmissão fecal-oral, como as norovirose. Isso se deve ao fato de que, durante o vômito também ocorre a atomização, sendo que indivíduos infectados podem eliminar mais de 10^7 partículas virais por ml de vômito e a propagação ocorre por inalação direta das partículas virais ou por vias indiretas. Quanto às fezes, indivíduos infectados podem eliminar mais de 10^{12} partículas virais por grama de fezes, principalmente através da aerolização de descargas dos banheiros e sistemas de tubulação de construções (MORAWSKA, 2006).

No estudo de Booth (2014), foi descrito um modelo para simular um episódio de vômito explosivo, característico de norovirose. Utilizando um manequim e líquido fluorescente representando a matéria orgânica, constatou-se que gotículas são geradas antes mesmo da ejeção do fluido volumoso, para a frente e para trás do manequim. Com a tendência de as gotículas caírem pela gravidade, formou-se uma nuvem de aerossóis embaixo e ao redor do fluido mais volumoso do vômito. Após o momento da ejeção do volume principal, houve menor formação de gotículas. No final da simulação, observou-se que, com a diminuição da força de ejeção do vômito, houve menor deslocamento de conteúdo quando comparado ao do início da

simulação. A autora descreve que as gotículas são geradas tanto com a ejeção do jato principal como com a colisão das gotículas com as paredes e com o piso.

2.2. GASTROENTERITES AGUDAS

As gastroenterites ou doenças diarreicas agudas podem ser de origem bacteriana, viral, parasitária ou outros agentes (químicos, fungos e toxinas). De forma geral, seus sintomas duram poucos dias e a gravidade da desidratação depende tanto do agente etiológico como do estado de imunidade da pessoa infectada. Mais frequentemente são veiculadas por água ou alimentos contaminados, no entanto o patógeno pode contaminar fômites que são tocados ou levados diretamente à boca. No Brasil, pode-se observar certa sazonalidade na ocorrência de surtos, sendo que nos meses quentes ocorrem surtos mais associados à deterioração de alimentos, às chuvas e enchentes; nos meses frios, predominam os vírus entéricos, como o rotavírus e NoV, que são transmitidos principalmente em locais fechados (CVE, 2012; PREFEITURA MUNICIPAL DE SÃO PAULO, 2017). Na figura 1 podem ser visualizados os gráficos de incidência de surtos por doenças diarreicas no município de São Paulo.

Figura 1 - Distribuição dos surtos de diarreia notificados no município de São Paulo, segundo mês de notificação, entre os anos de 2013 e 2016

Fonte: SINAN NET/GCCD/COVISA/SMS

A vigilância epidemiológica das doenças diarreicas é prejudicada porque, para muitos casos isolados ou surtos, não é possível obter com precisão a definição da fonte de contaminação. Adicionalmente, muitas vezes a investigação laboratorial não é realizada e quando o indivíduo acometido procura um SS, o tratamento é implementado com base no diagnóstico clínico (PREFEITURA MUNICIPAL DE SÃO PAULO, 2017). Essas lacunas dificultam a análise de dados epidemiológicos e, geralmente, a redução de surtos notificados pode estar relacionada tanto à subnotificação, como verdadeiramente à diminuição de ocorrência da doença. Outros agravantes são os entraves e obstáculos existentes entre os SS e os serviços de vigilância epidemiológica, impedindo, muitas vezes, que ações sejam implementadas a tempo de conter um surto de gastroenterite aguda. Na figura abaixo (Figura 2), estão apresentados os dados de surtos de doenças transmitidas por água e alimento no município de São Paulo, de janeiro de 2013 até dezembro de 2016, conforme o modo provável de transmissão.

Figura 2 - Características dos surtos de doenças transmitidas por água e alimento, conforme o modo provável de transmissão e mês de ocorrência, no município de São Paulo.

Características dos surtos de DTA	2013 (n=269)		2014 (n=158)		2015 (n=125)		2016 (n=88)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Modo provável de transmissão								
Direto (pessoa-pessoa)	80	29,7%	37	23,9%	41	32,8%	38	43,2%
Indireto (fonte comum-água)	6	2,2%	4	2,6%	8	6,4%	2	2,3%
Indireto (fonte comum-alimento)	86	32,0%	61	39,4%	54	43,2%	37	42,0%
Indeterminado (Agregado de Casos)	97	36,1%	56	36,1%	22	17,6%	11	12,5%
Local de Ocorrência								
Domicílio	140	52,0%	58	37,4%	35	28,0%	22	25,0%
Estab Comerc Alimentos	50	18,6%	55	35,5%	35	28,0%	31	35,2%
Escolas/creches	48	17,8%	29	18,7%	27	21,6%	23	26,1%
Unidades de saúde	11	4,1%	12	7,7%	13	10,4%	6	6,8%
Outros	20	7,4%	4	2,6%	15	12,0%	6	6,8%

Fonte: SINAN NET/GCCD/COVISA/SMS

No estado de São Paulo, o IAL atua juntamente com a Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) na vigilância de casos e surtos de doenças diarreicas. Através do PMDDA, além do monitoramento, são realizados treinamentos para conscientização da

importância da notificação; definição de fluxos de coleta e encaminhamento das amostras clínicas para diagnóstico e implementação de técnicas diagnósticas avançadas (CVE, 2017; IAL, 2017). Ressalta-se que o foco principal do programa é a vigilância de água, alimentos e meio ambiente e não necessariamente a transmissão via fômites.

No Brasil, os especialistas discutem se as noroviroses são um problema emergente ou se o aumento de notificações de surtos se deve às melhorias diagnósticas. Em São Paulo, o CVE identificou um salto de notificação a partir de 2009, possivelmente associado à parceria estabelecida com o NDE-IAL que implementou e padronizou a técnica de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*, traduzida como Transcrição Reversa – Reação em cadeia da polimerase) para diagnóstico laboratorial. Os dados sobre a distribuição de surtos no município de São Paulo estão apresentados no quadro 1. Nota-se que, entre 2012 e 2016, nos quais houve identificação do agente etiológico, NoV foi o principal patógeno associado a surto de doenças transmitidas por alimentos, com exceção do ano de 2011, quando os rotavirus foram predominantes. Contudo, ainda há predomínio significativo na ocorrência de surtos sem coleta de amostras, o que impossibilita a implementação de medidas específicas para o controle, de acordo com o agente etiológico. O enfermeiro exerce papel importante nas ações de detecção precoce e controle do surto, como já mencionado, mas cabe ressaltar a importância da sua função junto às ações de vigilância em saúde.

Quadro 1 – Distribuição de surtos de doenças transmitidas por alimentos, segundo agente etiológico, notificados no município de São Paulo, entre 2009 e 2016.

Agente Etiológico	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Norovírus	8	8	6	17	14	10	9	8
Rotavírus	3	5	17	13	10	9	5	5
<i>E coli</i>	3	3	6	5	3	1	5	0
<i>C perfringens</i>	0	1	3	2	2	2	1	1
<i>Shigella spp</i>	3	1	2	0	3	2	1	0
<i>B cereus</i>	1	3	1	0	3	2	1	0
<i>S. enteritidis</i>	0	2	2	2	1	1	0	0
<i>S. aureus</i>	2	1	0	1	0	0	0	0
<i>Salmonella spp</i>	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>B cereus/C perfringens</i>	0	0	0	0	1	0	0	0
Outras bactérias	0	0	1	0	1	0	0	1
<i>Cryptosporidium spp.</i>	1	1	1	0	0	0	0	0
Outros parasitas	2	1	0	0	0	0	0	0
Toxina escombroide	0	0	0	2	1	1	0	1
Outros	2	0	0	0	0	0	0	0
Não identificado agente	13	13	26	23	23	21	10	5
Total de surtos c/ amostras coletadas	38	39	65	67	62	49	32	21
% Noro/ total	21,1	20,5	9,2	25,4	22,6	20,4	28,1	38,1
Total de surtos s/ amostras coletadas	284	344	251	344	206	107	90	67
Total de surtos	322	383	316	411	268	156	122	88

Fonte: SINAN NET/COVISA/ Banco de surtos de DTA

2.3. NOROVIRUS

Os NoV foram pela primeira vez associados a um surto de gastroenterite ocorrido em Norwalk, Ohio, em 1968, fato que motivou a nomeação provisoriamente como vírus Norwalk. Ocorrido em uma escola primária, acometeu professores, estudantes e, secundariamente, os familiares dos primeiros pacientes. Até esse momento, a hipótese de surtos de gastroenterites serem de etiologia não-bacteriana era questionado (GREEN et al., 2000; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Na década de 1970, os NoV foram descobertos após experimentos de administração oral, a pessoas voluntárias, de filtrados de fezes obtidas de pessoas sintomáticas. Através de técnica de microscopia eletrônica, as amostras dos filtrados fecais foram inicialmente associadas a picornavirus ou parvovirus. Entretanto, a classificação como Calicivirus ocorreu somente na década de 1990, pois com o avanço da biologia molecular foi possível a visualização de uma única proteína estrutural no capsídeo, a clonagem e caracterização da sequência genômica. Outros vírus de estrutura semelhante foram identificados em diferentes localidades e também foram denominados com os nomes das cidades onde foram primeiramente associados a surtos de gastroenterites (GREEN et al., 2000; SANTOS; ROMANOS; WIGG 2008).

As características comuns dos Calicivirus são a presença de uma única proteína estrutural que constitui o capsídeo, a qual possui aparência de 32 depressões em forma de cálice na superfície do vírion, configurando simetria icosaédrica. O nome dessa família é derivada do termo latim calix, que significa copo ou cálice (GREEN et al., 2000) (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura do capsídeo do norovirus

Fonte: CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/norovirus/index.html>

Também conhecidos como vírus pequeno de estrutura arredondada (“*small rounded-structure viroses*”), os NoV possuem partículas de aproximadamente 26-37nm de diâmetro, sem envoltório lipídico e composto por uma molécula de RNA fita simples, linear, de polaridade positiva e poliadenilada, com aproximadamente 7,6kb (SANTOS; ROMANOS; WIGG 2008). O genoma viral do NoV é organizado em três ou quatro sequências de leitura aberta (ORF – *open reading frames*), sendo que cada ORF codifica proteínas específicas, estruturais ou não (Figura 1). A ORF da extremidade 5’ (ORF 1) codifica uma poliproteína não estrutural, que é clivada por uma protease viral. Um dos produtos dessa clivagem codifica a RNA polimerase dependente de RNA, enzima envolvida na transcrição e replicação viral, e outro segmento (VPg) está relacionado à infectividade viral. A ORF 2 codifica uma proteína estrutural do capsídeo (VP1). A ORF 3 é a região com sequência mais variável e codifica uma proteína estrutural menor, denominada VP2. Em algumas espécies de norovirus murino (MNV), a ORF 4 (não representada na Figura 4) produz uma proteína relacionada à virulência. Na extremidade 3’ é adicionada uma cauda poliadenilada que proporciona estabilidade à fita de RNA (KARST et al., 2014; MORILLO; TIMENETSKY, 2011)

Figura 4 - Organização genômica do norovirus

Legenda: ORF - *open reading frames*.

Fonte: Modificado de Karst et al. (2014)

As diferentes cepas de norovirus, humano ou animal, são geneticamente diversas. Os cinco genogrupos (GI-GV) se diferenciam pela sequência genômica que codifica a proteína do capsídeo VP1, a qual interage com o receptor celular do hospedeiro e determina o genótipo antigênico. Esses cinco grupos são compostos por diferentes genótipos ou “clusters”, sendo que novas sequências são identificadas e acrescentadas periodicamente ao sistema de classificação. A falta de consenso pode dificultar a padronização da nomenclatura e identificação do vírus relacionado aos surtos. Todos os genótipos do GI e GII são de vírus humanos, com exceção do GII.11 (porco), sendo que o genótipo GII.4 tem sido o mais frequentemente associado aos surtos. O GIV também é encontrado em humanos, o GIII em bovinos, GV em murinos ou camundongos (ZHENG et al., 2006; MORILLO; TIMENETSKY, 2011).

Relativamente estáveis em ácido e calor, tolerantes ao éter, os NoV podem permanecer no ambiente por períodos prolongados. Apresentam habilidade de suportar ampla faixa de temperatura (do congelamento até 60°C) e seus genomas podem não ser completamente destruídos, mesmo com aquecimento de 72°C por 45 a 60 minutos. Eles podem persistir em superfícies de aço-inox, fórmica e cerâmica, contaminadas experimentalmente, por mais de sete dias (WEBER et al., 2010).

Para avaliar a persistência dos NoV humanos em meios ácidos, Tung-Thompson e colaboradores (2015) realizaram experimento comparativo da persistência desses vírus em meio neutro (pH 7,4 - solução tampão fosfato-salino) e um simulador de fluido gástrico. Cepas de NoV GI.I e GII.4 foram preparadas em suspensão nos fluidos ou inoculadas em placas de aço inoxidável e mantidas em

condições ambientais. As alíquotas foram analisadas por 42 dias utilizando o método de RT-PCR. Nos ensaios de suspensão, os vírus persistiram por mais de 42 dias, havendo discreta redução na titulação em todas as amostras (GI.1=1,0-1,3 log₁₀ e GII.4=menor ou igual 1.0 log₁₀) e não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os dois meios. Nas placas, houve maior persistência no meio ácido nas primeiras 24 horas, também sem diferença estatística significativa entre os meios, seguida de estabilização no decorrer dos 42 dias. Os autores afirmaram que essas cepas de NoV são capazes de persistir tanto em meios neutros como ácidos, por exemplo, matéria orgânica proveniente de vômito.

Em relação às gastroenterites causadas por NoV, a maior incidência de transmissão ocorre nos meses de inverno e a principal via entre as pessoas é a fecal-oral. A infecção está intimamente relacionada à ingestão de água e alimentos contaminados, principalmente crustáceos que necessitam ser manipulados e não são submetidos ao cozimento, como em sanduíches e saladas (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Após o contato com o vírus e período de incubação entre 15-50 horas, pacientes apresentam náusea, dor abdominal, diarreia e/ou vômito explosivos, sem um pródromo definido. Estima-se que durante um episódio de vômito são eliminadas 30.000.000 de partículas virais em 30ml de matéria orgânica. Considera-se como dose infectante entre 10 e 100 partículas. A contaminação do ambiente pela dispersão das partículas favorece a via de transmissão mão-boca. Apesar de não estar documentada a replicação dos NoV nas células da mucosa respiratória, aerossóis gerados durante os vômitos em jato podem ser inalados e deglutidos (CAUL, 1994).

Mialgia, dor de cabeça e febre também são sintomas reportados menos frequentemente. Os sintomas duram de 24 a 48 horas, porém a eliminação do vírus pode continuar por mais de duas semanas após a fase assintomática da doença, além de casos reportados como infecção assintomática. O vírus é replicado no citoplasma dos enterócitos, ocasionando anormalidades histológicas e enzimáticas transitórias (MORILLO; TIMENETSKY, 2011; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O diagnóstico clínico é realizado a partir de informações epidemiológicas, e após descartar outros agentes etiológicos de gastroenterites. Contudo, para o diagnóstico específico de norovirose, são requisitados testes laboratoriais. Os métodos de imunomicroscopia eletrônica e imunoenzimáticos apresentam

limitações. O método RT-PCR tem-se demonstrado de alta sensibilidade (MORILLO; TIMENETSKY, 2011).

O NoV é classificado pela Comissão de Biossegurança em Saúde como classe de risco 2. A classificação está baseada na severidade dos danos causados pelos agentes biológicos. A classe de risco 2 significa que o risco individual é moderado, considerando os possíveis efeitos para indivíduos saudáveis. Além disso, representa risco limitado de disseminação na comunidade e ambiente, pressupondo a existência de medidas terapêuticas e profiláticas eficazes. De acordo com essa classificação, o NoV não é considerado como de capacidade de transmissão respiratória e causador de patologia potencialmente letal, características da classe de risco 3 (BRASIL, 2011).

2.4. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE NOROVIRUS

A deficiência de sistemas celulares efetivos para o cultivo e replicação dos NoV em laboratório dificulta o entendimento sobre a biossíntese viral, prejudicando o avanço de vacinas e drogas antivirais. Informações sobre a patogênese são descritas a partir de estudos realizados em voluntários. Novas técnicas têm sido testadas, porém ainda sem sucesso desejado (TAKANASHI et al., 2014; DUIZER et al., 2004). Recentemente, obteve-se sucesso no cultivo e replicação *in vitro* de diferentes genótipos humanos de NoV. Foram utilizadas cultura de células com enterócitos não transformados, a partir de células-tronco, acrescidas de bile como adjuvante da replicação de NoV (ETTAYEBI et al., 2016).

Inicialmente os NoV eram detectados em amostras clínicas por meio de microscopia eletrônica ou ensaios imunoenzimáticos, os quais possuem sensibilidade baixa e requerem altas titulações do NoV para apresentar resultados positivos (KAGEYAMA et al., 2003; TRUJILLO et al., 2006). A reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) possibilita a análise de quantidades iniciais mínimas dos ácidos nucleicos do genoma alvo, por meio da amplificação de até um milhão de vezes de uma sequência-alvo (HEID et al., 1996; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010). A amplificação inicia-se a partir de um segmento específico do DNA, ou seja, a sequência-alvo. A DNA polimerase sintetiza uma sequência complementar a partir da ligação de um pequeno par de fragmentos de

nucleotídeos específicos (*primers* ou iniciadores – *Forward* e *Reverse*) à sequência-alvo. Uma das variações da PCR é a transcrição reversa (RT-PCR), que inicialmente usa a enzima transcriptase reversa para converter RNA em DNA complementar (cDNA), permitindo a amplificação (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

Na PCR convencional, a detecção e quantificação das sequências amplificadas são realizadas após o último ciclo de amplificação. Em seguida, realiza-se a separação dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose e analisa-se as imagens para visualização das bandas de DNA, que se tornam coradas após exposição à luz ultravioleta. A PCR convencional resulta em dado qualitativo e possibilita o sequenciamento do genoma para a identificação da espécie ou genótipo do microrganismo ou vírus (LIFE TECHNOLOGIES, 2014; KAGEYAMA et al., 2003). Possíveis limitações dessa técnica são a análise subjetiva das imagens, bem como possíveis contaminações cruzadas após a amplificação (HEID et. al., 1996).

A RT-qPCR ou RT-PCR em tempo real (*Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative*, traduzida como Transcrição Reversa-Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo) permite mensurar, em quantidades logarítmicas, a quantidade de sequências-alvo amplificadas a cada ciclo de forma exponencial, até chegar à fase de platô (LIFE TECHNOLOGIES, 2014). A transcrição reversa, bem como a amplificação em cadeia ocorrem consecutivamente no mesmo tubo (ISO, 2013). Além dos *primers*, são acrescentados à reação marcadores que emitem sinal fluorescente detectado pelo equipamento de RT-qPCR durante a amplificação (LIFE TECHNOLOGIES, 2014; ISO, 2013).

A qPCR, em geral, é dividida em três fases, descritas abaixo, e as reações se repetem em 40 ou 45 ciclos. E na RT-qPCR, a transcriptase reversa age previamente à desnaturação (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

- 1) Desnaturação: a uma alta temperatura de incubação (94 – 98°C), a fita dupla do DNA se separa através da quebra das pontes de Hidrogênio, transformando-se em duas fitas simples;
- 2) Anelamento: as sequências de ácido nucleico complementares, a uma faixa de temperatura entre 50 – 60°C) ou *primers* se ligam à sequência alvo das duas fitas moldes de DNA (o *Forward* na fita de sentido 5'-3'e o *Reverse*, 3'-5');

- 3) Extensão: a uma temperatura ótima para a ação da DNA polimerase, geralmente entre 70 – 75°C, a extensão dos *primers* ocorre em até 100 bases por segundo, ou seja, os dextrorribonucleotídeos fosfatados (dNTP – compostos pelas bases Adenina, Timina, Citosina ou Guanina, dexossiribose e três grupos fosfatos) são acrescentados às novas cadeias formadas durante a amplificação (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

Há dois métodos para a RT-qPCR atualmente disponíveis. O Sybr®Green e o TaqMan®. O Sybr®Green é um método não-específico, pois a molécula com o fluoróforo liga-se à fita dupla do DNA, emitindo o sinal de fluorescência à medida que a amplificação aumenta. A limitação é que essa molécula pode se ligar à sequência-alvo ou a produtos inespecíficos, produzindo resultados falso-negativos (LIFE TECHNOLOGIES, 2014; NUNES, 2013).

O método TaqMan® utiliza uma sonda (ou *probe*) hidrolisada que consiste em uma sequência linear curta de DNA com o marcador fluorescente *reporter* (extremidade 5') e *quencher* (extremidade 3'), adicionados nas extremidades opostas da sequência de nucleotídeos. A sonda é desenhada também para se ligar a uma sequência específica do DNA alvo. Enquanto a sonda permanece intacta, a fluorescência do *reporter* é absorvida pelo *quencher*. No entanto, conforme os produtos da amplificação aumentam, a enzima TaqDNA polimerase exerce atividade de exonuclease, durante a fase de extensão e quebra a sonda. Consequentemente, o sinal fluorescente do *reporter* é emitido e aumenta proporcionalmente, sendo detectado pelo equipamento de RT-qPCR (ISO, 2013; LIFE TECHNOLOGIES, 2014; NUNES, 2013; HEID, 1996) (Figura 4).

Figura 5 - Demonstração de um ensaio de RT-PCR em tempo real pelo método TaqMan®

Fonte: ThermoFisher, 2017. Disponível em: <https://www.thermoFisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/how-taqman-assays-work.html>

Os resultados da RT-qPCR são expressos devido à conexão do equipamento que detecta os sinais de fluorescência a um *software* específico. Gráficos com curvas de amplificação para cada reação são gerados, sendo o ponto inicial uma linha basal (*baseline*), a qual representa poucas mudanças nos sinais de fluorescência. À medida que os ciclos de amplificação sucedem, o nível de fluorescência aumenta, iniciando a fase exponencial do gráfico (nas condições ideais, o número de moléculas dobra a cada ciclo), até atingir a fase de platô que representa a normalização da reação (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

O *threshold* é o limiar acima da linha basal (*baseline*), na fase exponencial, estabelecido pelo *software* (podendo também ser ajustado manualmente). Analisando todas as reações do ensaio, ele é estabelecido para distinguir o sinal relevante de amplificação da linha basal. O ponto de intersecção entre a curva de amplificação e o *threshold*, denominado Ct (*Cycle threshold* ou Cq – ciclo de quantificação), representa o número do ciclo no qual a fluorescência cruza o limiar e é inversamente proporcional à quantidade inicial da sequência-alvo. Exemplificando, quando a quantidade de sequência-alvo diminui, o número do ciclo em que ocorre a

amplificação é mais alto, resultando em maior valor de Ct. O ΔR_n é obtido subtraindo o valor da linha basal da fluorescência emitido pelo *reporter* normalizado do valor da referência passiva (R_n) ($\Delta R_n = R_n - \text{Baseline}$) (Figura 6) (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

Os resultados são fornecidos pelo *software* como o número do Ct, quando há curva de amplificação na amostra. Quando não há curva de amplificação em determinada amostra, ou seja, nenhum sinal de fluorescência foi detectado, o *software* fornece o resultado como indeterminado.

Figura 6 - Modelo representativo de gráfico resultante de uma RT-PCR em tempo real.

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>

2.5. OCORRÊNCIA DE SURTOS POR NOROVIRUS

Inúmeros relatos de surtos causados por NoV são publicados na literatura científica, que ocorrem principalmente em hotéis (CHEESBROUGH et al., 2000), eventos com aglomerações de pessoas (POLKOWSKA et al., 2014), navios (DISKIN; CARO; DAHL, 2014; MORILLO et al., 2012; MORILLO et al., 2017), instituições de longa permanência para idosos (PETRIGNANI et al., 2015; MENEZES et al., 2010) e hospitais (NENONEN et al., 2014). Muitos estudos sobre vias de transmissão, permanência no ambiente e características do NoV se baseiam nesses relatos. Essa é uma limitação, indicando a necessidade de estudos prospectivos experimentais, a fim de aprimorar o conhecimento sobre a transmissão desse vírus através de superfícies e do ar (OTTER; YEZLI; FRENCH, 2011).

Recentemente, um relato de surto ocasionado por NoV-GII, ocorrido em um navio durante uma viagem no litoral brasileiro, foi publicado. As amostras fecais de doze pacientes e amostras de alimentos potencialmente contaminados foram coletadas. Identificou-se alta similaridade no sequenciamento genético entre as amostras clínicas positivas e o genótipo de NoV-GII encontrado no mousse de laranja (MORILLO et al., 2017). Não há descrição de amostras coletadas do ambiente durante esse surto.

Um surto de gastroenterite relacionada a NoV, em instituição de longa permanência para idosos no Brasil, também foi descrito. O número de pacientes com fezes coletadas para análise foi baixo, considerando o número de casos notificados (nove do total de 95 pessoas diagnosticadas clinicamente, sendo 62 residentes e 33 funcionários). Porém, NoV GII foi detectado em 44,4% das amostras e outros agentes etiológicos foram descartados. Os autores destacaram que a contaminação do ambiente pode ter contribuído na persistência do surto, devido a características específicas da população, como incontinência fecal, imobilidade e demência (MENEZES, et al., 2010).

Destaca-se também o relato de surto realizado por Cheesbrough e colaboradores (2000), ocorrido em um hotel na Inglaterra, entre os meses de janeiro a maio de 1996. O vírus foi identificado após a obtenção de amostras fecais de pacientes com sintomas típicos de norovirose. Após tentativas mal-sucedidas de conter o surto, entre elas evitar o contato entre hóspedes em áreas comuns por dias consecutivos, extinção de comidas cruas do cardápio e formação de uma equipe de limpeza que era acionada rapidamente após um episódio de contaminação, o hotel foi fechado por uma semana para procedimentos de limpeza. Anteriormente ao fechamento, foram coletadas amostras com *swab* de algodão do ambiente, como: carpete que havia sido contaminado com vômito e estava aparentemente limpo; carpete sem conhecimento de contaminação com vômito; superfícies de banheiros; superfícies horizontais que provavelmente haviam sido tocadas (mesas), outras provavelmente não tocadas (acessórios de iluminação); ainda, superfícies frequentemente tocadas (telefones) e outros objetos (almofadas, cortinas). A limpeza foi realizada com água morna e detergente nas superfícies; lavagem e aspirador de pó nos carpetes. Não foram usados desinfetantes para evitar danos aos materiais.

Nesse relato, mesmo após os procedimentos de limpeza e reabertura do hotel, foi notificado um novo surto. Os autores pressupuseram que a contaminação

ambiental pode ter contribuído para a reinfecção de hóspedes. Resultados positivos nas amostras de carpetes aparentemente limpos demonstraram que os procedimentos de limpeza habituais não eram suficientes para eliminar os vírus. Já as amostras positivas de superfícies provavelmente não tocadas sugerem a disseminação aérea dos NoV que podem persistir em superfícies que não são limpas habitualmente. Não foram coletadas amostras do ambiente após a limpeza e, após cinco meses, todas as amostras do ambiente foram negativas para NoV (CHEESBROUGH et al., 2000).

A hipótese dos NoV serem transmitidos por aerossóis está fundamentada em relatos de surtos quando pacientes infectados não tiveram contato direto com o caso índice (MARKS et al., 2000; MARKS et al., 2003, REPP; KEENE, 2012). Entre eles, destaca-se o surto ocorrido em um acampamento esportivo de adolescentes nos EUA. O veículo de transmissão investigado foi uma sacola reutilizável localizada em um banheiro, que foi utilizado por uma pessoa (supostamente o primeiro caso do surto) durante os episódios de vômito e diarreia. Posteriormente, a sacola foi utilizada para armazenar alimentos frescos que foram consumidos por outros acampantes, contribuindo para a disseminação do vírus. As amostras coletadas da sacola foram positivas para NoV-GII mesmo após duas semanas do início do surto (REPP; KEENE, 2012).

A importância da contaminação do ambiente durante os surtos também foi descrita por Nenonen e colaboradores (2014). Foram coletadas, durante cinco meses, amostras de fezes e vômitos dos pacientes internados, de superfícies (mesa de cabeceira, lavatório, ventiladores e poeira de armários) e do ar das enfermarias onde houve ou não notificação de surto. Das 101 amostras (superfícies e ar) das enfermarias com notificação de surto, 48 (47%) foram positivas para NoV GII. Duas amostras (7,1%) das 28 foram positivas para NoV (GII e GI) das enfermarias sem notificação de surto.

Quanto à contaminação do ar, ressalta-se que, das 10 amostras coletadas de quartos onde estavam internados pacientes sintomáticos e com diagnóstico laboratorial confirmado para norovirose, nove amostras foram positivas para NoV-GII. Em um quarto onde estavam pacientes assintomáticos, as amostras foram negativas. As análises das sequências genotípicas e filogenética identificaram predomínio de GII.4 nesses experimentos e alto grau de similaridade ou identidade

quando comparadas às sequências genômicas de pacientes e ambiente (NENONEN et al., 2014).

Durante surtos de gastroenterites ocorridos no Canadá, foram coletadas 48 amostras de ar em três locais nos serviços de saúde: dentro dos quartos de pacientes sintomáticos (a um metro de distância do paciente – n=26), corredores ou áreas comuns em frente aos quartos de pacientes sintomáticos (n=16) e nos postos de enfermagem (n=6), utilizando o coletador Coriolis®µ (Bertin Technologies, França). Cópias de RNA de NoV foram detectadas em 23 de 48 amostras de ar em todas as localizações, variando entre 1.35×10^1 e 2.35×10^3 genomas/m³. Adicionalmente, por meio de experimentos *in vitro* com um substituto do NoV (MNV), identificou-se que não há perda da infectividade das partículas virais com o processo de aerolização. Essas evidências corroboram com a hipótese de que aerossóis de NoV ao serem inalados, podem atingir a faringe e serem deglutidos, pondo em risco outros indivíduos próximos aos pacientes sintomáticos, bem como os profissionais da Saúde (BONIFAIT et al., 2015).

Tais descrições fundamentam o papel do ambiente na transmissão de NoV e a importância da limpeza e desinfecção seguras para o controle de surtos de NoV em instituições.

2.6. MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE NOROVIROSES

Além da importância das precauções padronizadas para controle de infecção, discute-se sobre medidas específicas para prevenção e controle das noroviroses nos SS. Podem ser destacadas (MACCANELL et al., 2011):

- evitar contato com vômito e fezes e identificar pacientes com sintomas sugestivos de noroviroses em precaução de contato. Durante surtos em SS, os pacientes devem permanecer isolados até 48 horas após o desaparecimento dos sintomas. Devem ser consideradas particularidades de prolongamento do isolamento para pacientes em situações especiais, como comorbidades, imunossupressões e crianças até dois anos;
- promover a adesão à higiene das mãos entre os PS, pacientes e visitantes, principalmente durante surtos. Utilizar água e detergente ou solução antisséptica de etanol (exemplo: 70%);

- durante surtos, considerar a pertinência do fechamento de enfermarias para novas admissões ou transferências. Pacientes medicados adequadamente e em recuperação podem receber alta;
- os profissionais que manuseiam alimentos e bebidas devem lavar as mãos antes do contato efetivo com os mesmos. Caso apresentem sintomas de gastroenterite, devem ser afastados de suas atividades até 48 horas após o desaparecimento dos sintomas ou pelo período necessário;
- facilitar as políticas para que o diagnóstico clínico e confirmação laboratorial sejam agilizados. Amostras de ambiente poderão ser coletadas caso seja indicada a investigação da fonte de contaminação;
- promover a adesão às precauções padrão e de contato, como o uso de aventais e luvas, ao adentrar em áreas de cuidados com os pacientes. O uso de máscara cirúrgica e óculos é necessário durante os procedimentos com os pacientes, principalmente nas áreas onde aqueles que estão vomitando;
- assegurar que as equipes de cuidados não transitem entre grupos de pacientes infectados e não-infectados. Durante surtos, limitar as atividades de profissionais não essenciais, estagiários e voluntários;
- restringir as visitas durante surtos;
- realizar atividades educacionais para PS, pacientes e visitantes;
- notificar casos e surtos, conforme as políticas públicas;
- durante os surtos, a rotina de limpeza e desinfecção deve ser modificada. As áreas de cuidado devem ser limpas e desinfetadas duas vezes por dia e as superfícies frequentemente tocadas, três. A escolha deve ser por desinfetante devidamente registrado e as orientações do fabricante devem ser seguidas. A extremidade distal do *mop* deve ser trocada quando uma nova solução do produto for preparada ou quando for utilizada para remover grandes volumes de vômito ou fezes. Evitar o uso de estofados, tapetes ou carpetes devido à dificuldade de limpeza. Considerar a possibilidade de descarte de item que não possa ser limpo e desinfetado adequadamente. Tecidos não devem ser agitados, a fim de evitar a dispersão de partículas virais.

Devido à impossibilidade de cultivo do NoV em meios de cultura, são utilizados vírus substitutos, mais frequentemente o Calicivirus felino (FCV) e o Calicivirus MNV, em alguns estudos para avaliação da eficácia dos desinfetantes. O

FCV pertence à mesma família que o NoV, contudo sua transmissão é através da via respiratória. Já o MNV é de transmissão fecal-oral e apresenta características genéticas mais semelhantes ao NoV. Porém, ambos têm demonstrado diferenças significativas relacionadas à suscetibilidade às condições do ambiente e aos virucidas (TUNG et al., 2013; CROMEANS et al., 2014).

Quando os experimentos compararam os comportamentos desses substitutos, comprovou-se que o FCV é mais suscetível aos extremos de pH, ou seja, foram observadas maiores reduções de infectividade em pH 2, 3 e 10. Considerando que o NoV é um vírus entérico, um substituto ideal deve ser capaz de sobreviver em meios ácidos (CANNON et al., 2006; CROMEANS et al., 2014).

Quanto à suscetibilidade aos desinfetantes, os estudos que compararam os substitutos com diferentes tipos de NoV identificaram que o MNV é mais sensível às soluções alcoólicas (etanol e isopropanol nas concentrações de 70% e 90%) (TUNG et al., 2013; CROMEANS et al., 2014). Quando testada a solução de hipoclorito 1000ppm (0,1%), no estudo de Cromeans e colaboradores (2014), identificou-se maior redução de infectividade e do número de cópias do genoma do FCV. No estudo de Tung e colaboradores (2013), os NoV foram mais tolerantes à solução de hipoclorito a 1000ppm (0,1%) quando comparados aos substitutos.

Para avaliar o impacto da matéria orgânica na eficácia dos desinfetantes, foram realizados experimentos adicionais no estudo de Tung e colaboradores (2013). As amostras de FCV e MNV foram adicionadas em fezes humanas 20% (negativas para NoV). Ambos os vírus apresentaram maior tolerância ao hipoclorito na presença de matéria orgânica e foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes entre os resultados dos dois testes (com e sem matéria orgânica).

No entanto, outros estudos foram conduzidos para avaliar a efetividade da descontaminação de superfícies com os genogrupos humanos do NoV. Tuladhar e colaboradores (2012) compararam a contaminação residual de patógenos após procedimentos de limpeza com água e detergente e desinfecção com solução clorada a 250ppm (0,025%) e 1000ppm (0,1%). Foram realizados ensaios com carreadores de aço inoxidável contaminados com suspensão de bactérias e vírus, entre eles o MNV, NoV-GI.4 e GI.4. As amostras foram coletadas após 20 minutos do tratamento. A redução da contaminação residual dos NoV foi significativamente maior nos carreadores processados com limpeza associada à desinfecção com solução clorada na concentração de 1000 ppm (0,1%). Os autores destacam que

esse tipo de processamento deve ser priorizado em superfícies consideradas críticas na via de transmissão de vírus, ou seja, aquelas que são frequentemente tocadas pelas mãos dos PS.

Em outro estudo, os autores realizaram experimentos com oito placas de melanina tocadas sequencialmente por dedos contaminados com amostras fecais positivas para NoV-GII. A primeira série de experimentos foi realizada em quadruplicata e foram observadas que 100% das quatro primeiras placas tocadas foram contaminadas com NoV; 75% das quintas e sextas foram contaminadas; 25% das sétimas placas; e não houve contaminação em nenhuma das últimas placas (BARKER; VIPOND; BLOOMFIELD, 2004).

Em seguida, as superfícies foram tratadas com cinco procedimentos distintos: 1. limpeza com água e detergente; 2. limpeza com água e detergente, enxágue do pano e utilização para re-limpeza; 3. apenas desinfecção com solução de hipoclorito na concentração de 5000 ppm por um minuto; 4. semelhante ao terceiro procedimento, mas com tempo de ação de cinco minutos; 5. remoção do resíduo de fezes com pano umedecido com solução de detergente por 10 segundos, seguida de desinfecção com a mesma solução por um minuto. A recuperação de NoV foi avaliada nas superfícies e nos dedos que manusearam os panos de limpeza através de RT-PCR. Em todas as superfícies tratadas com água e detergente foram recuperados NoV, e no teste onde houve enxágue do pano e re-limpeza, as amostras dos dedos que tocaram o pano também foram positivas. Não foram recuperadas partículas virais de NoV apenas após o tratamento que consistiu em limpeza seguida de desinfecção (BARKER; VIPOND; BLOOMFIELD, 2004). Esses resultados reforçam as diretrizes que indicam a limpeza anterior à aplicação do desinfetante e, quando superfícies são descontaminadas inapropriadamente, pode haver transferências para as mãos.

O hipoclorito de sódio é um agente oxidante, desinfetante frequentemente utilizado no SS, composto que libera cloro ativo, apresenta amplo espectro e ação rápida. No entanto, seu efeito é afetado pela luz solar, temperatura, meio ácido e inativado na presença de matéria orgânica; corrosivo para metais e pode provocar irritabilidade nos olhos e mucosas. A concentração recomendada para tratamento de superfícies é de 0,02 a 1% (MCDONNELL, 2007; BRASIL, 2010). Dados demonstraram que, em ensaios de suspensão por método de diluição seriada do hipoclorito de sódio (5, 75, 250, 500 e 1000 ppm), com tempo de ação de 30

segundos, nenhuma inativação significativa do NoV-GII.2 foi detectada em concentrações menores ou iguais a 1000ppm (0,1%) e para NoV-GII.4, só houve inativação significativa na maior concentração testada (TUNG et al., 2013).

Outro método de desinfecção indicado para superfícies utiliza a luz UV-C, que consiste em um tipo de radiação com comprimento de onda abaixo da faixa de espectro da luz visível aos olhos humanos. Sua propriedade germicida encontra-se na faixa entre 200 e 270nm, porém o comprimento de onda mais utilizado nos dispositivos de descontaminação é o 254nm. A luz UV-C quebra as ligações dos ácidos ribonucleicos (DNA ou RNA), destruindo o organismo. A luz UV-C é utilizada para descontaminação de ar, água, superfícies, entre outros; sua eficácia varia conforme a presença de matéria orgânica, patógeno, dose, distância da fonte de emissão de luz, tempo de exposição, emissão da radiação diretamente sobre o local de descontaminação, localização da lâmpada na sala e tipo de superfície (WEBER; KANAMORI; RUTALA, 2016).

O Surface UV® trata-se de um dispositivo de fácil manuseio e que permite a emissão da radiação diretamente sobre a superfície a ser tratada. Possui sistema de desligamento automático da lâmpada quando o equipamento não está na posição horizontal e a lâmpada está voltada para baixo. Emite luz UV-C com comprimento de onda 254 nm, a um centímetro de distância, representando 13 mW/cm² de irradiância. Ainda não há evidências científicas fortes sobre a eficácia da irradiação UV para eliminação de NoV e o CDC aponta a necessidade de publicação de pesquisas sobre o tema (MACCANELL et al., 2011).

2.7. LIMPEZA E DESINFECÇÃO DE PISO

Em todos os tipos de superfície, muitas são as variáveis no processo de limpeza e desinfecção que afetam a efetividade desses processos, como: falta de informação das etapas do processo; desvalorização da importância da limpeza; diluição incorreta do desinfetante; tempo de ação do desinfetante menor do que o recomendado, entre outros. Alguns métodos têm sido estudados como indicadores da qualidade da limpeza e desinfecção e demonstrado eficiência. O monitoramento

da bioluminescência do ATP¹ (adenosina trifosfato), que demonstra contaminação microbiana; e corante fluorescente, que quando exposto à luz negra demonstra as áreas que foram limpas inadequadamente, são alguns exemplos (WEBER; ANDERSON; RUTALA, 2013).

No estudo já mencionado, no qual foi utilizado um manequim para simular o vômito, destacou-se a importância da equipe responsável pela limpeza e desinfecção conhecer a área provável de contaminação. E ainda, não se limitar apenas às superfícies que contenham matéria orgânica visíveis a olho nu. Ressalta-se, mais uma vez, a valorização do papel desses profissionais (BOOTH, 2014).

Os executores responsáveis pela limpeza, via de regra, sem formação na área da Saúde, podem não assimilar o conhecimento teórico apropriado sobre aspectos microbiológicos, especialmente das vias de disseminação de microrganismos; epidemiologia das infecções. Consequentemente, não compreendem a importância da adesão rigorosa aos protocolos. Há necessidade de aproximação a esses profissionais não só do serviço de controle de infecção hospitalar (SCIH), mas também de todos os gestores das unidades assistenciais, a fim de que recebam treinamentos e capacitações adequadas, complementadas com supervisão na execução. Com isso, haverá maior valorização dos seus trabalhos e maior controle de IRAS relacionadas ao ambiente (BRASIL, 2010). Além disso, muitas vezes são requisitados para realizarem seus procedimentos em curto períodos de tempo visando a reocupação rápida dos leitos ou enfermarias de internação

No cenário brasileiro, há uma forte tendência para a terceirização dos serviços secundários dentro dos SS, também denominadas atividades-meio, e o serviço de higiene e limpeza está incluído nesses serviços. O enfermeiro, em diversos contextos, ocupa o cargo de coordenador dessa equipe, seja em empresas que realizam a prestação de serviços ou quando a divisão de higiene e limpeza está

¹ ATP: adenosine triphosphate, traduzido como adenosina trifosfato, é a molécula responsável pelo armazenamento da energia proveniente da respiração celular e é utilizada, de forma simples e prática, para monitoramento de limpeza de superfícies através da bioluminescência. Um swab específico, após a amostragem da área, é posicionado em um meio que contém a enzima luciferase. Essa enzima transforma a energia química da conversão do ATP em adenosina monofosfato (AMP) em luz visível, a qual é quantificada em Unidades Relativas de Luz (URL). A presença de ATP em uma superfície é sinal de presença de matéria orgânica e contaminação microbiana (NANTE et al., 2017).

diretamente sob gestão do SS. Portanto, o enfermeiro deve ser capacitado tanto para implementar as melhores práticas fundamentadas em evidências científicas como para gerir sua equipe de trabalho. No entanto, sabe-se que muitas vezes o cargo de gestão dos serviços de higiene e limpeza não é ocupado por enfermeiros ou outros profissionais da saúde, implicando em dificuldades de compreensão e implementação das evidências científicas.

A remoção física das sujidades, principalmente na presença de fluidos orgânicos, é crucial no controle e prevenção na transmissão de infecções. A presença de matéria orgânica diminui o potencial de ação dos desinfetantes (CHITNIS et al., 2004).

Associado ao fato da desvalorização da limpeza mecânica do ambiente e dos problemas já descritos anteriormente sobre o uso indiscriminado dos desinfetantes, estão descritos alguns mecanismos para seleção de vírus resistentes aos desinfetantes. A formação de agregados de partículas virais protege os vírus localizados no centro desse agrupamento. Os vírus podem se adaptar às novas condições ambientais (pH e pressão); adquirir novas conformações ou terem seus capsídeos modificados; e podem se tornar estáveis, por exemplo, nos casos de repetidas exposições a concentrações inadequadas do desinfetante. Ou ainda, há hipótese que detritos de proteínas do capsídeo ou ácidos nucleicos de partículas virais previamente inativadas por desinfetantes se reagrupem, podendo haver uma reativação da infectividade do vírus (MAILLARD; SATTAR; PINTO, 2013).

Essas informações, adicionadas à rápida recontaminação do piso nos serviços de saúde, sugerem que a indicação de uso de desinfetantes nesse tipo de superfície deve ser criteriosa. Em um estudo clássico sobre contaminação do piso, Ayliffe, Collins e Lowbury (1966), após avaliarem a eficácia de dez tipos de desinfetantes por testes laboratoriais, conduziram um experimento em uma enfermaria com 28 leitos. Após limpeza ou aplicação do desinfetante no piso, segundo a rotina da instituição, foram coletadas amostras de *swabs* uma e nove horas após o procedimento. Os resultados mostraram que a contagem de *Staphylococcus aureus* aumentou significativamente desde a primeira hora, comprovando a rápida recontaminação do piso. No entanto, após repetirem o experimento, depositando uma caixa sobre o piso e, conseqüentemente, evitando o acesso à área e a deposição de partículas do ar, a contagem dos microrganismos manteve-se baixa apenas na área coberta pela caixa. A redução da contaminação

foi de 89,7% no piso tratado com água e detergente e 93,7 a 99% tratados com os desinfetantes (AYLIFFE; COLLINS; LOWBURY, 1966).

Nas diretrizes para controle de surtos em SS do CDC, citadas anteriormente, os autores relataram a necessidade da remoção imediata de sujidades visíveis provenientes de vômito ou fezes (MACCANNEL et al., 2011). No entanto, não foi mencionado como deve ser realizada a limpeza e desinfecção do piso. No Manual de Limpeza e Desinfecção de Superfícies da ANVISA (BRASIL, 2010), há descrição dos procedimentos para limpeza e desinfecção do piso com matéria orgânica de forma geral. São eles:

- primeiramente, remover a matéria orgânica com papel absorvente ou pano (se pequena quantidade) ou com pá (se grande quantidade);
- realizar a varredura úmida, para remoção do pó ou excesso de água, utilizando rodo com pano úmido ou *mop*. Recolher as partículas maiores com a pá;
- realizar a fricção com sabão ou detergente, mergulhando o pano úmido ou *mop* contendo a solução. Ensaboar e trocar a água do balde quantas vezes forem necessárias;
- caso seja feita com o *mop*, indica-se que a fricção para ensaboar seja feita em movimento de “oito deitado”, com movimentos firmes e contínuos;
- enxaguar o piso com pano e água limpos;
- secar cuidadosamente;
- aplicar o desinfetante, conforme orientação do fabricante para diluição e tempo necessário para ação do produto.

Na RDC nº50 de 21 de fevereiro de 2002, preconiza-se que os materiais que revestem o piso de áreas críticas e semicríticas dos SS sejam resistentes à lavagem e uso de desinfetantes. O acabamento deve permitir que as superfícies sejam monolíticas, acabamento arredondado dos cantos, com o menor número de ranhuras ou frestas, índice de absorção de água não superior a 4%, inclusive quando houver rejunte das peças (BRASIL, 2002).

Para superfícies fixas como o piso, a legislação que trata sobre os produtos de ação antimicrobiana aplicados nessas áreas é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 14 de 28 de fevereiro de 2007 (BRASIL, 2007). Nesse documento estão contidas as especificações e exigências dos produtos designados

para uso no SS. Já a Resolução nº 40 de 05 de junho de 2008 aborda sobre os diferentes produtos utilizados para limpeza e afins (BRASIL, 2008).

A necessidade de limpeza do piso, utilizando técnica e produtos adequados, está bem fundamentada de acordo com as evidências apresentadas até o momento. Contudo, as lacunas no conhecimento científico justificam as discordâncias entre especialistas e profissionais envolvidos nas práticas de controle de infecção sobre necessidade de desinfecção do piso.

2.8. CONTAMINAÇÃO DO AR APÓS PROCEDIMENTOS DE LIMPEZA

As contaminações do ar nos diferentes ambientes dos SS, assim como em ambientes fechados extra-hospitalares, por diferentes agentes e em diferentes níveis, estão bem claras (CARDUCCI et al., 2011). Cabo-Verde e colaboradores (2015) realizaram estudo prospectivo com o objetivo de caracterizar os níveis de contaminação do ar em diferentes áreas do hospital (sala de emergência, enfermaria cirúrgica e seis salas cirúrgicas com pressão negativa do ar) e em diferentes estações do ano (verão e inverno). Nas salas cirúrgicas, identificou-se que as médias dos números de colônias bacterianas detectadas estavam abaixo das recomendações de segurança do país (Portugal). Após finalizados os procedimentos cirúrgicos, foi detectado aumento das colônias bacterianas, porém o nível de contaminação retornou aos valores iniciais (amostras coletadas com a sala vazia) depois da limpeza da sala. Não há descrições de como o procedimento de limpeza foi realizado.

Quando comparados os métodos de limpeza de piso, a utilização do *mop* molhado ou úmido demonstrou ser mais efetiva comparada à limpeza a seco ou varredura com *spray*. As avaliações foram realizadas utilizando a técnica de ATP e cultivo dos microrganismos em placas de contato com meio de cultura não seletivo, sendo identificadas diferenças estatísticas significantes entre os métodos. Nesse mesmo estudo, foram coletadas amostras de ar antes e após a limpeza para análise microbiológica. Houve aumento na contaminação do ar pelos três microrganismos testados (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*) após todos os tipos de limpeza, sem diferença significativa entre eles. No entanto, os autores não

descreveram os números de unidades formadoras de colônias encontrados para cada microrganismo, nem após cada tipo de limpeza (ANDERSEN et al., 2009).

Não foram encontrados estudos que abordassem os métodos de limpeza e desinfecção do piso e residual de partículas virais de NoV ou contaminação do ar após esses tratamentos. Há consenso e embasamento científico sobre a necessidade de desinfecção das superfícies tocadas pelos PS visando a redução de NoV no ambiente. Da mesma forma que ocorre em relação à necessidade de desinfecção do piso, identificou-se lacunas de evidências científicas fortes acerca da subsequente contaminação do ar e dispersão de partículas de NoV após limpeza e desinfecção. Nesse contexto, decidiu-se avaliar, por meio de um estudo laboratorial, a presença residual de NoV no ambiente durante e após limpeza e desinfecção do piso.

3. Objetivo

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença residual de partículas de NoV no ar e no piso quando implementados diferentes protocolos de descontaminação do piso, após contaminação intencional.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Comparar a contaminação residual por partículas de NoV após limpeza sistematizada e após limpeza seguida de desinfecção da superfície.
- 2) Comparar a eficácia da desinfecção do hipoclorito de sódio 1% com a luz UV aplicados no piso.
- 3) Avaliar se há diferença na eficácia da descontaminação entre dois tipos de piso contaminados intencionalmente com partículas de NoV-GII: granito e vinil.
- 4) Avaliar a presença de partículas de NoV-GII no ar após realização dos protocolos de descontaminação de pisos quando intencionalmente contaminados com NoV-GII.

4. Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. NATUREZA DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental laboratorial constituído por três grupos experimentais e dois grupos controles (positivo e negativo).

4.2. LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Núcleo de Doenças Entéricas do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz (NDE-IAL), que é um laboratório de referência regional para as gastroenterites virais, dentro do programa de Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (VE-DTHA). O VE-DTHA é composto por quatro sistemas: Vigilância de Surtos de DTHA; Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas; Vigilância de Doenças de Notificação Compulsória relacionadas à DTHA e Vigilância Epidemiológica Ativa com Base em Laboratório (Vigilância Sentinela dos rotavirus em menores de 5 anos).

O NDE-IAL dispunha de toda infraestrutura e equipamentos necessários para a viabilização de todas as etapas desse estudo.

4.3. PRINCIPAIS MATERIAIS

- Placas de granito e vinil para simulação do piso dos SS;
- Fezes provenientes de amostras clínicas, positivas para NoV-GII, para contaminação intencional;
- Solução tampão salino-fosfato 10X (LGC Biotecnologia, Brasil);
- Detergente líquido neutro para limpeza manual do piso (Indaclear, Indalabor, Brasil);
- Hipoclorito de sódio 1% para desinfecção do piso (ProAction 1%, Grow, Brasil);

- Surface UV® para desinfecção com luz UV-C (MMOptics, Brasil);
- Swabs de algodão esterilizado e de nylon flocado (*FloqSwabs*®, Copan, Itália);
- Kit para extração de RNA viral – QIAmp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha);
- Kit para detecção de NoV-GII através de RT-qPCR *Kit Superscript®III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System with ROXtm* Reference Dye (Invitrogen – Life Technologies, USA);
- Kit para controle de extração (Mengovirus Extraction Control Kit, CeeramTools® - Biomerieux, França);
- Kit para quantificação absoluta das amostras (Norovirus GII Q Standard, CeeramTools® - Biomerieux, França).

4.4. VALIDAÇÕES METODOLÓGICAS

No intuito de responder as questões norteadoras desse estudo, viu-se a necessidade de realizar validações dos procedimentos metodológicos adotados. A primeira etapa consistiu na validação das técnicas de limpeza e desinfecção de superfície, além da técnica de amostragem de superfícies e identificação do tempo de irradiação da luz UV-C. Posteriormente, realizou-se a validação do agente neutralizante do hipoclorito de sódio 1%. E, finalmente a etapa de validação do procedimento para coleta das amostras do ar. Finalizadas essas etapas, descritas a seguir, procedeu-se à coleta de dados.

Durante todas as etapas de validações metodológicas e coleta de dados, os pesquisadores responsáveis utilizaram gorro, máscara N95, avental de mangas longas, luvas de procedimento e propés.

4.4.1. Validação dos protocolos de limpeza e desinfecção

A realização dessa etapa justifica-se tanto para avaliação da exequibilidade dos procedimentos de limpeza e desinfecção aplicados em superfícies, bem como da técnica de amostragem por *swab* de algodão esterilizado.

Em uma cabine de segurança biológica (VLFS-12, Veco, Brasil), três placas de granito (30x40cm) esterilizado foram utilizadas para simulação da contaminação. A solução contaminante utilizada constituiu-se de 250ml de solução tampão salino-fosfato (pH 7,2, composta por cloreto de sódio - NaCl, cloreto de potássio - KCl, fosfato dissódico anidro - Na₂HPO₄, fosfato monopotássico - KH₂PO₄) acrescida de fezes de amostras clínicas humanas positivas para NoV-GII 10%. As amostras clínicas fazem parte do Acervo do NDE-IAL e da coleção de vírus do IAL, conforme Portaria DG/IAL – 25, de 07 de outubro de 2014, a qual trata sobre as Diretrizes Políticas do Instituto Adolfo Lutz para Estabelecimento das Coleções de Culturas Biológicas. A escolha pela utilização do genogrupo GII justifica-se por ser ele frequentemente associado a surtos em humanos. Tanto para as etapas de validação quanto para a coleta de dados, não houve a identificação dos genótipos das amostras clínicas.

As definições do tamanho da placa bem como do volume da solução contaminante basearam-se no estudo de Booth (2014), realizado com um manequim que simula um episódio de vômito. As placas de granito possuíam bordas elevadas impossibilitando o derramamento da solução contaminante para fora da área de estudo.

Em momentos distintos e individualmente, a solução contaminante foi inoculada sobre cada placa. Após cinco minutos, as mesmas foram submetidas a diferentes protocolos de descontaminação:

- Protocolo A – remoção do excesso de matéria orgânica com papel absorvente, seguida de limpeza com água e detergente neutro (movimentos firmes e unidirecionais, com pano de viscose e poliéster (uso único) umedecido em 5mL de detergente e 50mL de água de torneira; enxágue com pano (também de viscose e poliéster) umedecido em água de torneira, repetindo o procedimento por três vezes e secagem com um novo pano), seguida de desinfecção com hipoclorito de sódio a 1% por um minuto de contato;
- Protocolo B - limpeza como no protocolo A seguida de desinfecção com equipamento manual de luz UV-C por um minuto (Surface UV®, MMOptics, Brasil);
- Protocolo C - limpeza apenas por meio de remoção com papel absorvente e

desinfecção com o Surface UV® como no protocolo B. Decidiu-se pela realização do protocolo C pois, ao implementar o Protocolo B, houve eliminação de partículas de NoV-GII após a limpeza, conforme demonstrado na Tabela 1, item 5.1.1.

A decisão por utilizar hipoclorito de sódio 1% neste foi baseada na recomendação da ANVISA (0,02% a 1% - ANVISA, 2010) e visando avaliar o comportamento do NoV-GII, no piso e no ar, frente às melhores condições de descontaminação. Quanto ao Surface UV®, foi estabelecida uma parceria com o Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo), que desenvolveu a tecnologia do equipamento e fez o empréstimo do mesmo para teste.

A placa foi dividida em três áreas iguais e uma amostra foi coletada de cada área. Utilizou-se *swab* de algodão esterilizado nos seguintes momentos: antes da contaminação (controle negativo); após a contaminação (controle positivo); após limpeza; após o método de desinfecção selecionado.

A técnica de amostragem da superfície foi baseada e adaptada de estudo prévio (HEDIN; HYNBACK; LORÉ, 2010), ocorrendo da seguinte forma:

1. Fricção do *swab* sobre toda a área delimitada, realizando rotação em torno do próprio eixo e em todos os sentidos da placa (diagonal, vertical e horizontal);
2. Manutenção da ponta do *swab* embebido em 1000µL de solução tampão salino-fosfato, em um microtubo do tipo eppendorf por 30 minutos. NoV-GI ou GII podem persistir em *swabs* mergulhados na solução tampão, a mesma utilizada nesse estudo, por até quatro dias em temperatura ambiente, sem ultrapassar o limite mínimo de detecção (RÖNNQVIST et al., 2013);
3. Agitação do tubo em agitador de tubos do tipo "vortex" durante 20 segundos para desprendimento das partículas;
4. Retirada da ponta do *swab* com auxílio de uma pinça, pressionando a ponta contra as paredes do microtubo a fim de retirar o excesso de líquido;
5. Centrifugação dos microtubos contendo o líquido por 30 minutos a 5000rpm (centrífuga refrigeradora Z382K, Hermle, Alemanha) para clarificação das amostras;
6. Congelamento das amostras a -70°C até o momento das análises.

4.4.2. Validação do tempo de ação da luz ultravioleta

Essa etapa de validação foi realizada com a finalidade de avaliar o tempo necessário, para eliminação de NoV-GII, de irradiação da luz UV-C sobre a placa. Repetiu-se o procedimento de contaminação da placa de granito e a implementação do protocolo de descontaminação B, descrito anteriormente, porém com aumento do tempo de ação do Surface UV® para três e cinco minutos.

Duas áreas diferentes de 30x20cm (uma para cada tempo de ação) da placa de granito foram delimitadas e o método de desinfecção foi implementado após a limpeza. O método e a sequência de amostragem de superfície ocorreram da mesma forma que a etapa anterior (controles negativo e positivo; controle da solução contaminante; após limpeza e após desinfecção), em triplicata. Porém, como se tratava de uma área menor comparada ao experimento anterior, três *swabs* diferentes foram friccionados consecutivamente por toda a área, sendo que cada *swab* foi posicionado individualmente em um microtubo diferente. Esse procedimento foi adotado com a finalidade de maximizar a captura de partículas virais distribuídas pela placa.

4.4.3. Validação do agente neutralizante

Essa etapa foi realizada com o objetivo de identificar a concentração adequada para neutralizar o efeito do hipoclorito de sódio 1%, ou seja, garantir que, se houvesse residual do desinfetante, ele seria inativado por ação química após a coleta de amostras da superfície. Dessa forma, ficaria assegurado o cumprimento do tempo de ação pré-estabelecido pelo fabricante e padronização tempo de desinfecção para todas as amostras. Suas etapas estão descritas no Apêndice A.

Para avaliação da eficácia do agente neutralizante, recomenda-se que o teste seja realizado com concentrações maiores e menores do agente químico, acrescido a uma solução com baixa concentração do inóculo e à solução desinfetante. Os resultados devem ser comparados a soluções preparadas na ausência do neutralizante e na ausência do desinfetante, substituindo-os por um diluente neutro, visando avaliar a eficácia e toxicidade do neutralizante químico, respectivamente. Os

resultados esperados são que haja recuperação da população estudada em todas as amostras, exceto na solução preparada sem o desinfetante (SUTTON, 1996).

O agente neutralizante para o hipoclorito de sódio é o tiossulfato de sódio (USP, 2016). Neste estudo, a concentração do agente neutralizante (1N) foi recomendada pelo fabricante do desinfetante selecionado. Para obter a concentração desejada, a solução foi preparada da seguinte forma: 24,8g dos cristais de tiossulfato de sódio + 100ml de água deionizada e purificada. Essa etapa foi dividida em duas fases:

- 1) Experimento 1 – Ensaio por diluição: Foram realizados três pontos de diluições em série de 10 da solução neutralizante, sendo diluídos 10ml da solução neutralizante concentrada e 90ml de água deionizada e purificada, obtendo as concentrações finais 1N; 0,1N e 0,01N. Em triplicata, as amostras foram constituídas basicamente por: solução desinfetante + solução neutralizante + solução contaminante (preparada da mesma forma já descrita anteriormente). As especificações das amostras estão descritas no Quadro 2:

Quadro 2 - Identificação das soluções das amostras obtidas para validação da concentração do agente neutralizante. São Paulo, 2017.

Identificação da amostra	Composição da solução
1N	390µL de Tiossulfato de sódio 1N + 500µL de hipoclorito de sódio + 1000µL de solução contaminante
0,1N	390µL de Tiossulfato de sódio 0,1N + 500µL de hipoclorito de sódio + 1000µL de solução contaminante
0,01N	390µL de Tiossulfato de sódio 0,01N + 500µL de hipoclorito de sódio + 1000µL de solução contaminante
ØN	390µL de solução tampão salino-fosfato + 500µL de hipoclorito de sódio + 1000µL de solução contaminante
ØD	390µL de Tiossulfato de sódio 1N + 500µL de solução tampão salino-fosfato + 1000µL de solução contaminante
CTL+	1000µL de solução contaminante

N: normal; ØN: Sem neutralizante; ØD: Sem desinfetante; CTL+: controle positivo

Fonte: própria autora

Todos os microtubos foram homogeneizados em agitador de tubos do tipo "vortex", por 10 segundos. Após homogeneização, foram retirados 400µL de cada

solução e avaliados por teste colorimétrico de concentração do hipoclorito de sódio 1%. O teste (Proaction Kit Test, Grow, Brasil) apresenta seis padrões de cores que indicam concentrações de 0,00%; 0,02%; 0,1%; 0,50%; 0,75% e, finalmente, 1%. A fita reagente foi mergulhada no volume mencionado e após um segundo, a concentração foi registrada.

- 2) Experimento 2 – Ensaio por contaminação da superfície: uma placa de granito de 30x40cm foi dividida em quatro retângulos (10x30cm). Da mesma forma já descrita anteriormente, essa placa foi contaminada intencionalmente com NoV-GII, seguida de remoção da matéria orgânica com papel absorvente e desinfecção com hipoclorito de sódio 1%. Imediatamente após a aplicação do desinfetante, foram coletadas amostras em duplicata de cada área, com *swab* de algodão (técnica também já descrita) e a ponta do *swab* emergida em 1000 μ L da solução tampão salino-fosfato e 390 μ L da solução neutralizante também nas concentrações 1N; 0,1N e 0,01N e $\emptyset$ N, respectivamente, totalizando oito amostras. Adicionalmente, foi realizada análise do controle positivo da solução contaminante.

4.4.4. Validação da coleta de ar

Realizou-se essa etapa a fim de assegurar que o coletador de ar selecionado seria capaz de capturar as partículas virais no ambiente, bem como validar a altura que deveria ser posicionado. Os procedimentos detalhados estão descritos no Apêndice B.

Para amostragem do ar, selecionou-se o equipamento Coriolis® μ (Bertin Technologies, França). Trata-se de um coletador de ar que recolhe as partículas de ar, em um elevado fluxo (até 300L/min) e concentra os aerossóis em meio líquido, disposto em um cone, permitindo a análise por RT-qPCR. Esse equipamento é relatado como eficaz mesmo em baixas concentrações de partículas (BERTIN TECHNOLOGIES, 2016; BONIFAIT et al., 2015), utilizando tecnologia patenteada, baseada em funcionamento do tipo ciclone. O ar é primeiramente aspirado para dentro de um cone (que deve ser previamente preenchido com 15ml de líquido apropriado para a amostra a ser analisada) com movimento giratório, formando um

turbilhonamento no líquido. As partículas são atraídas para a parede do frasco devido à força centrífuga e separadas do ar, sendo consequentemente concentradas no líquido (BERTIN TECHNOLOGIES, 2015 – Figura 7).

Figura 7 – Funcionamento do coletador de ar do tipo ciclone

Legenda: Linha vermelha = fluxo de ar para dentro do coletador; Linha azul = fluxo de ar para fora do coletador.

Fonte: VERREAULT; MOINEAU; DUCHAINE, 2008.

O equipamento foi projetado principalmente considerando a velocidade de sedimentação de alguns microrganismos, bem como para garantir a recuperação eficiente de partículas viáveis. O Coriolis® μ é capaz de coletar 1m³ de ar em menos de quatro minutos, partículas de 0,5 μ m e para partículas inferiores, a eficiência é de 50%; e, por utilizar o líquido, evita problemas como ressecamento do meio. Assim, possibilita maior amostragem em menos tempo e análises das amostras por diferentes métodos (BERTIN TECHNOLOGIES, 2015). A figura 8 demonstra o coletador de ar e seus componentes.

Figura 8 - Coletador de ar Coriolis® μ

Fonte: Bertin Technologies; própria autora

Visando garantir um ambiente controlado para amostragem de ar, livre de fatores que pudessem interferir na dispersão das partículas virais, foi construído um cilindro de policloreto de polivinila (PVC) (Figura 9). O cilindro foi vedado, limitando a dispersão e o movimento das partículas, com altura de 208cm e diâmetro de 30cm, possuía aberturas que podem ser mantidas abertas ou fechadas, utilizando parafusos rosqueáveis. As aberturas permitem que somente o bocal do coletador de ar fique dentro do cilindro. Elas são retangulares (7x13cm) e foram realizadas nas alturas de A=20cm; B=51cm, C=83cm, D=111cm, E=142cm e F=172cm a partir do piso. O cilindro foi posicionado sobre uma placa de granito (30x40cm), previamente limpa e esterilizada a vapor. Em sua extremidade inferior, havia uma abertura retangular (40x11,5cm), possibilitando o acesso à limpeza manual e desinfecção da superfície contaminada.

Figura 9 - Cilindro e posicionamento do coletar de ar

Fonte: própria do autor

Em uma sala fechada e sem janelas, a formação de aerossóis foi simulada a partir da aplicação da solução contaminante com NoV-GII (já descrita anteriormente). O derramamento ocorreu através da abertura "E", estimando a altura média entre o piso e a boca humana de um adulto (Figura 10). Sequencialmente, procedeu-se à coleta da amostra de ar através das aberturas B (mais próxima à superfície). Finalizadas as coletas dessa altura, foram realizadas uma nova contaminação e novas amostragens do ar através da abertura E (altura média

estimada das vias aéreas de indivíduos adultos). O Coriolis® μ foi programado para funcionar com seus parâmetros máximos de efetividade: taxa de fluxo de ar de 300L/min (máximo permitido pelo equipamento) e tempo de coleta de 10 minutos, perfazendo uma estimativa de coleta de volume de ar igual a 3m³. As coletas foram realizadas em triplicata. O volume de ar do cilindro é de 1,46m³ ($V=\pi \times r^2 \times h$); portanto, infere-se que, com esses parâmetros, todo o ar contido no cilindro foi capturado pelo coletador. Após cada coleta, as extremidades inferior e superior do cilindro eram abertas, para que houvesse renovação de ar no interior.

Figura 10 - Aplicação da solução contaminante sobre a superfície de granito, no interior do cilindro.

Fonte: própria do autor

Foram obtidas amostras do ar na seguinte sequência: antes do derramamento (controle negativo) e após o derramamento das alturas B e E em triplicata. Uma alíquota de 1000 μ L do líquido do cone do coletador de ar foi aspirada e armazenada em um microtubo do tipo *ependorf* para análise posterior. Também foi realizado o controle da solução contaminante (controle positivo).

4.5. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Após obtidos os resultados satisfatórios das etapas de validações metodológicas (apresentados no capítulo 5 desta tese), procedeu-se a coleta dos dados propriamente ditos para responder aos objetivos desta pesquisa. O delineamento desse experimento foi definido visando simular a contaminação, por matéria orgânica com NoV, do piso em um SS e a realização do protocolo de

descontaminação, que via de regra, é realizada pela equipe de higiene e limpeza. Os procedimentos dessa etapa estão descritos no Apêndice C.

4.5.1. Variáveis do estudo

- Variável dependente: recuperação de cópias de RNA do NoV-GII no piso e no ar.
- Variáveis independentes:
 - tipo de descontaminação do piso – somente limpeza ou limpeza seguida de desinfecção;
 - tipo de desinfecção do piso – hipoclorito de sódio 1% e luz UV-C;
 - tipo do piso – vinil e granito.

4.5.2. Hipóteses do estudo

De acordo com os objetivos específicos estabelecidos, definiu-se a hipótese nula (H_0) e hipótese alternativa (H_1) para cada um deles:

- 1) H_1 : A contaminação residual de NoV após a limpeza é diferente da contaminação residual após limpeza seguida de desinfecção.
 H_0 : A contaminação residual de NoV após a limpeza é igual à contaminação residual após limpeza, seguida de desinfecção.
- 2) H_1 : O hipoclorito de sódio 1% é mais eficaz na eliminação de NoV-GII do que o dispositivo de emissão de luz UV.
 H_0 : O hipoclorito de sódio 1% é igualmente eficaz na eliminação de NoV-GII quanto à luz UV.
- 3) H_1 : A presença residual de NoV-GII após a limpeza e desinfecção no piso de granito é diferente da presença residual após limpeza e desinfecção no piso de vinil.
 H_0 : A presença residual de NoV-GII após a limpeza e desinfecção no piso de granito não é diferente da presença residual após limpeza e desinfecção no piso de vinil.

4) **H₁**: A realização da limpeza úmida e desinfecção consecutiva de pisos, quando intencionalmente contaminados com NoV-GII, dispersa partículas virais no ar.

H₀: A realização da limpeza úmida e desinfecção consecutiva de pisos, quando intencionalmente contaminados com NoV-GII, não dispersa partículas virais no ar.

4.5.2. Grupos experimentais e controles

Esta pesquisa foi composta por cinco grupos de amostragem, sendo:

- Grupo controle negativo: amostras dos pisos e do ar coletadas previamente à contaminação intencional das placas.
- Grupo controle positivo: as amostras dos pisos e do ar coletadas após a contaminação intencional das placas.
- Grupo experimental 1 – Protocolo "L": amostras coletadas dos pisos e do ar após a limpeza das placas.
- Grupo experimental 2 – Protocolo "H": amostras coletadas dos pisos e do ar após limpeza seguida de desinfecção com Hipoclorito de Sódio 1% (padrão-ouro para eliminação de NoV, conforme demonstrado por Tuladhar e colaboradores (2012); Girard et al. (2010); Barker, Vipond e Bloomfield (2004).
- Grupo experimental 3 - Protocolo "U": amostras coletadas após limpeza seguida de desinfecção com dispositivo portátil de luz ultravioleta (*SURFACE-UV®*).

4.5.3. Procedimentos para coleta de dados

A coleta de dados ocorreu na mesma sala fechada e desativada do NDE-IAL, onde foram realizadas a etapa de validação metodológica da coleta do ar. A sala era sem janelas, com paredes e pisos laváveis, com as dimensões: altura = 2,88m, largura = 1,78m e comprimento = 2,23m, perfazendo 11,43m³ de volume. A porta permaneceu fechada durante os experimentos e após cada coleta de dados, a luz

UV-C instalada na sala foi ligada por, pelo menos, 30 minutos. A temperatura e umidade relativa do ar foram controladas utilizando um termohigrômetro digital (modelo 7664, Incoterm, Brasil).

Todas as etapas da coleta de dados foram realizadas por dois pesquisadores, sendo que um deles foi responsável pela implementação dos protocolos de descontaminação e amostragem da superfície. O outro realizou somente as coletas de ar. Apesar dos pesquisadores utilizarem luvas durante todo o procedimento e das mesmas serem trocadas quando havia suspeita ou comprovação de contaminação, decidiu-se dividir as atividades da coleta dessa forma para evitar contaminação cruzada entre as amostras.

Considerando-se que o intuito dos experimentos era simular contaminação e tratamento do piso de serviço de saúde, selecionou-se para essa etapa placas de granito e vinil de 60x80cm. Para a limpeza, utilizou-se *mop* de microfibras, pois havia a possibilidade de trocar o refil disposto com as fibras. Antecedendo os experimentos, devido à impossibilidade de esterilizar a vapor as placas, elas foram limpas e desinfetadas com hipoclorito 1% por 10 minutos (conforme orientações do fabricante), enxaguadas três vezes com água destilada e esterilizada, e, finalmente, secas com compressa esterilizada, para a remoção de qualquer residual do desinfetante.

As placas foram contaminadas com 500mL de solução tampão salino-fosfato acrescida de fezes (já descrito anteriormente). A solução contaminante era preparada imediatamente antes de cada etapa da coleta de dados e não houve mistura de amostras de diferentes pacientes na mesma solução. Nessas amostras já havia sido detectado NoV-GII pelo método de RT-qPCR. Procedeu-se ao derramamento da solução diretamente sobre as placas, ou seja, no mesmo nível do piso, com o intuito de controlar a formação de aerossóis decorrente do derramamento (o que poderia ter ocorrido caso esse procedimento tivesse sido realizado a partir de uma certa altura, semelhantemente à etapa de validação da coleta de ar – Item 4.7.4). As soluções preparadas foram analisadas, pelo método de RT-qPCR, juntamente com as amostras de cada etapa da coleta de dados e identificadas como controle positivo 2 (ou da solução contaminante).

Transcorridos 10 minutos do derramamento (intervalo de tempo arbitrado, considerando o tempo estimado entre a contaminação da superfície e a

descontaminação em um SS), as placas dos pisos foram submetidas aos protocolos de descontaminação dos grupos experimentais, da seguinte forma:

- Limpeza - Remoção do excesso de contaminante com papel absorvente, sendo desprezado após saturado; aplicação da solução de detergente neutro (10 mL de detergente e 100mL de água de torneira) sobre a placa, limpeza manual com o *mop* de microfibra (previamente, as fibras foram umedecidas em água de torneira), fricção em movimentos em oito e torções das fibras quando estavam saturadas (o *mop* possuía sistema de torção acoplado ao balde fornecido pelo fabricante), enxague por três vezes com aproximadamente 1000mL de água de torneira e absorção do residual de água também com o *mop* (Figura 11). Os refis do *mop* foram trocados a cada coleta de dados e desprezados em saco para descartes de resíduos com risco biológico. O cabo do *mop* bem como o balde com sistema de torção, foram lavados com água e detergente neutro e, posteriormente, desinfetados com hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos e, finalmente, enxaguados com água de torneira.

Figura 11 - Procedimento de limpeza do piso

A= contaminação; B= remoção da matéria orgânica com papel absorvente; C= limpeza manual; D=enxague.

Fonte: própria autora

- Protocolo "H": Após limpeza, desinfecção com hipoclorito de sódio 1%. Antes da desinfecção, a concentração do desinfetante foi avaliada utilizando ProAction Kit teste (Grow, Brasil), já descrito anteriormente. O desinfetante foi borrifado por toda a área da placa e um dos pesquisadores espalhou-o com

um pano limpo e de uso único (viscose e poliéster). O tempo de ação foi o determinado pelo fabricante (10 minutos) (Figura 12).

Figura 12 - Desinfecção com hipoclorito de sódio 1%

Fonte: própria autora

- Protocolo "U": Após a limpeza, realizada desinfecção com o dispositivo Surface UV® por cinco minutos, totalizando uma dose de 3900 mJ/cm^2 ($D = \text{Irradiância} \times \text{tempo em segundos}$). Como a área de emissão da luz do dispositivo é limitada, considerando o tamanho da placa e para garantir que o tempo de ação seria o mesmo, decidiu-se delimitar a área de aplicação e amostragem. Para tanto, utilizou-se um molde de 30x20cm que foi posicionado no centro da placa (Figura 13).

Figura 13 - Desinfecção com UV-C e amostragem da área delimitada

Fonte: própria autora

Como o volume utilizado para extração do RNA das amostras ($140 \mu\text{L}$) era ínfimo em relação ao volume disposto nos cones do coletador de ar (15 mL), utilizou-

se um dispositivo concentrador (Amicon® Ultra 15 30k, Merck Millipore, USA). O mesmo concentrador foi utilizado em outro estudo realizado para detecção de aerossóis com NoV (BONIFAIT et al., 2015). Após a coleta de ar, o volume do cone era transferido para esse dispositivo, centrifugado por 10 minutos a 5000rpm (IEC-B20A, Damon/IEC Division, USA). O volume resultante da filtração (aproximadamente 300µL) era aspirado com auxílio de pipeta manual e transferido para um microtubo do tipo *eppendorf* de 2,0mL (Figura 14).

Figura 14 - Utilização do concentrador de amostras de ar

Fonte: própria autora

As coletas de amostras do piso obedeceram à seguinte sequência: controle negativo (antes do derramamento da solução contaminante – uma amostra); controle positivo (após derramamento da solução contaminante – uma amostra); controle positivo da solução contaminante (1000µL – uma amostra); após limpeza (amostragem da superfície após limpeza e enxague – três amostras); após os dois métodos de desinfecção (três amostras de cada). Com a obtenção do auxílio financeiro para este estudo, foi possível adquirir *swabs* de nylon flocados. Esse tipo de *swab* foi reportado com melhores taxas de recuperação de células e sensibilidade do que os de algodão (GALVIN et al., 2014). A técnica de amostragem e conservação das amostras de superfície foram iguais às da etapa de validação (item 4.5.1 dessa tese). Nessa etapa, decidiu-se também não dividir as placas em três áreas, mas friccionar os *swabs* três vezes consecutivamente por toda a área.

Para a amostragem de ar, a coleta obedeceu a mesma sequência da amostragem de superfícies. Após a etapa de validação, estabeleceu-se duas alturas para amostragem: altura 1 = 50cm do piso; altura 2 = 150cm. As amostras dos

grupos controle negativo e positivo foram coletadas da altura 2 (uma amostra para cada série, altura = 150cm); após limpeza e desinfecção, uma amostra da altura 1 (L1 / D1) e duas amostras da altura 2 (L2 e L3 / D2 e D3). Além disso, para otimizar a captura das partículas virais, posicionou-se o coletador em lados diferentes da base da placa (pontas e laterais). Os mesmos parâmetros do coletador foram selecionados: 300L/min, durante 10 minutos.

Entre uma replicata e outra, as peças do coletador de ar e os cones foram lavados com água e detergente neutro. Em seguida, imergidos em solução de hipoclorito de sódio 1% por 30 minutos e enxaguados com água destilada. A única peça que foi autoclavada foi o cano de fluxo de ar.

O experimento ocorreu em triplicata para cada tipo de piso e para cada tipo de tratamento, totalizando 12 repetições. O tamanho amostral pode ser visualizado na figura 15. Antes de cada replicata, uma nova solução contaminante era preparada e utilizada logo após seu preparo. Todas as amostras foram conservadas a -70°C até o momento da extração.

Figura 15 – Fluxograma descritivo do delineamento do estudo

Fonte: própria autora

4.6. DETECÇÃO DE NOROVIRUS NAS AMOSTRAS

Tanto as amostras de superfície quanto as de ar, das etapas de validação e coleta de dados, foram analisadas para detecção de NoV por meio da técnica de RT-qPCR com o método TaqMan®. A análise se deu em duas fases: extração de RNA e a reação de amplificação propriamente dita.

4.6.1. Extração do RNA

Para realizar a reação de amplificação do RNA, é necessário extraí-lo das amostras selecionadas e reduzir o efeito dos possíveis inibidores da amplificação. O agente caotrópico, com sais de guanidina, é utilizado para romper o capsídeo viral sem danificar o RNA. Posteriormente, o RNA é absorvido pela membrana de sílica e purificado por meio de sucessivas etapas de lavagens e, finalmente, liberado da membrana de sílica por uma solução tampão (ISO, 2013).

Para a extração manual do RNA das amostras coletadas neste estudo utilizou-se o QIAmp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). O protocolo de extração foi baseado nas recomendações do fabricante (QIAGEN, 2014), além de ser o mesmo adotado e validado pelo NDE-IAL (IAL, 2005).

Em cabine de segurança biológica (modelo Bioseg 12 classe II-tipo A1, Veco, Brasil), 140µL da amostra foi adicionado ao tampão AVL (560µL) e ao carregador de RNA (*Carrier* – 5,6µL), o que possibilita a desnaturação e inativação das RNAses, garantindo que o RNA permaneça intacto, bem como o aumento da aderência do RNA à membrana de sílica. Após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, 560µL de álcool absoluto 99,9% foi adicionado em cada amostra. Procedeu-se à agitação por 15 segundos em agitador de tubos do tipo "vortex" (modelo 251, FANEM, Brasil) e o volume total da amostra foi transferido em duas etapas consecutivas para a coluna de sílica (2 x 630µL), fornecida pelo fabricante, sendo centrifugada posteriormente durante 6000 x g por um minuto (microcentrífuga Centrifuge, modelo 5424R, Eppendorf, Alemanha). Sequencialmente, foram adicionados 500µL dos tampões de lavagem AW1 e AW2 e dois novos ciclos de centrifugação realizados (6000 x g durante um minuto e 20000 x g durante três

minutos, respectivamente), visando a purificação do RNA. A cada centrifugação, os microtubos com o filtrado eram descartados e substituídos por novos. Finalmente, 60µL do tampão AVE (composto água livre de RNase + azida de sódio) foram adicionados na coluna posicionada no tubo final devidamente identificado, incubados por um minuto em temperatura ambiente (20-25°C) e centrifugados a 6000 x g durante um minuto, resultando no volume final com o concentrado de RNA. A etapa final consistiu de eluição de 40 unidades de RNase OUT® (inibidores de ribonucleases – Invitrogen, USA).

Os RNA extraídos foram armazenados a -70°C e descongelados apenas uma vez até a RT-qPCR em tempo real. Apenas os RNA extraídos das amostras reanalisadas, devido à discordância de resultados, e os das selecionadas para a quantificação foram descongelados pela segunda vez.

A *International Organization for Standardization* publicou um documento, a padronização ISO/TS 15216-2:2013, que trata sobre os métodos de detecção de NoV em alimentos e superfícies. Nesse documento há recomendação para realizar etapas de controle de eventuais perdas de RNA durante o processo de extração. Esse controle é realizado por meio da adição de um vírus de estrutura semelhante ao vírus alvo (ISO, 2013). Para detecção do NoV, indica-se o controle de extração com o Mengovírus, um murino vírus da família *Picornaviridae*, geneticamente modificado e não patogênico (ISO, 2013; LE GUYADER et al., 2009).

Na presente investigação, essa etapa foi realizada com quantidade representativa de amostras, totalizando 28. Para essa análise, ao invés de adicionar 140µL das amostras, foi adicionado 130µL e inoculado 10µL de uma cepa comercial de Mengovirus (Mengovirus Extraction Control Kit, CeeramTools® - Biomerieux, França). Adicionalmente à análise para detecção de NoV-GII, em poços separados, realizou-se a análise dessas amostras inoculadas com o Mengovírus. A detecção de Mengovírus nesses poços (valores de Ct inferiores a 40), com os *primers* e *probes* específicos, significavam que a extração havia sido bem sucedida. O valor de Ct da cepa comercial pura foi de 30,77 e em todas as 28 amostras inoculadas foi detectado Mengovírus, com valores de Ct variando entre 25,03 e 30,64.

4.6.2. Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa precedida de Transcrição Reversa (RT-qPCR)

O protocolo para RT-qPCR com o método TaqMan® adotado neste estudo foi validado pelo NDE-IAL e é o utilizado para detecção das amostras clínicas.

Kageyama e colaboradores (2003), após comparação das sequências do genoma viral de diversas cepas de NoV-GI e GII, identificaram que a região de junção das áreas ORF1 e ORF2 apresentava alta similaridade das sequências de nucleotídeos. Portanto, afirmaram que essa região era mais estável para selecionar os *primers* e *probes* para amplificação. Diante dessa evidência, designaram os *primers* COG2F e COG2R e a *probe* RING2-TP para RT-qPCR de NoV-GII, os quais foram utilizados no presente estudo. Ao comparar ensaios realizados com diferentes combinações de *primers* e *probes*, a combinação utilizada nesse estudo foi caracterizada como sensível e de boa acurácia para detectar baixas concentrações de NoV-GII (YOO et al, 2017). A sequência de nucleotídeos e suas localizações estão representadas no quadro abaixo (Quadro 3).

Quadro 3 - Descrição de *primers* e *probes* utilizados no RT-PCR em tempo real. São Paulo, 2017.

<i>Primer ou probe</i>	Sequência (5'-3')	Polaridade	Localização ¹
Primer COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	+	5003
Primer COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	-	5100
Probe RING2-TP	FAM ² -TGGGAGGGCGATCGCAATCT-BHQ ³	+	5048

1-A localização corresponde à posição das sequências de nucleotídeos na cepa usada como referência. 2- Marcador fluorescente (*reporter*) 6-carboxifluoresceína, ligado à parte final 5'. 3-capturador de fluorescência (*Blackhole Quencher-BHQ*) ligado à parte 3'.

Fonte: Quadro adaptado de Kageyama et al. (2003).

Utilizou-se o kit *Superscript®III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX^{4m}* Reference Dye (Invitrogen – Life Technologies, USA), sistema de fase única (*one-step*), pois a transcrição reversa e a síntese do DNA ocorrem no mesmo tubo, por combinação das enzimas *Superscript®III Reverse Transcriptase* (RT) e a *Platinum® Taq DNA Polymerase* em uma única solução. Além disso, o kit é composto pela solução *2x Reaction Mix* (contendo 0,4mM de cada dNTP e 6mM de sulfato de magnésio - MgSO₄ – atua como catalisador da DNA Polimerase) e o

corante *ROXtm* (25nM), fluoróforo que atua como referência passiva da reação e normaliza flutuações de fluorescência (a intensidade da fluorescência do *reporter* é dividida pela fluorescência do *ROXtm*) (INVITROGEN, 2015; LIFETECHNOLOGIES, 2014).

Em uma estação de trabalho, primeiramente a solução de cada amostra foi preparada da seguinte forma: 12,5µL da *2x Reaction Mix* + 4µL de água ultrapura para biologia molecular + 1µL de cada *primer* (400nM) + 0,5µL da *probe* (200nM) + 0,5µL da *Superscript®III Platinum®* + 0,5µL do *ROXtm*, totalizando 20µL. Esses volumes eram multiplicados pelo número de amostras de cada ensaio. Em uma placa de 96 poços de 0,1mL, compatível com o equipamento de RT-qPCR, 20µL dessa solução foi transferido para cada poço correspondente às amostras.

Em uma área de trabalho diferente da anterior, 5µL de cada amostra foram eluídos nos respectivos poços, resultando em 25µL o volume final da reação. Após o término da transferência de volume em todos os poços, a placa era selada e centrifugada. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, sendo que em cada ensaio foram incluídos controles positivos (amostra com RNA positivo para NoVGII previamente analisada), controles negativos (inoculação com água ultrapura para biologia molecular) e controles das áreas da reação (*no template control* – NTC, sem inoculação de RNA).

A placa então foi posicionada no equipamento de RT-qPCR StepOne Plus® (Applied Biosystems, Life Technologies, Singapore), com as seguintes condições de ciclagem: transcrição reversa a 50°C por 15 minutos; ativação da TaqDNA Polimerase a 95°C por dois minutos; 45 ciclos de 10 segundos a 95°C para desnaturação do DNA; e, anelamento e extensão a 60°C por um minuto.

Para a análise da reação, considerou-se o *threshold* automático definido pelo *software* e os valores de Ct foram registrados considerando também a análise da curva sigmoide da amplificação. Quando não foi gerada curva de amplificação, o *software* apresenta o resultado como indeterminado (*undetermined*), indicando ausência de sinal fluorescente detectado. Valores de Ct acima de 40 foram considerados também como negativos, por representarem baixa eficiência da amplificação (BUSTIN et al., 2009; RÖNQVIST et al., 2013), sendo inconclusiva a afirmação da existência de RNA na amostra. Quando os valores de Ct foram discordantes entre as duas reações da mesma replicata (por exemplo, uma reação

com valor inferior a 40 e a outra superior a 40 ou indeterminada), a amostra foi reanalisada. Se a discordância permanecesse mesmo depois da reanálise, a amostra era considerada como positiva. No total, 17 amostras foram reanalisadas.

4.6.3. Quantificação das amostras

Utilizou-se um padrão comercial (Norovirus GII Q Standard, CeeramTools® - Biomerieux, França), de concentração conhecida (2×10^6) para elaborar uma curva-padrão e quantificar padrões secundários do laboratório NDE. Esse experimento é definido como quantificação absoluta (LIFE TECHNOLOGIES, 2014). As amostras foram diluídas em série de 10 e incluídas no gráfico, onde é plotado no eixo "x" o número de cópias de RNA viral/ μ L em escala logarítmica e no eixo "y" o valor do Ct para cada ponto da concentração. Neste estudo, a curva-padrão, em duplicata, foi composta por sete pontos de diluição, com o primeiro ponto representando a concentração da amostra pura (não diluída).

O estabelecimento dessa curva padrão, além da quantificação absoluta, fornece informações sobre a performance da reação (exemplo: eficiência, baseado no *slope* – cálculo da inclinação da curva de amplificação; coeficiente de correlação – R^2 e *Y-intercept* – intercepção com o eixo y). A eficiência de reação igual a 100%, representada pelo valor do *slope* = -3,32, significa que a quantidade da sequência-alvo dobra a cada ciclo de amplificação. Considera-se a reação como de boa qualidade quando o valor do *slope* está entre 3,10 e 3,58%. O R^2 reflete a linearidade da curva-padrão e, geralmente, o valor máximo é 0,999. Já o *Y-intercept* corresponde ao limite teórico de detecção, ou seja, o valor de Ct referente ao menor número de cópias da sequência que resultam em uma amplificação estatisticamente significativa (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

Por conseguinte, foi possível quantificar as amostras obtidas na coleta de dados. Os valores de Ct das amostras, comparados aos valores de Ct dos pontos de diluição do padrão comercial, foram plotados na curva-padrão, permitindo a identificação da quantidade de cópias de RNA por amostra. O valor registrado no gráfico foi dividido por cinco, pois foram utilizados 5 μ L de cada amostra. Assim, os resultados da quantificação foram apresentados como cópias de RNA/ μ L. Foram selecionadas 27 amostras de interesse, com valores de Ct positivo, obtidos após a

primeira análise por RT-qPCR (resultados demonstrados nas seções 5.2.1 e 5.2.2), e acrescidas ao ensaio. As amostras selecionadas para quantificação estão descritas no quadro 4:

Quadro 4 - Quadro descritivo das amostras utilizadas para quantificação de cópias de RNA de norovirus. São Paulo, 2017.

Identificação das amostras	Número de amostras
Superfície: Controle positivo	Granito – n = 1 Vinil – n = 1
Superfície: Após a limpeza	Granito – n = 3 Vinil – n = 3
Superfície: Após desinfecção com luz UV por 3 min	Granito* – n = 3
Superfície: Após desinfecção com luz UV por 5min	Granito* – n = 3
Ar: após a limpeza (altura 1 – primeira amostra)	n = 3 (independentemente do piso)**
Ar: após a limpeza (altura 2 – primeira amostra)	n = 3 (independentemente do piso)**
Ar: após limpeza (altura 2 – segunda amostra)	n = 3 (independentemente do piso)**

n: número de amostras; UV : ultravioleta; min: minutos; altura 1: 50cm; altura 2: 150cm.

* Amostras obtidas durante etapa de validação do tempo de ação do método com UV-C

** Como na análise estatística não houve diferença significativa entre os tipos de piso das amostras de ar, na etapa de quantificação as amostras foram selecionadas independentemente do tipo de piso.

Fonte: própria autora

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram registrados em tabelas Microsoft Office Excel para análise estatística descritiva (média, mediana, mínima, máximo, desvio padrão e percentual). Após consulta a um profissional, a análise estatística inferencial foi realizada por meio do Modelo de Regressão Tobit. Esse modelo foi selecionado pois os valores da variável dependente foram censurados em 40. Além disso, esse modelo demonstra robustez no caso de amostras com distribuição que tendem à não normalidade. O nível de significância adotado foi de 0,05%. Os resultados das etapas de validação metodológica não foram incluídos no modelo de regressão.

4.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi aprovado junto ao Conselho Técnico Científico do IAL (CTC 01-I/2016).

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1. ETAPAS DE VALIDAÇÃO

5.1.1. Validação dos protocolos de limpeza e desinfecção

Os resultados dessa etapa de validação estão apresentados na tabela 1. Não houve detecção de NoV em todas as amostras do controle negativo, comprovando a eficácia da esterilização das placas e ausência de partículas virais previamente à contaminação intencional. Os controles negativos e da solução contaminante foram satisfatórios. As amostras do controle positivo apresentaram valores de Ct entre 25,39 a 30,15, demonstrando que a forma de preparo da solução contaminante e o seu derramamento sobre a superfície desafiaram os protocolos de descontaminação.

Tabela 1 - Valores de *Cycle Threshold* (Ct) das amostras coletadas durante a validação dos protocolos de descontaminação. São Paulo, 2017.

Protocolos	Amostras	CTL+	Limpeza	Desinfecção
Protocolo A	n = 9	27.58 / 27.41	38.68 / 38.24	IND/IND
		25.39 / 24.68	39.56 / 42.09	42.47 / IND
		26.28 / 25.89	38.28 / 38.47	IND/IND
Protocolo B	n = 9	28.66 / 27.81	40.89 / IND	IND/ IND
		26.86 / 26.62	IND/IND	IND/IND
		27.52 / 26.10	IND/IND	IND/IND
Protocolo C	n = 9	30.15 / 29.89	35.00 / 34.86	38.94 / 37.68
		29.64 / 29.72	36.05 / 36.33	37.51 / 38.38
		28.68 / 28.79	34.77 / 34.92	35.56 / 36.15

IND: Indeterminado; CTL+: Controle Positivo

No protocolo A, cuja desinfecção foi realizada com hipoclorito de sódio 1%, não houve recuperação de NoV após desinfecção. No entanto, durante a realização do protocolo B, as partículas de NoV foram eliminadas durante a limpeza, ficando impossibilitada a avaliação da eficácia de desinfecção pelo método de luz UV-C por

um minuto, justificadas pela ausência do desafio. Por isso, decidiu-se realizar o protocolo C, que consistiu na extinção da etapa de limpeza com água e detergente neutro. Após esse protocolo, constatou-se que, tanto após a limpeza como após a desinfecção com luz UC-C por um minuto, foram detectadas partículas virais. Esses dados, justificaram a realização da etapa de validação do tempo de ação da luz UV como variável independente.

A partir desses resultados, inferiu-se que a técnica de coleta de dados da superfície com *swab* foi satisfatória, pois houve recuperação de NoV-GII. Da mesma forma, verificou-se que a etapa de limpeza manual com água e detergente é essencial para diminuir a carga viral da superfície, potencializando a ação do desinfetante.

5.1.2. Validação do tempo de ação da luz ultravioleta

Semelhantemente à etapa anterior, os resultados dos controles negativos, positivos e da solução contaminante foram satisfatórios. Os resultados obtidos nessa etapa estão apresentados na tabela 2 e demonstraram que, mesmo com o aumento do tempo de irradiação da luz UV-C para três minutos, houve recuperação de NoV nas três amostras. Para as amostras de tempo de exposição de cinco minutos, uma amostra resultou em valores de Ct positivos; contudo, com valores limítrofes à faixa de negatividade previamente estabelecida (Ct maior que 40). Baseados nesses dados, justificou-se a decisão de avaliar o tempo de ação da luz UV-C durante cinco minutos na coleta de dados propriamente dita.

Tabela 2 - Valores de Cycle Threshold (Ct) das amostras obtidas durante validação do tempo de ação da luz ultravioleta. São Paulo, 2017

Identificação		Valores de Ct		Amostras
Controle positivo		22,65/22,52		n = 1
Limpeza	34,44/34,76	35,85/34,72	34,76/34,91	n = 3
Tratamento: UV 3'	36,31/38,56	36,95/35,99	37,59/37,57	n = 3
Tratamento: UV 5'	39,36/39,86	41,27/41,4	41,8/41,17	n = 3

* Controle positivo da solução contaminante; IND: indeterminado; UV: ultravioleta-C; ': minutos.

5.1.3. Validação do agente neutralizante

No primeiro experimento por diluição, visando avaliar a concentração ideal e não tóxica do tiossulfato de sódio para NoV e que neutralizasse a ação do hipoclorito de sódio 1%, confirmou-se a informação do fabricante de que a concentração de 1N era a indicada. No teste colorimétrico, a fita reagente ficou branca, indicando concentração do desinfetante de 0,00%, somente na concentração de 1N e nos microtubos onde não foi adicionado desinfetante ($\emptyset$ D), como pode ser visualizado na tabela 3 e figura 16.

Tabela 3 - Descrição dos resultados do teste colorimétrico para concentração do hipoclorito de sódio para validação por diluição do agente neutralizante. São Paulo, 2017.

Identificação da amostra	Concentração estimada
Hipoclorito de sódio 1%	1,00%
1N	0,00%
0,1N	0,10%
0,01N	0,50%
$\emptyset$ N	0,75%
$\emptyset$ D	0,00%

N: normal; $\emptyset$ N: Sem neutralizante; $\emptyset$ D: Sem desinfetante

Figura 16 - Resultados dos testes colorimétricos para validação da concentração do agente neutralizante. São Paulo, 2017.

Fonte: própria autora

Os resultados após RT-qPCR, no ensaio por diluição, confirmaram os encontrados no teste colorimétrico (Tabela 4). Os valores de Ct das amostras do controle positivo comprovam que havia partículas virais na solução contaminante (média = 25,35). Nos tubos onde foi adicionado tiosulfato de sódio 1N, foi detectado NoV em todas as amostras (média de Ct = 23,70), indicando que o desinfetante havia sido neutralizado. No entanto, nas concentrações de 0,1N e 0,01N, todos os resultados apresentaram valores de Ct negativos. Esse dado sugere que as diluições do tiosulfato de sódio em concentrações inferiores a 1N não neutralizaram o hipoclorito de sódio, o qual foi capaz de eliminar partículas de NoV presentes em 1000µL da solução contaminante.

Tabela 4 - Distribuição dos valores e médias de Cycle Threshold (Ct) das amostras obtidas para validação da concentração do neutralizante do hipoclorito de sódio 1%. São Paulo, 2017.

Identificação	Amostra	Valores de Ct			Média
CTL+	n = 3	25,35 / 25,07	25,45 / 25,54	25,35 / 25,35	25,35
1N	n = 3	23,97 / 24,1	23,52 / 23,45	23,58 / 23,6	23,70
0,1N	n = 3	41,24 / 40,59	IND / IND	IND / IND	IND
0,01N	n = 3	IND / IND	IND / IND	IND / IND	IND
ØN	n = 3	IND / IND	IND / IND	IND / IND	IND
ØD	n = 3	26,06 / 26,21	26,07 / 26,06	26,2 / 25,98	26,09

CTL+: controle positivo; N: normal; ØN: Sem neutralizante; ØD: Sem desinfetante; IND: indeterminado

Quando o desinfetante foi substituído por solução tampão salino-fosfato e foi adicionado apenas o neutralizante, houve detecção de NoV em todas as amostras (média = 26,09). Esse resultado comprova a ausência de toxicidade do tiosulfato de sódio em relação ao NoV GII. Nos microtubos onde o neutralizante foi substituído pela solução tampão, todas as amostras foram negativas, indicando que o hipoclorito de sódio 1% eliminou NoV da solução contaminante. Portanto, adotou-se a concentração de 1N para neutralização do hipoclorito de sódio 1% neste estudo.

No experimento 2, que consistiu em avaliar o efeito do agente neutralizante após a coleta de *swab* da superfície, foram realizadas as mesmas análises. No teste

colorimétrico todas as amostras resultaram em 0,00% de concentração de hipoclorito de sódio, representada pela cor branca da fita reagente. Além disso, após RT-qPCR, somente a amostra do controle positivo (solução contaminante) foi positiva. Nas amostras onde não foi adicionado o neutralizante ($\emptyset$ N), ou seja, amostragem da superfície imediatamente após a aplicação do hipoclorito de sódio 1%, não houve detecção de NoV-GII. A hipótese é que não havia residual de desinfetante nas pontas do *swab* e o desinfetante eliminou NoV-GII independentemente da limpeza. Ressalta-se que procedimentos de limpeza com água e detergente foram extintos nessa etapa de validação e a amostragem ocorreu logo após o hipoclorito de sódio 1% ter sido aplicado na superfície.

5.1.4. Validação da coleta de ar

As amostras de ar coletadas no ambiente controlado, proporcionado pelo cilindro, demonstraram que o coletador de ar selecionado para este estudo foi capaz de capturar partículas aéreas contendo NoV. Apesar das amostras das duas alturas (B = 51cm e E = 142cm) terem sido coletadas em triplicata, apenas a primeira coletada a partir da abertura E foi positiva. Os resultados da etapa de validação de coleta de ar, após reação de RT-qPCR, podem ser visualizados no quadro 5.

Quadro 5 - Valores dos *Cycle Threshold* das amostras obtidas durante validação da coleta de ar. São Paulo, 2017

Amostra	<i>Cycle Threshold</i>
Controle negativo	Indeterminado
Controle positivo*	23,59
Abertura B	Indeterminado
Abertura E	38,05

* Controle positivo da solução contaminante

Pode-se inferir que, após três coletas consecutivas do ar, considerando o volume de ar do cilindro, houve esgotamento dos aerossóis no seu interior. Ressalta-se que não foi utilizado concentrador de amostras nessa etapa, o que pode ter interferido nos resultados. Apesar de, durante a etapa de validação da coleta de ar não serem detectados NoV da altura mais próxima ao piso (abertura B=51 cm),

decidiu-se utilizar alturas semelhantes durante a etapa de coleta de dados (50 e 150 cm).

5.2. ETAPA DE COLETA DE DADOS

Houve aumento da temperatura e umidade relativa do ar na sala onde foi realizada a coleta de dados. A média da temperatura inicial foi de 22,7°C (Mínima – Mín.: 22,0°C; Máxima – Máx.: 23,37°C; Mediana – Med.: 22,57°C; desvio-padrão – DP: 0,3°C); uma hora após o início da coleta de dados foi de 23,2°C (Mín.: 22,7°C; Máx.: 23,6 °C; Med. 22,9 °C; DP: 0,3 °C); ao término de 23,1 °C (Mín.: 22,5 °C; Máx.: 28,8 °C; Med.: 23,0; DP: 1,7). Quanto à umidade relativa do ar, a média inicial foi de 59,5% (Mín.: 48%; Máx.: 74%; Med.: 65%; DP: 7,7%); uma hora após o início de 78% (Mín.: 69%; Máx.: 79%; Med.: 78%; DP: 3,2%); e, finalmente, ao término do experimento foi de 69% (Mín.: 60%; Máx.: 82%; Med.: 74,5%; DP: 7,4%). Não houve evidências de associação estatística entre as mensurações de temperatura e umidade e os tipos de descontaminação de piso avaliados.

Em todas as amostras dos controles negativos da superfície e do ar não foram detectadas partículas virais após RT-qPCR. Quanto aos controles positivos, a média dos valores de Ct das amostras de superfície foi de 23,6 (Mín.: 22,49; Máx.: 25,54; Med.: 23,19; DP: 1,35) e da solução contaminante foi de 22,08 (Mín.: 17,96; Máx.: 29,31; Med.: 21,82; DP: 2,76), confirmando o desafio imposto para tratamento dos pisos. Após o derramamento da solução contaminante, em apenas uma das 12 replicatas foram detectadas partículas virais nas amostras de ar (média do Ct = 38,38). Os resultados na íntegra estão disponibilizados no apêndice D.

5.2.1 Resultados das amostras de piso

Em todas as amostras, independentemente do protocolo de tratamento, as médias e medianas dos valores de Ct após desinfecção foram superiores à limpeza. Os testes estatísticos demonstraram que as diferenças entre os valores de Ct, após desinfecção e após limpeza são significantes, comprovando que a desinfecção consecutiva à limpeza foi mais eficaz que a limpeza isolada ($p < 0,001$).

As amostras coletadas após a limpeza das superfícies demonstraram mais elevados valores de média e mediana de Ct, até limites não detectáveis, quando comparados aos valores do grupo controle positivo (Tabela 5). No total, onze de 36 amostras foram negativas após a limpeza (30,55%). No granito, oito das 18 amostras (44,44%) resultaram em valores de Ct negativos e no vinil, três (16,66%). Porém, a análise estatística demonstrou que não há diferença estatística significativa entre os tipos de piso após limpeza ($p>0,05$). No vinil, observa-se o maior desvio padrão entre os resultados, indicando maior variabilidade nos resultados.

Tabela 5 - Valores de Cycle Threshold (Ct) das amostras do protocolo "L" segundo o tipo de piso. São Paulo, 2017.

Identificação	Amostra	Média	DP	Mínimo	Máximo	Mediana
CTL+ Granito	n = 6	22,97	1,42	20,40	24,59	23,00
CTL+ Vinil	n = 6	24,24	3,85	20,51	31,76	23,95
L - Granito	n = 6	37,76	2,30	34,44	>40,00	38,23
L - Vinil	n = 6	36,80	3,62	28,73	>40,00	38,11

CTL+: controle positivo; L – Granito: limpeza no granito; L – Vinil: limpeza no vinil; DP: Desvio-padrão

Em relação à avaliação dos métodos de desinfecção, nos dois grupos do protocolo "H", em 12 das 18 amostras (66,66% - três no granito e nove no vinil) houve residual de partículas de NoV após limpeza. O hipoclorito de sódio 1% eliminou o residual de NoV nos dois tipos de piso, sendo que não houve resultados positivos nem nas amostras do granito, nem nas do vinil. Os testes estatísticos evidenciaram que o hipoclorito de sódio 1% é igualmente eficiente nos dois tipos de piso ($p=0,99$).

Nos grupos do protocolo "U", após a limpeza houve recuperação de partículas de NoV na superfície em 13 de 18 amostras (72,22% - sete no granito e seis no vinil). Dessas amostras, a desinfecção com a luz UV-C apresentou valores de Ct negativos em seis de 13 amostras (46,15%), sendo três no granito e três no vinil. Na análise inferencial, a diferença entre os dois tipos de descontaminação foi significativa, sendo que o protocolo "H" foi mais eficaz que o protocolo "U" ($p<0,001$).

Na análise entre os dois tipos de piso tratados com luz UV-C, para as amostras que esse método de desinfecção de fato foi avaliado (ou seja, quando houve residual de NoV após limpeza), as amostras do vinil apresentaram média

mais elevada de Ct (39,80) quando comparada à do granito (38,75), significando menor número de partículas virais. O protocolo "U" no vinil foi significativamente mais eficaz do que no granito ($p < 0,001$). Na tabela 6 são apresentados média, desvio padrão, valores de Ct mínimo e máximos, mediana dos protocolos aplicados a cada tipo de piso.

Tabela 6 - Valores de *Cycle Threshold* (Ct) segundo o tipo de tratamento e piso implementados na superfície. São Paulo, 2017.

Identificação	Piso/Protocolo	Amostra	Média	DP	Mínimo	Máximo	Mediana
CTL+	Granito – Protocolo H	n = 3	23,44	0,76	22,62	24,48	23,23
	Vinil – Protocolo H	n = 3	25,54	5,03	20,80	31,76	24,05
	Granito – Protocolo U	n = 3	22,49	1,83	20,40	24,59	22,59
	Vinil – Protocolo U	n = 3	22,93	1,79	20,51	24,24	23,95
Após limpeza	Granito – Protocolo H	n = 3	38,66	2,01	35,01	>40,00	40,00
	Vinil – Protocolo H	n = 3	37,92	2,07	32,94	>40,00	38,45
	Granito – Protocolo U	n = 3	36,86	2,27	34,44	>40,00	35,88
	Vinil – Protocolo U	n = 3	35,67	4,49	28,73	>40,00	37,03
Após desinfecção	Granito – Protocolo H	n = 3	40,00	0,00	>40,00	>40,00	40,00
	Vinil – Protocolo H	n = 3	40,00	0,00	>40,00	>40,00	40,00
	Granito – Protocolo U	n = 3	38,75	1,98	34,05	>40,00	40,00
	Vinil – Protocolo U	n = 3	39,80	0,40	38,88	>40,00	40,00

CTL+: controle positivo; DP: desvio-padrão; UV: ultravioleta

Na figura 17, são visualizados os gráficos das diferenças dos valores de Ct após cada etapa dos tratamentos implementados nos pisos.

Figura 17 - Gráfico com as médias dos valores de Ct encontrados após cada etapa dos tratamentos. São Paulo, 2017.

5.2.2. Resultados das amostras de ar

No total, foram realizadas 12 repetições de contaminação intencional e descontaminação dos pisos e, em todas, foram identificadas pelo menos uma amostra positiva para NoV. Das 36 amostras coletadas após a limpeza, 27 apresentaram valores de Ct positivos (75%), sendo a média = 38,20 e mediana = 38,55 (Mín.: 31,55; Máx.: 40,00; DP: 1,95). Após a desinfecção, 13 das 36 amostras foram positivas (36,11%), sendo a média = 39,59 e a mediana = 40 (Mín.: 35,18; Máx.: 40,00; DP: 0,98). Não houve diferença estatística significativa entre os dois tipos de pisos quanto ao residual de NoV-GII no ar após a descontaminação ($p=0,5$).

Na análise inferencial, a presença de partículas de NoV-GII no ar foi significativamente maior após limpeza comparada após a desinfecção ($p<0,001$). E, quando comparados os protocolos de descontaminação, identificou-se valores de Ct maiores, ou seja, menor contaminação aérea após o protocolo "H" ($p<0,001$).

Observou-se diferença entre as médias e medianas entre as três coletas consecutivas, após limpeza e após desinfecção. Na primeira coleta após a limpeza (altura 1 = 50cm – L1), 11 de 12 amostras (91,66%) foram positivas e os valores de Ct foram menores quando comparados aos das amostras subsequentes, significando maior número de cópias de RNA viral detectado. Nas seguintes (altura 2 = 150cm), oito de cada coleta (66,66% - L2 e L3), com valores de média e mediana superiores para a terceira amostra comparada à segunda. Quando avaliados os valores dos Ct, houve diferença estatística significativa somente entre as segundas e terceiras amostras após a limpeza (L2 e L3 – $p=0,01$).

Para as coletas após desinfecção, quatro amostras (33,33%) foram positivas na altura 1 (D1) e cinco (41,66%) na altura 2 (D2), apresentando valores semelhantes. Observou-se que nas terceiras amostras (altura 2 = 150cm – D3), quatro amostras foram positivas (33,33%), porém apenas uma delas apresentou valores de Ct inferiores às demais (35,18/36,92). As diferenças entre os valores de Ct das três amostras de ar após desinfecção não foram significantes ($p=0,08$). Os valores das médias, desvio-padrão, mínimo, máximo e mediana das amostras do ar estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Valores de Cycle Threshold das amostras de ar obtidas após limpeza e desinfecção segundo o momento da coleta. São Paulo, 2017.

Identificação	Amostra	Média	DP	Mínimo	Máximo	Mediana
L1	n = 12	37,48	1,50	34,45	>40,00	37,47
L2	n = 12	37,88	2,48	31,55	>40,00	38,28
L3	n = 12	39,35	0,96	37,23	>40,00	39,92
D1	n = 12	39,66	0,88	36,54	>40,00	40
D2	n = 12	39,68	0,71	37,27	>40,00	40
D3	n = 12	39,41	1,29	35,18	>40,00	40

L: amostras coletadas após a limpeza; D: amostras coletadas após desinfecção; DP: desvio-padrão.

5.2.3. Resultados da curva-padrão e quantificação absoluta

Utilizou-se 5µL da amostra comercial com concentração conhecida e determinada pelo fabricante (2×10^6), não diluída, do Norovirus GII Q Standard (CeeramTools® - Biomerieux, França). Portanto, a concentração inicial foi de 1×10^7 , representando o ponto inicial para construção da curva padrão e quantificação de padrões secundários do laboratório. Desse modo, foi estabelecida a concentração de 7×10^6 da amostra não diluída do padrão secundário e foram definidos mais seis pontos de diluição (7×10^5 a 7×10^1) (Figura 18). Esse ensaio apresentou os seguintes coeficientes de performance: *slope* = -3,66 e eficiência = 87,50%; *Y-Intercept* = 43,367; $R^2 = 0,998$.

Figura 18 - Curva-padrão para quantificação absoluta das amostras (cópias de RNA/reação). São Paulo, 2017.

RESULTADOS

Fonte: Software StepOne Plus, Applied Biosystems

Inicialmente, comparou-se a quantidade de cópias de RNA/ μ L entre as amostras do controle positivo do piso e após a limpeza, diferenciando por tipo de piso. Os valores para o controle positivo variaram entre $3,4 \times 10^4$ a $4,0 \times 10^4$ (média = $3,6 \times 10^4$) RNA/ μ L. Após a limpeza no vinil, quando houve residual de NoV, o número de cópias de NoV variou de 10×10^0 a $1,9 \times 10^3$ (média = $7,7 \times 10^2$) RNA/ μ L; no granito entre 8×10^0 a $23,8 \times 10^0$ (média = $14,5 \times 10^0$) cópias de RNA/ μ L. Na figura 19 estão representados os dois gráficos, diferenciados por tipos de piso.

Figura 19 - Gráficos com as curvas-padrão e curvas de amplificação das amostras obtidas após limpeza do piso (cópias de RNA/reacção). São Paulo, 2017.

A: Vinil; B: Granito; CT: *Cycle Threshold*; Quantity: Quantidade; Cycle: ciclo de amplificação; Δ RNA: valor do RNA - *baseline*

Fonte: Software StepOne Plus, Applied Biosystems

Quanto às amostras após o protocolo de descontaminação "U" no granito, decidiu-se avaliar numericamente tanto após três minutos de exposição da luz UV-C (testes realizados na etapa de validação), como após cinco minutos. Após três minutos, os números de cópias de RNA viral/ μ L nas amostras variaram entre níveis não detectáveis (para uma amostra não houve curva de amplificação) até $9,2 \times 10^0$ (média = $6,96 \times 10^0$) cópias de RNA/ μ L. Após cinco minutos, entre $1,4 \times 10^0$ até $54,2 \times 10^0$ cópias de RNA viral/ μ L (média = $18,6 \times 10^0$). Tais resultados estão representados na figura a seguir (Figura 20).

Figura 20 - Gráficos com as curvas-padrão e curvas de amplificação das amostras obtidas após protocolo de descontaminação "U" por três e cinco minutos (cópias de RNA/reação). São Paulo, 2017.

A: 3 minutos; B: 5 minutos; CT: *Cycle Threshold*; Quantity: Quantidade; Cycle: ciclo de amplificação; Δ RNA: valor do RNA - *baseline*

Fonte: Software StepOne Plus, Applied Biosystems

Por fim, realizou-se a quantificação das amostras de ar após a limpeza do piso. Na figura 21 pode-se observar a diferença na quantidade de genoma viral entre as amostras L2 e L3. Os números de cópias de RNA viral/ μ L para as amostras de ar variaram entre $2,2 \times 10^0$ e 14×10^0 para L1 (média = 6,7); $2,2 \times 10^0$ e $12,6 \times 10^0$ para L2 (média = 7,3); $1,4 \times 10^0$ a 4×10^0 para L3 (média = 2,5).

Figura 21 - Curvas-padrão e curvas de amplificação das amostras do ar após limpeza (quantidade de RNA/reação). São Paulo, 2017.

CT: *Cycle Threshold*; Quantity: Quantidade; Cycle: ciclo de amplificação; Δ RNA: valor do RNA – *baseline*; L2: primeira amostra coletada a 150cm; L3: segunda amostra coletada a 150cm.

Fonte: Software StepOne Plus, Applied Biosystems

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

No propósito desta pesquisa de avaliar a presença residual de partículas de NoV-GII no ar e no piso, quando implementados diferentes protocolos de descontaminação do piso, após contaminação intencional, desvelou-se aspectos importantes para o controle da disseminação do vírus. Ao evidenciar com alta sensibilidade que, já no turbilhonamento do ar decorrente da limpeza inicial úmida, há aerolização de partículas do NoV, caracterizou-se o risco de transmissão aérea de NoV-GII. Portanto, há necessidade de definição de um protocolo seguro para descontaminação do piso na presença de vômito e fezes, considerando a possibilidade de dispersão de aerossóis a partir desse resíduo.

No entanto, as partículas virais residuais no piso após a limpeza, indiscutivelmente devem ser eliminadas, evitando assim a aerolização do NoV dessa fonte. Nesse sentido, a limpeza seguida de desinfecção com hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos mostrou superioridade como protocolo de desinfecção do piso, quando comparado com luz ultravioleta por cinco minutos de exposição.

A contaminação do ambiente é um assunto polêmico nas discussões sobre as práticas de controle de infecção. O conceito de que as IRAS são de ocorrência multifatorial já é amplamente aceito; sendo assim, existe a dificuldade em confirmar o papel do ambiente na transmissão de infecções, inclusive de fonte aérea. Tal fato é comprovado pela demonstração de que, mesmo após implementação de intervenções visando melhorias na limpeza e desinfecção de superfícies frequentemente tocadas, não houve redução nas taxas de infecção por *Clostridium difficile* (RAY et al., 2017). Essa informação contrapõe-se a resultados divulgados anteriormente que demonstram redução nas taxas de infecção pelo mesmo patógeno, após o aprimoramento da limpeza e desinfecção de superfícies (MCCORD et al., 2016).

Para NoV, assume-se que o ambiente exerce um papel crucial na transmissão de infecção, pois, considerando a baixa dose infectante (a partir de 10 partículas - TEUNIS, 2008), uma superfície mesmo com poucas partículas virais, após ser tocada e na ausência ou ineficiência de higienização das mãos, pode atuar como veículo de transmissão. Esse dado é reforçado pelos inúmeros surtos

descritos na literatura e notificados pelo sistema de vigilância em saúde, nos quais a descontaminação do ambiente é identificada como uma medida importante para o controle dos casos. Dessa forma, é ideal que as superfícies frequentemente tocadas sejam totalmente livres de NoV.

Como já mencionado, o piso apresenta altos níveis de contaminação e rápida recontaminação após limpeza e desinfecção (AYLIFFE; COLLINS; LOWBURY, 1966). Além disso, foi comprovado que alguns microrganismos ou vírus podem ser disseminados a partir do piso. Após inoculação de um vírus bacteriófago, não patogênico, no piso de um hospital, ele foi isolado em múltiplas superfícies dentro dos quartos dos pacientes após um, dois e três dias da contaminação intencional. Verificou-se também que esse mesmo vírus foi disseminado para superfícies frequentemente tocadas externas aos quartos, por exemplo, áreas de circulação comum (KOGANTI et al., 2016). Apesar dessas características, poucos microrganismos ou vírus atuam de fato como patógenos em indivíduos imunocompetentes, justificando a indicação de desinfecção do piso somente em áreas de risco (MAILLARD, 2005). No contexto das noroviroses e baseado nos resultados da presente investigação, a desinfecção do piso após a limpeza está indicada quando houver diagnóstico de casos isolados e suspeitas ou comprovação de surtos.

A coleta de amostra de superfícies é um tema complexo, pois não há um único método ou técnica definidos como padrão-ouro para recuperação de vírus ou microrganismos, pois todos apresentam vantagens e limitações (GALVIN et al., 2014; HEDIN, RYNBACK; LORÉ, 2010). De forma geral, a distribuição dos patógenos não se dá de forma homogênea sobre a área a ser avaliada; e, quando implementadas técnicas de biologia molecular, pode haver inibidores da amplificação na superfície, resultando em menor acurácia na recuperação (RODRIGUEZ-LÁZARO et al., 2012). Áreas amplas também diminuem significativamente a acurácia da coleta de amostras para detecção de NoV-GII em superfícies (PARK et. al., 2015). Visando limitar o risco de vieses na coleta de dados deste estudo, decidiu-se friccionar o *swab* por toda área do piso, por três vezes consecutivas. Não há, até o momento, relatos sobre a presença de inibidores de amplificação no granito ou vinil, pisos utilizados nesta pesquisa.

O tipo de *swab* utilizado na técnica de coleta de amostras de superfície pode também interferir na recuperação de patógenos das superfícies. Existem diversos

tipos de *swabs* comercializados atualmente, com diferentes tecnologias. Estudos comparativos realizados com diferentes tipos de *swab* e técnicas foram realizados, porém demonstram resultados discrepantes e altos desvios-padrão, principalmente quando se trata de baixa concentração do inóculo (PARK et al., 2015; IBFELT et al., 2016; DOLAN et al., 2010; HEDIN; HYNBACK; LORÉ, 2010; RÖNNQVIST et al., 2013).

Apesar do *swab* de algodão estar indicado pela ISO/TS 15216 para detecção de NoV (ISO, 2013), na coleta de dados deste estudo selecionou-se o *swab* flocado de nylon. Esse tipo de *swab* foi reportado como o de maior eficiência, por permitir maior liberação dos microrganismos das suas fibras (HEDIN; HYNBACK; LORÉ, 2010); alta sensibilidade (DOLAN et al., 2010); e, sem grande variabilidade na recuperação de NoV em superfícies não-porosas (RÖNNQVIST et al., 2013). O *swab* de espuma ("*macrofoam*") também tem sido recomendado para coleta de amostras de superfície e foi associado às mais elevadas taxas de recuperação de NoV-GII quando comparado ao *swab* de algodão, rayon, poliéster ou um tipo de tecido próprio ("*antistatic wipe*") para coleta de amostras (PARK et al., 2015). Além da seleção pelo *swab* flocado de nylon, a fim de controlar a variável pressão aplicada durante a fricção, na presente investigação essa foi realizada pelo mesmo pesquisador.

Quanto aos protocolos de descontaminação, a limpeza de superfícies previamente à desinfecção é necessária e essencial a fim de garantir segurança da descontaminação (BARKER; VIPOND; BLOOMFIELD, 2004; TULADHAR et al., 2012). Neste estudo, observou-se que os resultados das amostras de piso após a limpeza variaram, apesar dessa ter sido padronizada e realizada pelo mesmo pesquisador. Obtiveram-se resultados tanto de eliminação total de NoV-GII do piso como de recuperação de até dois $\log_{10}$ de cópias de RNA/ μ L. A ação mecânica da limpeza de superfícies depende da pressão realizada durante a fricção, da forma e do número de vezes em que a fricção se repete, do tipo e volume do detergente, do tipo de superfície e do material utilizado (DANCER et al., 2016; SATTAR et al., 2015). Mesmo com a padronização desses fatores, os resultados podem não ser reprodutíveis entre uma limpeza e outra (SATTAR et al., 2015). A limpeza do piso neste estudo não foi padronizada quanto ao tempo e número de fricções, mas a fricção ocorreu em forma de "oito deitado" e de forma que não houvesse matéria orgânica visível e residual de desinfetante após o enxague. A escolha pela não

padronização do tempo e número de fricções justifica-se pela simulação da rotina de limpeza nos SS, sendo que os profissionais responsáveis por esses procedimentos devem estar capacitados para avaliação da qualidade da limpeza.

A limpeza e desinfecção de superfície não automatizados podem apresentar grande variabilidade no desempenho e resultados, visto que dependem de fatores relacionados ao comportamento de pessoas. A adesão às boas práticas, rotatividade dos profissionais ou alterações de rotinas de trabalho, especialmente em situações de sobrecarga, podem não ser fáceis entre os profissionais executores de higiene e limpeza (DANCER, 2016). As mesmas intervenções educacionais e de monitoramento periódico da limpeza concorrente e terminal, realizadas em sete hospitais nos EUA, resultaram em diferentes índices de qualidade da descontaminação de superfícies frequentemente tocadas (RAY et al., 2017). Esse dado reforça a necessidade de desinfecção dessas superfícies.

Uma variável que não foi mensurada na presente investigação foi a contaminação das fibras do *mop*, pois os refis de microfibras foram substituídos a cada repetição da coleta de dados. Esse fato não reflete a prática dos SS, pois sabe-se que a descontaminação ou substituição dos *mop* não é realizada regularmente. Tendo em vista a possibilidade de transferência de microrganismos de uma área para outra nos SS, mops com fibras cobertas por prata podem minimizar esse risco (LORENZI et al., 2011).

Não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes entre tipos de piso e limpeza. O granito e o vinil são amplamente utilizados em pisos dos SS por serem passíveis de limpeza e aplicação de desinfetantes ou ceras (BRASIL, 2010). Embora ambos sejam considerados materiais não-porosos, sabe-se que a absorção de água pelo granito é maior do que pelo vinil. Observou-se, durante a coleta de dados, que o piso vinílico permaneceu visivelmente úmido por mais tempo, tanto após a limpeza como após a desinfecção com hipoclorito de sódio 1%. O piso vinílico é frequentemente utilizado em hospitais devido à sua durabilidade, ao custo-benefício, à facilidade de instalação e manutenção. Como são empregadas substâncias adesivas na sua instalação, não é indicado para banheiros, sendo a cerâmica frequentemente utilizada nesses locais.

Sobre contaminação bacteriana em pisos, maior porcentagem de colonização por bactérias de relevância clínica foi encontrada no piso vinil quando comparado ao cerâmico (YAZGI, UYANIK, AYYILDIZ, 2009). O tempo de sobrevivência de

bactérias também foi maior no vinil quando comparado à fórmica e superfícies porosas (látex e tecido de algodão), sendo comprovada a aderência de bactérias nesse tipo de superfície. No mesmo estudo, foi avaliada a aderência de bactéria aos diferentes tipos de superfície. No granito, não se verificou que as bactérias aderiram a essa superfície; no entanto, ainda não é possível explicar como esse mecanismo ocorre (ZARPELLON et al., 2015).

A diferença entre superfícies porosas e não-porosas para a eficácia de métodos de desinfecção em relação ao NoV, substitutos de NoV ou vírus bacteriófago foi reportada em estudos anteriores. Contudo, selecionaram-se superfícies porosas como tecidos de algodão ou poliéster (LOPEZ et al., 2013; YEARGIN et al., 2015), papel (LOPEZ et al., 2013) e látex (RÖNNQVIST et al., 2013). Nesses estudos experimentais, menores percentuais de redução da contaminação foram identificados nas superfícies porosas, confirmando que esse tipo de superfície é um desafio para os métodos de descontaminação dos NoV. Contudo, outro fator que pode influenciar a avaliação é que a coleta da amostra com *swab* em superfícies porosas pode ser dificultada, porque os patógenos podem permanecer presos às fibras do material (RÖNNQVIST et al., 2013). Nos estudos de Lopez et al. (2013) e Rönnqvist et al. (2013) foi utilizada a técnica de coleta de amostra por *swab*. Já no estudo de Yeargin et al. (2015) houve a inoculação direta da amostra da superfície em meio de cultura, seguida de sonicação.

A instalação de tecidos como cobertura para pisos não é uma realidade no Brasil, diferentemente de outros países onde é comum utilizar carpetes, mesmo em SS. Sabe-se que a presença de tecidos no piso é um risco para o controle de infecções, sendo que relato de surto de norovirose foi associado à contaminação de carpetes (CHEESBROUGH et al., 2000).

A escolha pelo hipoclorito de sódio neste estudo justifica-se por ser um desinfetante frequentemente utilizado nos serviços de saúde, com ação rápida, amplo espectro e baixo custo. E a concentração estipulada baseou-se nas recomendações da ANVISA (BRASIL, 2010) e em estudos de eficácia contra o NoV, em que foram encontrados maiores valores de redução das cópias do RNA viral com 1000ppm e 5000ppm (BARKER; VIPOND; BLOOMFIELD, 2004; TULADHAR et al., 2012). Os resultados desta investigação comprovaram sua maior eficácia comparada à luz UV-C ($p < 0,001$), sustentando sua implementação para controle de norovirose nos SS. Além disso, tais resultados corroboram com a recomendação

para uso do hipoclorito de sódio, considerando a área e volume da solução contaminante significativamente maiores neste estudo (4800cm^2 e 500ml), comparados aos de outros estudos laboratoriais (placas de melanina de $2,25\text{cm}^2$ inoculada com $10\mu\text{L}$ no estudo de Barker; Vipond; Bloomfield, 2004; e carreadores de $4,84\text{cm}^2$ com $30\mu\text{L}$ no estudo de TULADHAR et al., 2012), o que poderia ter diminuído a eficácia de limpeza e desinfecção.

Nos pisos descontaminados com UV-C, não foram observados resultados regulares, pois, além da porcentagem de amostras negativas (46,15%), o número de cópias de RNA viral/ μL nas amostras positivas variou entre 1,4 até 54,2. Algumas hipóteses foram levantadas para justificar esses resultados: a pequena área de emissão de luz UV-C do Surface-UV® que, mesmo em uma área delimitada, pode não ter garantido a distribuição homogênea da luz sobre a superfície; a dose da radiação da luz UV emitida pelo dispositivo, considerando o tempo de ação de cinco minutos, não ter sido suficiente; a distância entre a luz UV-C e a superfície terem interferido na eficácia do método.

Grandes investimentos têm sido dispensados em testes de avaliação das tecnologias automatizadas de desinfecção. A introdução de um dispositivo com luz UV-C para limpeza terminal resultou, durante um estudo multicêntrico, randomizado e controlado, em menores taxas de casos incidentes de infecção por bactérias multidrogas resistentes. No entanto, para *Clostridium difficile* não houve diferença na comparação entre UV-C ou desinfetante à base de hipoclorito de sódio (ANDERSON et al., 2017). Adicionalmente à ausência de comprovação da eficiência dos métodos com luz UV-C para alguns microrganismos particulares, ressaltam-se algumas limitações como: tempo prolongado que o equipamento deve permanecer ligado (até 45 minutos); distância entre a fonte de emissão da luz e o patógeno; bem como a ausência de ação em locais com sombra e exigência da retirada de pessoas do local durante a desinfecção (DANCER, 2016; NERANDZIC et al., 2010).

A contaminação por NoV também é uma preocupação na indústria de alimentos. Após elaboração de revisão de literatura, estudos também relataram redução na quantidade de NoV-GII em superfícies após desinfecção com UV-C, mas nenhum estudo sugere que os vírus foram eliminados completamente (COOK; KNIGHT; RICHARDS, 2016).

A técnica de RT-qPCR é um método sensível de detecção de genomas, ou seja, é capaz de detectar a sequência-alvo mesmo em baixas concentrações. O estabelecimento do valor de Ct para ponto de corte de detecção é uma etapa crucial, pois valores acima do 40 significam perda da especificidade. Do mesmo modo, quando são definidos pontos de corte inferiores a 37, por exemplo, podem implicar em exclusão de resultados verdadeiro-positivos (BURNS; VALDIVIA, 2008). Para as reações desta investigação, foi definido o ponto de corte 40, baseado na curva-padrão realizada para quantificação absoluta e em estudos prévios (BUSTIN et al., 2009; RÖNNQVIST et al., 2013).

Identificou-se a possibilidade da técnica de RT-qPCR ter superestimado os resultados positivos após a descontaminação com UV-C, já que essa técnica não diferencia cópias de genoma de vírus infecciosos ou genomas somente danificados (TUNG et al., 2013, RÖNNQVIST et al., 2013). Como o mecanismo de ação de inativação de patógenos da luz UV-C são danos causados no ácido nucléico dos vírus ou microrganismos, após a RT-qPCR pode haver amplificação do fragmento que contém a sequência-alvo, sem necessariamente representar o genoma do vírus viável.

Técnicas de tratamento enzimático antes da reação de amplificação têm como objetivo quebrar a cobertura proteica de vírus danificados, possibilitando que seu RNA seja digerido pela ação de RNases. Dessa forma, somente vírus realmente infecciosos emitiriam o sinal de fluorescência durante a RT-qPCR. Rönnqvist, Tuominen e Maunula (2014) avaliaram o efeito dessas enzimas em superfícies intencionalmente contaminadas com NoV-GII e MNV e, subsequentemente descontaminadas com diferentes doses de luz UV-C. Neste estudo, o MNV foi selecionado para ensaios de viabilidade após o tratamento com UV-C, por meio de cultivo em cultura de células. Identificou-se o efeito dose-resposta da luz UV-C, tanto nos ensaios de viabilidade do MNV como na redução logarítmica, verificada por RT-qPCR de ambos os vírus. Porém, confirmando a teoria de que os vírus substitutos reagem diferentemente aos processos de desinfecção, o NoV-GII foi mais resistente à UV-C do que o MNV. A redução logarítmica de NoV-GII após a dose máxima de UV-C (1800mJ/cm^2 , o que significa tempo de exposição de 60min) foi de menos de dois $\log_{10}$ nas amostras sem tratamento enzimático e de 2,5-3 $\log_{10}$ nas amostras que receberam o tratamento. Na presente investigação, nenhum tratamento foi

realizado previamente à amplificação e a dose da radiação emitida pelo Surface-UV®, em cinco minutos, foi de 3900mJ/cm².

Apesar dos resultados satisfatórios, a técnica de tratamento enzimático previamente à RT-qPCR também apresenta limitações (RÖNNQVIST et al., 2014). Outras técnicas para diferenciar RNA de vírus infeccioso e não infeccioso têm sido temas de pesquisa (MOORMAN, MONTAZERI, JAYKUS, 2017). O estudo de Ettayebi e colaboradores (2016), já mencionado anteriormente, que utilizou cultura de células em monocamadas de enterócitos poderá contribuir para futuras pesquisas que visam a avaliação da descontaminação em superfícies ou alimentos contaminados com NoV.

No caso particular do Surface-UV®, acredita-se ser operacionalmente inviável aumentar o tempo de ação produzindo aumento da dose de exposição, pois exigiria mais tempo dos profissionais para descontaminação específica de um local. Adicionalmente, por ser um dispositivo manual, é improvável garantir que a distância entre esse dispositivo e a superfície seja de um centímetro durante um tempo de prolongado de ação, conforme recomendado pelo fabricante. Sugere-se, portanto, que o fabricante avalie a possibilidade de aumento da potência da lâmpada e aumento da área de emissão da luz UV-C. Além disso, novos testes podem ser realizados com utilização de tratamento enzimático para RT-qPCR.

Em relação às amostras de ar, os resultados negativos para NoV-GII após a aplicação da solução contaminante (mesmo nível do piso), em contraste aos resultados positivos após a limpeza e desinfecção do piso, comprovam que aerossóis com NoV-GII podem ser gerados durante essas atividades. Essa evidência, no contexto das noroviroses, refuta a teoria de que a limpeza úmida do piso, recomendada pela ANVISA (2010), é segura para evitar a dispersão aérea. Na soma das três coletas após a limpeza, estima-se que até 17 cópias de RNA/μL de amostra estavam presentes ao término do procedimento.

Este é o primeiro estudo onde a presença de NoV-GII no ar foi avaliada em um ambiente controlado e com conhecimento prévio de contaminação intencional do piso. A afirmação de que esse vírus pode ser transmitido via aerossóis é baseada em relatos de surtos quando indivíduos foram infectados, mesmo distantes da fonte de contaminação (MARKS et al., 2000; MARKS et al., 2003, REEP; KEENE, 2012). Ou ainda, pela detecção de NoV no ar durante surtos utilizando um ionizador que

atrai as partículas aéreas para uma placa carregada com carga positiva (NENONEM et al., 2014); ou um coletador de partículas aéreas (BONIFAIT et al., 2015).

Durante a coleta de dados, foi verificado aumento tanto da temperatura como da umidade relativa do ar da sala, porém sem associação estatística com os valores de Ct. Admite-se que o relevante aumento da umidade relativa do ar esteve associado ao fato de duas pessoas permanecerem em uma sala fechada, bem como à produção de gotículas de água resultantes da agitação do líquido dentro do cone do coletador de ar. Acredita-se que esse não foi um viés pois, se tivesse ocorrido a diminuição da umidade relativa do ar, poderia ter havido deterioração dos aerossóis. Gotículas e aerossóis, além de vírus ou microrganismos, são compostos por água, sais, proteínas, materiais orgânicos e inorgânicos. Em ambientes pouco úmidos e altas temperaturas há evaporação, fazendo com que o tamanho das partículas seja menor (VERREAULT, MOINEAU, DUCHAINE, 2008). Nesse caso, o coletador de ar selecionado para este estudo teria sua eficiência diminuída, conforme as informações do próprio fabricante ($D_{50} < 0,5\mu\text{m}$ – BERTIN TECHNOLOGIES, 2015). Apesar de não estar comprovada a influência da umidade relativa do ar na infectividade dos vírus, há maior tendência de estabilidade de vírus sem envoltório em ambientes mais úmidos (VERREAULT, MOINEAU, DUCHAINE, 2008).

O tipo de piso não foi uma variável associada à presença residual de NoV no ar após os protocolos de descontaminação, o que pode ser justificado pela semelhança entre eles. No entanto, quando a comparação foi realizada entre carpete (superfície porosa) e vinil, o tipo de superfície foi um fator que influenciou significativamente a dispersão de aerossóis, a partir de piso contaminado por *Bacillus atrophaeus*. Em um ambiente controlado, duas áreas cobertas com esses pisos foram contaminadas com esporos da bactéria. O efeito da atividade humana na reaerolização também foi medido, por meio de dois tipos de caminhada sobre os pisos: leve e pesada. Maiores índices de concentração bacteriana foram encontrados a partir do carpete, após a caminhada pesada e na altura próxima aos pisos (PATON et al, 2015). As evidências do estudo de Paton e colaboradores (2015) também corroboram com os achados da presente investigação quando foi maior o número de amostras positivas identificadas na primeira coleta após a limpeza, ou seja, na altura mais próxima do piso.

A ausência de diferença estatística significativa entre as primeiras e segundas amostras do ar após a limpeza, contrastada à diferença entre as segundas e

terceiras amostras podem sugerir esgotamento gradual das partículas de NoV. Considerando as dimensões da sala, a estimativa do seu volume cúbico de ar ($11,43\text{m}^3$) e a taxa de fluxo de ar do coletador (300L/min), a inferência é que, após três coletas consecutivas, havia menor concentração de NoV no ar. Da mesma forma, acredita-se que os maiores valores de Ct após a desinfecção estejam relacionados a esse fato também e não diretamente ao método de desinfecção, mesmo que tenha sido identificada diferença estatística significativa entre hipoclorito e luz UV-C.

A aerolização de partículas de NoV levando à contaminação aérea em um ambiente fechado pode ocorrer de diversas formas: durante o episódio de vômito; após a descarga de banheiros; pela agitação de partículas depositadas na superfície e tecidos (MORAWSKA, 2006; VERREAULT, MOINEAU, DUCHAINE, 2008; HOBDA, DANCER, 2013). Neste estudo a inferência é que a aerolização ocorreu tanto pelo atrito durante a fricção manual, quanto pela torção das fibras do *mop* para enxague e secagem. Mesmo em serviços de saúde que não utilizam *mop* para higienização do piso, acredita-se que também pode haver aerolização após a torção de panos.

Apesar de se reconhecer que a maior fonte de aerolização é o vômito (BOOTH, 2004; MORAWSKA, 2006), não pode ser minimizada a possibilidade de que uma superfície, quando descontaminada inapropriadamente, atue como fonte de disseminação de partículas de NoV. Aerossóis e gotículas com NoV, gerados pela limpeza, podem depositar em superfícies ou mesmo nos alimentos e serem inalados ou deglutidos por outros indivíduos (RODRIGUEZ-LÁZARO et al., 2012).

O mecanismo de transmissão de NoV por via aérea ainda carece de pesquisas que expliquem, por exemplo, o número de partículas que são inaladas e posteriormente deglutidas, resultando em infecção. A baixa dose infectante na transmissão fecal-oral, mesmo em indivíduos saudáveis, já está bem fundamentada. Contudo, a transmissão de NoV por via aérea gera preocupação, principalmente para pacientes imunocomprometidos, pois eles podem desenvolver infecções crônicas. Esses pacientes apresentam persistência dos sintomas e tornam-se reservatórios de cepas, fazendo com que partículas de NoV sejam liberadas através das fezes por períodos prolongados (GREEN, 2014; BOK et al. 2016).

A indisponibilidade de vacinas contra NoV, as quais garantem imunidade passiva para pacientes imunocomprometidos, respalda ainda mais a necessidade de

adesão rigorosa às boas práticas de controle de IRAS (GREEN, 2014). Quando infectados por NoV, esses pacientes apresentaram maiores taxas de hospitalização, apesar de procurarem com menor frequência os serviços de emergência comparada à da população em geral. Esses dados sugerem que pacientes imunocomprometidos apresentam infecções por NoV mais graves (VERSTRAETEN et al., 2016).

Na presente investigação, a diferença dos resultados das amostras de ar nas alturas de 50cm e 150cm pode não ter relevância clínica. Aerossóis com NoV são partículas pequenas e seus deslocamentos são explicados pela teoria Browniana, definindo que as colisões entre milhões de moléculas produzem movimentos aleatórios das partículas pequenas no ar. Portanto, a partícula se deslocaria até encontrar uma superfície onde pudesse aderir ou ser inalada (VERREAULT, MOINEAU, DUCHAINE, 2008). Dessa forma, considerando o ambiente de um SS, mesmo que aerossóis estejam em alturas próximas ao piso, eles poderiam ser facilmente transportados até à altura das vias aéreas de um indivíduo, por correntes de ar ou demais movimentações no ambiente.

Considerando as evidências obtidas neste estudo, os profissionais executores da limpeza de superfície estão expostos à contaminação por aerossóis com NoV, também ao implementarem os protocolos de descontaminação de superfícies. Segundo as recomendações nacionais atuais, o uso de máscara do tipo N95 está indicado para esses profissionais somente em área de isolamento por aerossóis (BRASIL, 2010). Mesmo que NoV seja considerado na classificação de risco como nível 2 de biossegurança (BRASIL, 2011), e a recomendação do CDC ser de isolamento de contato e utilização de máscara cirúrgica quando em contato com o paciente (MACCANNEL et al., 2011), o risco de transmissão por aerossóis não pode ser menosprezado nos SS.

Métodos de desinfecção do ar podem ser úteis para o controle de norovirose como dispositivos de acionamento automático de luz UV-C, após o fechamento das portas, principalmente quando se trata de locais compartilhados como os banheiros (COOPER et al., 2016). Os sistemas de ventilação e condicionamento do ar, quando devidamente instalados e com manutenção adequada, promovem um ambiente mais seguro, efetuando exaustão, trocas de ar e/ou filtração do ar contaminado (ASHRAE, 2011). Contudo, quando os SS forem desprovidos dessas tecnologias, a garantia de que um ambiente esteja bem ventilado, permitindo trocas de ar com o

ambiente externo, pode contribuir para reduzir a concentração da contaminação, reduzindo o risco na transmissão de infecções (PRICE; AYLIFFE, 2008).

Há uma tendência para a valorização das novas tecnologias em detrimento de outras medidas para controle de IRAS, refletindo, inclusive, nos temas que são focos de estudos científicos. Um exemplo é a ventilação natural cujos benefícios, de modo geral, não são enfatizados no contexto moderno. A elevada frequência de trocas de ar com o ambiente externo, mantendo janelas e portas abertas, contribuem para a redução de potenciais patógenos no ar, ao promover a diluição física e o deslocamento desses patógenos dos ambientes internos. Alguns aspectos não devem ser desconsiderados quando um ambiente é ventilado naturalmente, como: segurança do paciente ao manter janelas abertas; dificuldades em padronizar as trocas de ar; entrada de insetos; limitação em garantir a qualidade do ar não-filtrado proveniente do ambiente externo; e dependência de boas condições meteorológicas. No entanto, a ventilação natural apresenta vantagens como baixo custo, necessidades mínimas de manutenção e aspectos relativos à sustentabilidade, como economia de energia e redução na emissão de carbono comparados aos sistemas automatizados de ventilação e condicionamento do ar (HOBDA, DANCER, 2013).

Finalmente, defende-se que o presente estudo apresenta pontos fortes e limitações. Como pontos fortes, destacam-se o fato de ser um estudo laboratorial, onde é possível controlar as possíveis variáveis de confusão. Um estudo de campo com o mesmo objetivo só seria possível na vigência de surtos de gastroenterites. A decisão pela utilização de placas com áreas maiores e não de carreadores convencionalmente adotados para os estudos laboratoriais, possibilitaram a aproximação do contexto real na descontaminação de superfícies. Ademais, pelo fato da solução contaminante ter sido preparada com NoV de amostras clínicas, e não com vírus substitutos, favorecem a avaliação do efeito real dos métodos de desinfecção.

Como limitações, assume-se a realização da etapa de controle da extração do RNA viral por meio da inoculação do Mengovirus somente para uma quantidade de amostras representativa deste estudo. Essa limitação ocorreu devido à impossibilidade de importação do material, em tempo hábil, para a conclusão deste estudo. Essa deficiência pode ter sido minimizada pela verificação da qualidade do material selecionado para realizar a extração do RNA. Além disso, menciona-se a

não aplicação de técnicas que possibilitariam uma afirmação mais precisa do nível de infectividade dos RNA de NoV identificados nas amostras, como tratamentos enzimáticos pré-amplificação.

Apesar deste estudo enfatizar as práticas de controle de infecção em SS, as recomendações que visam evitar a disseminação de transmissão de NoV podem ser extrapoladas para outros locais, sendo: hotéis, escolas, navios, instituições de idosos, entre outros.

Baseadas nas evidências obtidas, são propostas as seguintes recomendações:

- ✓ As superfícies frequentemente tocadas, quando houver presença de matéria orgânica, devem sempre ser submetidas à limpeza padronizada e desinfecção com hipoclorito de sódio.
- ✓ O piso dos SS não deve ser submetido à desinfecção rotineiramente. A realização da limpeza padronizada e com equipamentos adequados elimina a contaminação em níveis satisfatórios. Remover o máximo de matéria orgânica com papel absorvente ou outro tipo de material descartável. Minimizar a torção de *mop* ou panos utilizados na limpeza. Na vigência de casos confirmados e surtos confirmados ou suspeitos causados por NoV, a desinfecção do piso deve ser realizada com hipoclorito de sódio a 1%, seguindo as orientações do fabricante para tempo de ação.
- ✓ Realizar descontaminação das fibras do *mop* com água, detergente e imersão em hipoclorito de sódio 1%, durante pelo menos 10 minutos, ao mudar de ambiente ou setor. Trocar o refil do *mop* caso não possível descontaminá-lo após usos consecutivos, ou seja, acúmulo excessivo de sujidades.
- ✓ Na vigência de casos ou surtos confirmados ou suspeitos: para os PS, bem como os responsáveis pela higiene e limpeza, sugere-se utilizar máscara do tipo N95; realizar isolamento de contato dos pacientes e dimensionamento dos leitos, de forma que casos confirmados permaneçam no mesmo quarto, enfermaria ou setor; alocar esses pacientes em ambientes com sistema de ventilação e condicionamento de ar com exaustão forçada de ar, ou em ambientes onde possa haver trocas de ar com o ambiente externo.

- ✓ Para os pacientes que apresentem vômitos, sacos plásticos descartáveis podem ser oferecidos, permitindo que a matéria orgânica fique contida nesses recipientes, minimizando a contaminação de superfícies e a aerolização de NoV. Os sacos plásticos devem estar vedados para o descarte.
- ✓ Quando não houver confirmação diagnóstica, principalmente quando o paciente é admitido em setores de urgência e emergência, preferencialmente o paciente deve permanecer em um ambiente mais privativo e com ventilação adequada. Além disso, evitar que esse paciente utilize banheiros compartilhados.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

Protocolos de descontaminação que contemplem limpeza seguida de desinfecção do piso são significativamente mais eficazes para eliminação de NoV-GII comparada à limpeza isolada. A limpeza do piso, quando padronizada (remoção do excesso da matéria orgânica com papel absorvente, seguida de limpeza com MOP, água e detergente neutro e enxague posterior), reduz a contaminação por NoV-GII de um a três $\log_{10}$, alcançando até níveis indetectáveis. No caso de haver presença residual de partículas de NoV-GII após a limpeza, o protocolo de descontaminação que utiliza limpeza seguida de aplicação de hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos é mais eficaz comparada à aplicação luz UV-C por cinco minutos.

Não há diferenças estatísticas significantes entre os tipos de piso, vinil e granito quanto à presença residual de NoV-GII após a descontaminação. Os resultados deste trabalho corroboram com os de outros estudos no que se refere ao fato de o hipoclorito de sódio ser mais eficaz na eliminação de NoV-GII em superfície. Ainda não há evidências fortes e suficientes para implementação dos métodos de desinfecção de superfícies com luz UV para eliminação das partículas desse vírus. Novos estudos que utilizam técnicas que permitam a diferenciação entre partículas virais infecciosas e não-infecciosas devem ser conduzidos para avaliação dos métodos com UV-C.

Aerossóis com NoV-GII são gerados durante e após a limpeza do piso contaminado com esse tipo de vírus, mesmo quando a limpeza é úmida. Estima-se que em média 17 cópias de RNA de NoV-GII/ μL de amostra podem ser dispersadas no ar durante e após as etapas de limpeza do piso. Acredita-se que, quanto menor a quantidade de partículas virais no piso, menor é o risco de dispersão de aerossóis por atividades relacionadas à movimentação no piso, subsidiando a decisão pela implementação do protocolo de descontaminação que utiliza limpeza seguida de desinfecção com hipoclorito de sódio 1%.

REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY OF HEATING, REFRIGERATING, AND AIR-CONDITIONING ENGINEERS (ASHRAE). Health-Care Facilities. IN: ASHRAE. 2011 ASHRAE Handbook. Heating, Ventilating and Air Conditioning Application. SI Edition. Atlanta (EUA): ASHRAE; 2011. p. 8.1-8.16.

ANDERSEN, B. M. et al. Floor cleaning: effect on bacteria and organic materials in hospital rooms. **J. Hosp. Infect.**, v. 71, n. 1, p. 57-65, 2009.

ANDERSON, D. J. et al. Enhanced terminal room disinfection and acquisition and infection caused by multidrug-resistant organisms and *Clostridium difficile* (the Benefits of Enhanced Terminal Room Disinfection study): a cluster-randomised, multicentre, crossover study. **Lancet**, v. 389, n. 25, p. 805-14, 2017.

AYLIFFE, G. A.; COLLINS, B. J.; LOWBURY, E. J. Cleaning and disinfection of hospital floors. **Br. Med. J.**, v. 2, n. 5511, p. 442-5, 1966.

BARKER, J.; VIPOND, I. B.; BLOOMFIELD, S. F. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. **J. Hosp. Infect.**, v. 58, n. 1, p. 42-49, 2004.

BERTIN TECHNOLOGIES. Coriolis® μ User Manual. France, 2015.

BOK, K. et al. Epidemiology of Norovirus Infection Among Immunocompromised Patients at a Tertiary Care Research Hospital, 2010-2013. **Open. Forum Infect. Dis.**, v. 3, n. 3, ofw169, 2016.

BONIFAIT, L. et al. Detection and quantification of airborne norovirus during outbreaks in healthcare facilities. **Clin. Infect. Dis.**, v. 61, n. 3, p. 299-304, 2015.

BOOTH, C. M. Vomiting Larry: a simulated vomiting system for assessing environmental contamination from projectile vomiting related to norovirus infection. **J. Infect. Prev.**, v.15, n.5, p.176-180, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar** - Caderno C Métodos de Proteção Anti-Infecçiosa. Brasília: ANVISA, 2000. Disponível em: <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/CIHCadernoC.pdf>. Acesso em 29 de maio de 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 50 de 21 de

fevereiro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistências de saúde. Brasília, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 14 de 28 de fevereiro de 2007. Aprova Regulamento Técnico para Produtos com Ação Antimicrobiana, harmonizado no âmbito do Mercosul, e dá outras providências. Brasília, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução nº 40, de 5 de junho de 2008. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos de Limpeza e Afins harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 47/07. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.914, de 9 de agosto de 2011. Aprova a Classificação de Risco dos Agentes Biológicos elaborada em 2010, pela Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS), do Ministério da Saúde. Brasília, 2011.

BURNS, M.; VALDIVIA, H. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 226, p. 1513-24, 2008.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin. Chem.**, v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009.

CABO-VERDE, C. S. et al. Microbiological assessment of indoor air quality at different hospital sites. **Res. Microbiol.**, v. 166, n. 7, p. 557-63, 2015.

CANNON, J. L. et al. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. **J. Food Prot.**, v.69, n.11, p. 2761-5, 2006.

CARDUCCI, A. Et al. Environmental survey to assess viral contamination of air and surfaces in hospital settings. **J. Hosp. Infect**, v. 77, n.3, p. 242-7, 2011.

CAUL, E. O. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. **Lancet**, v. 343, n. 8908, p. 1240-2, 1994.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGIA “Prof. Alexandre Vranjac”. Guia de vigilância epidemiológica. São Paulo: CVE, 2012. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/outros/CVE12_GUIA_VE_ATUALIZADO.pdf. Acess em : 01 jul. 2017.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA “Prof. Alexandre Vranjac”. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar/>. Acesso em 16 de junho de 2017.

- CHEESBROUGH, J. S. et al. Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. **Epidemiol. Infect.**, v. 125, n. 1, p. 93–98, 2000.
- CHITNIS, V. et al. Practical limitations of disinfection of body fluid spills with 10,000 ppm sodium hypochlorite (NaOCl). **Am. J. Infect. Control.**, v. 32, n. 5, p. 306-8, 2004.
- COOK, N; KNIGHT, A; RICHARDS, GP. Persistence and elimination of human norovirus in food and on food contact surfaces: a critical review. **J. Food Prot.**, v. 79, n. 7, p. 1273-94.
- COOPER, J. et al. Efficacy of an automated ultraviolet C device in a shared hospital Bathroom. **Am. J. Infect. Control.**, v. 44, n. 12, p. 1692-94, 2016.
- CROMEANS, T. et al. Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 80, n.18, p.5743-51, 2014.
- DANCER, S. J. Controlling Hospital-Acquired Infection: Focus on the Role of the Environment and New Technologies for Decontamination. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 27, n. 4, p. 665-90, 2014.
- DANCER, S. J. Dos and don'ts for hospital cleaning. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 29, n. 4, p. 415-23, 2016.
- DANCER, S. J. Floor wars: the battle for 'clean' surfaces. **J. Hosp. Infect.**, v. 84, n. 4, p. 339-40, 2013.
- DANCER, S. J. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. **J. Hosp. Infect.**, v. 73, n. 4, p. 378-385, 2009.
- DISKIN, A.L.; CARO, G.M.; DAHL, E. Acute gastroenteritis and video camera surveillance: a cruise ship case report. **Int. Marit. Health**, v.65, n.1, p.20-2, 2014.
- DOLAN, A. et al. Evaluation of different methods to recover meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* from hospital environmental surfaces. **J. Hosp. Infect.**, v. 79, n. 3, p. 227-30, 2011.
- DUIZER, E. et al. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. **J Gen Virol.**, v. 85, n. pt 1, p.79-87, 2004.
- ETTAYEBI, K. et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. **Science**, v. 353, p. 6306, p. 1387-93, 2016.
- GALVIN, J. et al. Patient shoe covers: Transferring bacteria from the floor onto surgical bedsheets. **Am. J. Infect. Control.**, v. 44, n. 11, p. 1417-19, 2016.
- GALVIN, P. et al. Microbial monitoring of the hospital environment: why and how? **J. Hosp. Infect.**, v. 82, n. 3, p. 143-51, 2012.

- GIRARD, M. et al. Attachment of Noroviruses to Stainless Steel and Their Inactivation, Using Household Disinfectants. **J. Food Prot.**, v. 73, n. 2, p. 400-04, 2010.
- GREEN, K. Y. et al. Taxonomy of the caliciviruses. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. S322-30, Suplemento 2, 2000.
- GREEN, K. Y. Norovirus infection in immunocompromised hosts. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, n. 8, p. 717-23, 2014.
- HEDIN, G.; RYNBACK, J.; LORÉ, B. New technique to take samples from environmental surfaces using flocked nylon swabs. **J. Hosp. Infect.**, v. 75, n. 4, p. 314-7, 2010.
- HEID, C. A. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, v. 6, n. 10, p. 986-94, 1996.
- HOBDAY, R. A.; DANCER, S. J. Roles of sunlight and natural ventilation for controlling infection: historical and current perspectives. **J. Hosp. Infect.**, v. 84, n. 4, p. 271-82, 2013.
- IBFELT, T. et al. Test and validation of methods to sample and detect human virus from environmental surfaces using norovirus as a model virus. **J. Hosp. Infect.**, v. 92, n. 4, p. 378-84, 2016.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Núcleo de Doenças Entéricas. homepage. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/ial/centros-tecnicos/centro-de-virologia/nucleoslaboratorios/nucleo-de-doencas-entericas>. Acesso em: 03 jul. 2017.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. PME-NDE-033. Extração de RNA de amostras biológicas kit QIAamp Viral Mini kit. 2005.
- INVITROGEN. User Guide. Superscript®III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System. Life Technologies, 2015.
- ISO Technical Specification. ISO/TS 15216-2:2013. Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR. Part 2: Method for qualitative detection. Geneva, 2013
- KAGEYAMA, T. et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time Quantitative Reverse Transcription PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 1548-57, 2003.
- KARST, S. M. et al. Advances in norovirus biology. **Cell Host Microbe**, v. 15, n. 6, p. 668-80, 2014.
- KOGANTI, S. et al. Evaluation of Hospital Floors as a Potential Source of Pathogen Dissemination Using a Nonpathogenic Virus as a Surrogate Marker. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 37, n. 11, p. 1374-77.

LE GUYADER, F. S. et al. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 3, p. 618-24, 2009.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION. Real time PCR handbook. 2014. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019861-Update-qPCR-Handbook-branding-Americas-FLR.pdf> . Acesso em: 02 jul. 2017.

LORENZI, S. et al. Biocide activity of microfiber mops with and without silver after contamination. *Braz. J. Infec. Dis.*, v. 15, n. 3, p. 200-03, 2011.

LOPEZ, G.U. et al. Transfer efficiency of bacteria and viruses from porous and nonporous fomites to fingers under different relative humidity conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, n.18, p. 5728-34, 2013.

MACCANNELL, T. et al. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION HEALTHCARE INFECTION CONTROL PRACTICES ADVISORY COMMITTEE-HICPAC. Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. Atlanta, 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/norovirus/Norovirus-Guideline-2011.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2015.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Overview of viruses and virology. In: _____ **Brock biology of microorganisms**. San Francisco: Pearson, 2009. p. 251-277.

MAHIDA, N.; BOSWELL, T. Non-slip socks: a potential reservoir for transmitting multidrug-resistant organisms in hospitals? **J. Hosp. Infect.**, v. 94, n. 3, p. 273-75, 2016.

MAILLARD, J. Y. Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems. **Ther. Clin. Risk. Manag.**, v. 1, n. 4, p. 307-20, 2005.

MAILLARD, J. Y.; SATTAR, S. A.; PINTO, F. Virucidal activity of microbicides. In: FRAISE, A. P.; MAILLARD, J. Y.; SATTAR S. A. Russel, Hugo e Ayliffe's: principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. West Sussex: Brackweel Publishing, 2013. p. 178-207.

MARKS, P. J. et al. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. **Epidemiol. Infect.**, v. 131, n. 1, p. 727-36, 2003.

MARKS, P. J. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. **Epidemiol. Infect.**, v. 124, n. 3, p. 481-7, 2000.

MCCORD, J. et al. Reduction in *Clostridium difficile* infection associated with the introduction of hydrogen peroxide vapour automated room disinfection. **J. Hosp. Infect.**, v. 94, n. 2, p. 185-7, 2016.

- MCDONNELL, G. E. Mechanisms of action. In: ____ Antisepsis, disinfection, and sterilization: types, action, and resistance. Washington: ASM Press. 2007. c.7, p. 217-52.
- MENEZES, F. G. et al. Surto de infecção por norovírus em instituição de longa permanência no Brasil. *Einstein*. v.8, n. 4 Pt 1, p. 410-3, 2010.
- MOORMAN, E.; MONTAZERI, N.; JAYKUS, A. Efficacy of neutral electrolyzed water for inactivation of human norovirus. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 83, n. 16, p. 1-11, 2017.
- MORAWSKA, L. Droplet fate in indoor environments, or can we prevent the spread of infection? **Indoor Air**, v.16, n.5, p.335–347, 2006.
- MORILLO, S. G. et al. Norovirus GII.Pe Genotype: Tracking a Foodborne Outbreak on a Cruise Ship Through Molecular Epidemiology, Brazil, 2014. *Food Environ. Virol.*, v. 9, n. 2, p. 142-48, 2017.
- MORILLO, S. G.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Norovírus: uma visão geral. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 57, n. 4, p. 462-467, 2011.
- MORILLO, S.G. et al. Rapid detection of norovirus in naturally contaminated food: foodborne gastroenteritis outbreak on a cruise ship in Brazil, 2010. **Food Environ. Virol.**, v.4, n.3, p. 124-9, 2012.
- MUNFORD, V. et al. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 9: Infecções Virais. *Capítulo 2: Vírus de Transmissão Fecal-Oral*. Brasília: ANVISA, 2013. Disponível em: https://spdbcfmusp.files.wordpress.com/2014/09/iras_moduloinfeccoesvirais.pdf. Acesso em: 01 jul. 2017.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. In: _____. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 40-57, 457-85.
- NANTE, N. et al. [Effectiveness of ATP bioluminescence to assess hospital cleaning: a review](#). *J. Prev. Med. Hyg.* V. 58, n. 2, p: E177-E183, 2017.
- NENONEN, N. P. et al. Norovirus GII.4 detection in environmental samples from patient rooms during nosocomial outbreaks. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52, n. 7, p. 2352-8, 2014.
- NERANDZIC, M. M. et al. Evaluation of an automated ultravioleta radiation device for decontamination of *Clostridium difficile* and other healthcare-associated pathogens in hospital rooms. **BMC Infect. Dis.**, v.10, n. 197, p. 1-8, 2010.
- NIGHTINGALE, F. **Notes on Nursing: What it is, and what it is not**. New York: Appleton and Company, 1865.

NUNES, R. A. L. **Aplicação de técnicas moleculares no diagnóstico laboratorial complementar das infecções virais do sistema nervoso central no Hospital Universitário da USP**. 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OTTER, J.A.; YEZLI, S.; FRENCH, G.L. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 32, n. 7, p. 687-99, 2011.

PARK, G.W. et al. Evaluation of a New Environmental Sampling Protocol for Detection of Human Norovirus on Inanimate Surfaces. **Appl Environ Microbiol.**, v. 81, n. 17, p. 5987-92, 2015.

PATON, S. et al. Reaerosolization of spores from flooring surfaces to assess the risk of dissemination and transmission of infections. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 81, n. 15, p. 4914-9, 2015.

PETRIGNANI, M. Norovirus introduction routes into nursing homes and risk factors for spread: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **J. Hosp. Infect.**, v. 89, n. 3, p. 163-78, 2015.

POLKOWSKA, A. et al. Outbreak of gastroenteritis caused by norovirus GII.4 Sydney variant after a wedding reception at a resort/activity centre, Finland, August 2012. **Epidemiol. Infect.**, v. 142, n. 9, p. 1877-83, 2014.

PREFEITURA MUNICIPAL DE SÃO PAULO. Secretaria municipal da saúde. Coordenação de vigilância em saúde. Boletim DTA. Vigilância Epidemiológicas de Doenças Transmitidas por Alimentos. São Paulo. Disponível em: http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/vigilancia_em_saude/index.php?p=211842. Acesso em: 01 mar. 2017.

PRICE, E. H.; AYLIFFE, G. Hot hospitals and what happened to wash, rinse and dry? Recent changes to cleaning, disinfection and environmental ventilation. **J. Hosp. Infect.**, v. 69, n. 1, p. 89-91.

QIAGEN. QIAamp® Viral RNA Mini Handbook. Fourth Edition. Qiagen, 2014. Disponível em: <https://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=em>. Acesso em: 02 jun. 2017.

QIAN, H. et al. Dispersion of exhaled droplet nuclei in a two-bed hospital ward with three different ventilation systems. **Indoor Air**, v. 16, n. 2, p. 111-28, 2006.

RASHID, T. et al. Shoe soles as a potential vector for pathogen transmission: a systematic review. **J. Appl. Microbiol.**, v. 121, n. 5, p. 1223-31, 2016

RAY, A. J. et al. A multicenter randomized trial to determine the effect of an environmental disinfection intervention on the incidence of healthcare-associated *Clostridium difficile* infection. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 38, n. 7, p. 777-83, 2017.

- REEP, K. K.; KEENE, W. E. A point-source norovirus outbreak caused by exposure to fomites. *J. Infect. Dis.* v. 205, n. 11, p. 1639-41, 2012.
- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, n. 4, p. 786-814, 2012.
- RÖNNQVIST, M. et al. Ultraviolet Light Inactivation of Murine Norovirus and Human Norovirus GII: PCR May Overestimate the Persistence of Noroviruses Even When Combined with Pre-PCR Treatments. **Food Environ Virol.**, v. 6, n. 1, p. 48-57, 2014.
- RÖNNQVIST, M.; RÄTTÖ, M.; TUOMINEN, P.; SALO, S.; MAUNULA L. Swabs as a tool for monitoring the presence of norovirus on environmental surfaces in the food industry. **J. Food Prot.**, v. 76, n. 8, p. 1421-8, 2013.
- SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. Viroses entéricas. In: SANTOS, N. S. O, SOARES, C. C. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 147-76
- SATTAR, S. A. et al. Disinfectant wipes are appropriate to control microbial bioburden from surfaces: use of a new ASTM standard test protocol to demonstrate efficacy. **J. Hosp. Infect.**, v. 91, n. 4, p. 319-25, 2015.
- SEHULSTER, L. M. et al. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations from CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Chicago: American Society for Healthcare Engineering / American Hospital Association, 2004. Disponível em: www.cdc.gov/ncidod/hip/enviro/guide.htm. Acesso em: 25 fev. 2015.
- SUTTON, S.V.W. Neutralizer evaluations as control experiments for antimicrobial efficacy tests. In: ASCENZI, J.M. **Handbook of disinfectants and antiseptics**. New York: Marcel Dekker. 1996.
- TAKANASHI, S et al. Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures. **Arch. Virol.**, v. 159, n. 2, p. 257-66, 2014.
- TANG, J.W. et al. Factors involved in the aerosol transmission of infection and control of ventilation in healthcare premises. **J. Hosp. Infect.**, v. 64, n. 2, p.100-14, 2006.
- TEUNIS, P. F. et al. Norwalk virus: how infectious is it? **J. Med. Virol.**, v. 80, n. 8, p. 1468-76, 2008.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). The United States pharmacopeia 39. The national formulary 34. (USP 39-NF 34). Microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration tests. c. 61. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention. 2016

- TRUJILLO, A. A. et al. Use of TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR for Rapid Detection, Quantification, and Typing of Norovirus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 4, p. 1405-12, 2006.
- TULADHAR, E. et al. Residual viral and bacterial contamination of surfaces after cleaning and disinfection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 21, p. 7769-75, 2012.
- TUNG-THOMPSON, G. et al. Persistence of Human Norovirus RT-qPCR Signals in Simulated Gastric Fluid. **Food. Environ. Virol.**, v. 7, n. 1, p. 32-40, 2015.
- TUNG, G. et al. Efficacy of commonly used disinfectants for inactivation of human noroviruses and their surrogates. **J. Food Prot.**, v. 76, n. 7, p. 1210-7, 2013.
- VERANI, M.; BIGAZZI, R.; CARDUCCI, A. Viral contamination of aerosol and surfaces through toilet use in health care and other settings. **Am. J. Infect. Control.**, v. 42, n. 7, p. 758-62, 2014.
- VERREAULT, D.; MOINEAU, S.; DUCHAINE, C. Methods for sampling of airborne viruses. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 72, n. 3, p. 413-44, 2008.
- VERSTRAETEN, T. et al. Modelling Estimates of Norovirus Disease in Patients with Chronic Medical Conditions. **Plos One**, v. 11, n. 7, p. e0158822, 2016.
- WEBER, D. J. et al. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. **Am. J. Infect. Control.**, v. 38, p. S25-33, 2010.
- WEBER, D. J.; ANDERSON, D.; RUTALA, W. A. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 26, n. 4, p. 338 – 344, 2013.
- WEBER, D. J.; KANAMORI, H.; RUTALA, W. A. 'No touch' technologies for environmental decontamination: focus on ultraviolet devices and hydrogen peroxide systems. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 29, n. 4, p. 424-31, 2016.
- WIKSWO, M.E. et al. Outbreaks of Acute Gastroenteritis Transmitted by Person-to-Person Contact, Environmental Contamination, and Unknown Modes of Transmission--United States, 2009-2013. **MMWR. Surveill. Summ.**, v. 64, n. 12, p. 1-16, 2015.
- YAZGI, H.; UYANIK, M. H.; AYYILDIZ, A. Comparison of Slime-producing Coagulase-negative Staphylococcus Colonization Rates on Vinyl and Ceramic Tile Flooring Materials. **J Int Med Res.**, v. 37, n. 3, p. 668-73, 2009.
- YEARGIN, T. et al. Recovery and Disinfection of Two Human Norovirus Surrogates, Feline Calicivirus and Murine Norovirus, from Hard Nonporous and Soft Porous Surfaces. **J. Food Prot.**, v. 78, n. 10, p. 1842-50, 2015.

YOO, J. E. Evaluation of Various Real-Time Reverse Transcription Quantitative PCR Assays for Norovirus Detection. **J. Microbiol. Technolo.**, v. 27, n. 4, p. 816-24, 2017.

ZARPELLON, M. N. et al. Survival of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus on hospital surfaces. **J. Hosp. Infec.**, v. 90, n. 4, p. 347-50, 2015.

ZHENG, D. P et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**, v. 346, n. 2, p. 312-23, 2006.

Apêndices

APÊNDICE A – PROTOCOLO PARA VALIDAÇÃO DO AGENTE NEUTRALIZANTE

Materiais

- EPI: avental, luvas, gorro e máscara N95
- Placa de granito 30x40 cm
- Contaminante: 250ml de solução tampão fosfato acrescida de amostras fecais positivas para Norovírus GII após RT-PCR Real Time
- Solução tampão para manter *swab* embebidos (Volume: 300ml)
- *Swab* de algodão estéril
- Papel absorvente
- Detergente neutro
- Hipoclorito 1% + Borrifador
- Material absorvente descartável para limpeza
- Becker com água de torneira para solução de detergente
- Becker com água de torneira para enxague.
- Tubo do tipo eppendorf
- Caixa com gelo para armazenamento dos tubos do tipo eppendorf e conservação das amostras
- Becker para diluição do tiosulfato (2)
- Becker para solução contaminante
- Becker com água de torneira para solução de detergente
- Becker com água de torneira para enxague.
- Saco para descarte
- Fita para teste de concentração do hipoclorito de sódio
- Pinça para retirada da ponta do *swab* dos tubos
- Tesoura para cortar a ponta do *swab*
- Pipeta e ponteiras (P1000)
- Tiosulfato de sódio
- Cronômetro

Pré-procedimento (Na câmara asséptica para evitar contaminação do ambiente e, conseqüentemente, contaminação das amostras):

- Alíquotar solução tampão fosfato nos tubos onde serão armazenados os *swab*
- Eluir o neutralizante nas diferentes concentrações nos tubos eppendorf

Experimento 1

- 1) Os pesquisadores deverão estar paramentados de avental de mangas longas, luvas, gorro e máscara N95.
- 2) Preparar o contaminante em uma câmara asséptica diferente de onde será realizada a eluição das soluções e contaminação das placas.
- 3) Dissolver o tiosulfato de sódio, conforme orientações do fabricante: 24,8g em 100ml de água destilada, obtendo assim a concentração 1N;

- 4) Realizar a diluição seriada da solução neutralizante da seguinte maneira: Aspirar 10ml da solução 1N e diluir em 90ml de água destilada, obtendo a concentração 0,1N;
- 5) Realizar outro ponto da diluição seriada da solução neutralizante da seguinte maneira: Aspirar 10ml da solução 0,1N e diluir em 90ml de água destilada, obtendo a concentração 0,01N;
- 6) Identificar todos os frascos;
- 7) Aliquotar 500 μ l do hipoclorito de sódio 1% em 12 tubos
- 8) Aliquotar 390 μ l da solução neutralizante 1N nos três primeiros tubos. Identificar as amostras: 1N/1, 1N/2, 1N/3;
- 9) Aliquotar 390 μ l da solução neutralizante 0,1N em três tubos subsequentes. Identificar as amostras: 0,1N/1, 0,1N/2, 0,1N/3;
- 10) Aliquotar 390 μ l da solução neutralizante 0,01N em três tubos subsequentes. Identificar as amostras: 0,01N/1, 0,01N/2, 0,01N/3;
- 11) Ao invés da solução neutralizante, aliquotar 390 μ l da PBS em três tubos subsequentes. Identificar as amostras: $\emptyset$ N/1, $\emptyset$ N/2, $\emptyset$ N/3;
- 12) Aliquotar 390 μ l do agente neutralizante e 500 μ l de PBS em três tubos, sem a presença de desinfetante. Identificar as amostras: $\emptyset$ D/1, $\emptyset$ D/2, $\emptyset$ D/3;
- 13) Pipetar 1000 μ l da solução contaminante em todos os tubos. Total: 15.
- 14) Pipetar 1ml da solução contaminante em três novos tubos. Identificar as amostras: CTL+/1; CTL+/2; CTL+/3;
- 15) Em todos os tubos, realizar a homogeneização das soluções dando um vortex por 10s;
- 16) Retirar 400 μ l da solução final de cada tubo para análise por meio do teste colorimétrico de concentração de hipoclorito de sódio tubos que contém a solução desinfetante e eluir em um novo tubo. Realizar o teste colocando a fita por 1s e registrar a concentração apresentada;
- 17) Centrifugar as amostras por 30 minutos a 5000 rpm;
- 18) Congelar as amostras a -70°C.

Experimento 2

- 19) As placas deverão ser previamente limpas e esterilizadas em autoclave (granito) a 135°C por quatro minutos.
- 20) Nos tubos já alíquotados com 1ml de PBS, realizar a eluição da solução neutralizante conforme descrito a seguir;
- 21) Aliquotar 390 μ l da solução neutralizante 1N nos dois primeiros tubos. Identificar as amostras: 1N/a, 1N/b;
- 22) Aliquotar 390 μ l da solução neutralizante 0,1N em dois tubos subsequentes. Identificar as amostras: 0,1N/a, 0,1N/b;
- 23) Aliquotar 390 μ l da solução neutralizante 0,01N em dois tubos subsequentes. Identificar as amostras: 0,01N/a, 0,01N/b;
- 24) Ao invés da solução neutralizante, aliquotar 390 μ l de PBS em três tubos subsequentes. Identificar as amostras: $\emptyset$ N/a, $\emptyset$ N/b;
- 25) Retirar a embalagem da placa na cabine de segurança biológica;
- 26) Dividir a placa em oito retângulos (10x15cm) ou duas placas em quatro retângulos (20x30cm), sendo a configuração do experimento a seguinte:

Placa de granito

Concentração do neutralizante 1 – (1N/a)	Concentração do neutralizante 2 – (0,1N/a)	Concentração do neutralizante 3 – (0,01N/a)	Sem neutralizante (ØN/a)
Concentração do neutralizante 1 – (1N/b)	Concentração do neutralizante 2 – (0,1N/b)	Concentração do neutralizante 3 – (0,01N/b)	Sem neutralizante (ØN/b)

- 27) Derramar o volume total do contaminante sobre a placa e deixar sobre a superfície por cinco minutos.
- 28) Realizar o procedimento de limpeza e desinfecção:
 - a) Remover o excesso do contaminante com papel absorvente e desprezar o mesmo;
 - b) Realizar o procedimento de desinfecção: Borrifar de hipoclorito de sódio 1% que cubra toda a área da placa, espalhar com um pano limpo.
- 29) IMEDIATAMENTE após a aplicação do hipoclorito, coletar as amostras com *swab* de algodão: friccionar o *swab* sobre toda a área a ser amostrada, realizando rotação do mesmo, em todos os sentidos da placa (diagonal, vertical e horizontal). A placa será dividida em três áreas retangulares, totalizando três amostras de cada placa. Manter o *swab* embebido em 1ml de solução tampão fosfato eluído em um tubo do tipo eppendorf para transporte. Manter o tubo com a ponta do *swab* em caixa com gelo para conservação das amostras.
- 30) Identificar as amostras conforme o desenho esquemático da placa;
- 31) Retirar 400µl da solução final de cada tubo para análise por meio do teste colorimétrico de concentração de hipoclorito de sódio tubos que contém a solução desinfetante e eluir em um novo tubo. Realizar o teste colocando a fita por 1s e registrar a concentração apresentada;
- 32) Embalar as placas com saco para resíduo biológico para descontaminação final.
- 33) Após todas as coletas, homogeneizar o tubo com as pontas do *swab* (vortex – 60 rpm por 30s). Retirar a ponta do *swab*, em câmara asséptica;
- 34) Centrifugar as amostras por 30 minutos a 5000 rpm.
- 35) Congelar as amostras a -70°C.

APÊNDICE B – PROTOCOLO PARA VALIDAÇÃO DA COLETA DE AR

Materiais:

- Placa de granito 30x40 cm esterilizada
- Água deionizada e purificada para diluição da solução tampão-fosfato (1000ml=750ml para solução contaminante e 250ml para amostras)
- Amostras fecais positivas para NoVGII para preparo da solução contaminante.
- Tubo do tipo eppendorf (para armazenamento dos swabs e eluição das amostras)
- Caixa com gelo para armazenamento dos tubos do tipo eppendorf e conservação das amostras
- Suporte para coletador (?)
- Becker para solução contaminante
- Becker com água de torneira para solução de detergente
- Becker com água de torneira para enxague.
- Vortex
- Saco para descarte
- Descarte para perfurocortante
- EPI: avental, luvas, gorro e máscara N95
- *Swab* de algodão estéril
- Papel absorvente
- Detergente neutro
- Hipoclorito 1% + Borrifador
- Fita para teste de concentração do hipoclorito de sódio
- Material absorvente descartável para limpeza
- Pano descartável para limpeza
- Pinça para retirada da ponta do *swab* dos tubos
- Tesoura para cortar a ponta do *swab*
- Cronômetro
- Surface UV
- Termohigrômetro (?)
- Cilindro
- Trena
- Estabilizador de energia
- Concentrador de amostra
- Pipeta e ponteiras (P1000)
- Coriolis + cones
- Adaptador de tomada

Pré-procedimento (Na câmara asséptica para evitar contaminação do ambiente e, conseqüentemente, contaminação das amostras):

- Diluir a solução tampão fosfato.

- Aliquotar solução tampão fosfato nos tubos onde serão armazenados os *swab* e nos cones para coleta de amostra de ar.
- Preparar a solução contaminante em câmara asséptica

Procedimento:

- 1) Os pesquisadores deverão estar paramentados de avental de mangas longas, luvas, gorro e máscara N95.
- 2) Preparar a solução contaminante em uma câmara asséptica.
- 3) Manter a porta fechada durante todo o procedimento.
- 4) A placa deverá ser previamente limpa e esterilizada em autoclave (granito) a 135°C por quatro minutos.
- 5) Coletar a primeira amostra para controle positivo, pipetando 1ml da solução contaminante diretamente do frasco com o líquido. Identificar a amostra: **CTL+**.
- 6) Coletar a primeira amostra do ar: com auxílio de um suporte para apoio, posicionar o coletador de ar na abertura D (altura=111cm), de modo que apenas o bocal de entrada de ar fique dentro do cilindro. Após montar o coletador, ligue-o a um estabilizador de energia. Ajustar o equipamento de modo que funcione nos seguintes parâmetros: taxa de fluxo de ar de 300L/min e tempo de coleta de 10 minutos.
- 7) Iniciar a coleta. Após finalizado o período de coleta, pipetar 1 ml do líquido contido no cone e armazenar em um tubo eppendorf. Identificar a amostra: **CTL- 1**.
- 8) Derramar, através da abertura E (142cm), 250ml da solução contaminante sobre a placa e deixar sobre a superfície por cinco minutos.
- 9) Coletar a amostra de ar, em triplicata; conforme descrito anteriormente, posicionando o coletador através da abertura B (altura=51cm). Identificar a amostra: **A/2.1; A/2.2; A/2.3**
- 10) Abrir as extremidades inferior e superior do cilindro, para permitir entrada de ar e saída no interior do mesmo;
- 11) Repetir o passo 8.
- 12) Coletar a amostra de ar, conforme descrito anteriormente, posicionando o coletador através da abertura E (altura=142cm). Identificar a amostra: **A/5.1; A5.2; A/5.3**
- 13) Pipetar 4ml do cone da amostra obtida da abertura E e colocar no concentrador de amostra.
- 14) Abrir as extremidades inferior e superior do cilindro, para permitir entrada de ar e saída no interior do mesmo;
- 15) Repetir o passo 8
- 16) Realizar o procedimento de limpeza da superfície:
- 17) Após todas as coletas, homogeneizar os tubos com as pontas do *swab* (vortex – 60 rpm por 30s). Retirar a ponta do *swab* com auxílio de pinça estéril, em câmara asséptica, começando pelo controle negativo para evitar contaminação cruzada.
- 18) Centrifugar a amostra contida no concentrador de amostra (Centrífuga do setor de hepatites)
- 19) Centrifugar todas as amostras obtidas por 30 minutos a 5000 rpm. Congelar as amostras a -70°C.
- 20) Embalar a placas com saco para resíduo biológico para descontaminação final.

- 21) Na sala onde foi realizado o experimento, desmontar e lavar o cilindro com água e detergente, borrifar hipoclorito de sódio, deixando-o agir por 10min.
- 22) Desinfetar superfícies (bancada, maçanetas, interruptores) também com hipoclorito de sódio.
- 23) Após término do experimento, permitir que a sala fechada permaneça com a lâmpada UV ligada por 30min (deixar o cilindro no interior da sala).

APÊNDICE C – PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS

Pré-procedimento (Na câmara asséptica para evitar contaminação do ambiente e, conseqüentemente, contaminação das amostras):

- Diluir a solução tampão fosfato.
- Alíquotar solução tampão fosfato nos tubos onde serão armazenados os *swab* e nos cones para coleta de amostra de ar.
- Preparar a solução contaminante em câmara asséptica
- Preparar a solução neutralizante: Dissolver o tiosulfato de sódio, conforme orientações do fabricante: 12,4g em 50ml de água destilada, obtendo assim a concentração 1N

Procedimento:

- 1) Os pesquisadores deverão estar paramentados de avental de mangas longas, luvas, gorro e máscara N95.
- 2) Manter a porta fechada durante todo o procedimento.
- 3) A placa deverá ser previamente limpa e desinfetada: Lavar a placa e aplicar o hipoclorito 1%, permitindo que ele haja por 10 minutos. Enxaguar com água destilada esterilizada (1000ml)
- 4) Coletar a primeira amostra do ar: com auxílio de um suporte para apoio, posicionar o coletador de ar na altura=150cm). Após montar o coletador, ligue-o a um estabilizador de energia. Ajustar o equipamento de modo que funcione nos seguintes parâmetros: taxa de fluxo de ar de 300L/min e tempo de coleta de 10 minutos.
- 5) Iniciar a coleta. Após finalizado o período de coleta, identificar a amostra: **A/CTL-1.**
- 6) Coletar a amostra da superfície: friccionar o *swab* sobre toda a área a ser amostrada, realizando rotação do mesmo, em todos os sentidos da placa (diagonal, vertical e horizontal). Manter o *swab* embebido em 1ml de solução tampão fosfato eluído em um tubo eppendorf. Manter o tubo com a ponta do *swab* em caixa com gelo para conservação das amostras. Identificar a amostra: **S/CTL-2.**
- 7) Coletar a primeira amostra para controle positivo, pipetando 1ml da solução contaminante diretamente do frasco com o líquido. Identificar a amostra: **NDE/CTL+.**
- 8) Derramar 500ml da solução contaminante diretamente sobre a placa, na altura zero.
- 9) Logo após o derramamento, já iniciar a coleta da amostra de ar, conforme descrito anteriormente, posicionando o coletador na altura 150cm. Identificar a amostra: **A/CTL+**
- 10) Depois que a solução contaminante tiver sido derramada, coletar a segunda amostra da superfície, com *swab*, da mesma forma descrita anteriormente. Identificar a amostra: **S/CTL+ 2.**
- 11) Coletar a segunda amostra do ar, conforme descrito nos passos 4 e 5. Identificar a amostra: **A/CTL+1**
- 12) Coletar a segunda amostra da superfície, com *swab*, conforme descrito no passo 6. Identificar a amostra: **S/CTL+ 2.**

- 13) Realizar o procedimento de limpeza da superfície:
- 14) Remover o excesso do contaminante com papel absorvente e desprezar o mesmo;
- 15) Preparar solução de detergente neutro (10 mL de detergente e 100ml de água). Derramar sobre a placa, limpando a mesma com o MOP, realizando movimentos em oito;
- 16) Torcer o MOP conforme orientações do fabricante, desprezando o líquido no saco para descarte de contaminantes. Enxaguar a placa e absorver a água residual com o MOP. Repetir o procedimento
- 17) Coletar as amostras do ar em triplicata, conforme descrito nos passos 4 e 5. Identificar a amostra: **A/L1; AL2; A/L3**
- 18) Coletar a segunda amostra da superfície, com *swab*, conforme descrito no passo 6. Identificar a amostra: **S/L1; S/L2; SL3**
- 19) Realizar o procedimento de desinfecção 1: Realizar avaliação da concentração do hipoclorito com fita de teste colorimétrico. Borrifar hipoclorito de sódio 1% que cubra toda a área da placa, espalhar com um pano limpo e deixar agir por 10 minutos.
- 20) Coletar as amostras do ar em triplicata, conforme descrito nos passos 4 e 5. Identificar a amostra: **A/DH1; A/DH2; A/DH3**
- 21) Coletar a quarta amostra da superfície, com *swab*, conforme descrito no passo 6. Identificar a amostra: **S/DH1; S/DH2; S/DH3**
- 22) No tubo da amostra S/DH, eluir 195µl da solução neutralizante 1N imediatamente após posicionar o *swab*;
- 23) Em outra placa esterilizada, após realizar os passos de 1 a 20, implementar a desinfecção 2: Aplicar o UV com o dispositivo Surface UV®, seguindo as orientações do fabricante. Não tocar na superfície, manter a uma distância de aproximadamente 1cm da mesma, realizar movimentos verticais (ida e volta) durante cinco minutos;
- 24) Coletar a quarta amostra do ar, conforme descrito nos passos 4 e 5. Identificar a amostra: **A/DU1; A/DU2; A/DU3**
- 25) Coletar a quarta amostra da superfície, com *swab*, conforme descrito no passo 6. Identificar a amostra: **S/DU1; S/DU2; S/DU3**
- 26) Para as coletas de amostras de superfícies, manter o *swab* embebido em PBS por 30 minutos, homogeneizar os tubos com as pontas do *swab* (vortex por 20s). Retirar a ponta do *swab* com auxílio de pinça estéril, começando pelo controle negativo para evitar contaminação cruzada.
- 27) Transferir 12 ml de todas as amostras contidas no cone nos tubos de concentradores de amostra, em câmara asséptica, e centrifugar por 2min, a 4000rpm.
- 28) Centrifugar todas as amostras obtidas por 30 minutos a 5000 rpm. Congelar as amostras a -70°C.
- 29) Desinfetar superfícies (bancada, maçanetas, interruptores) também com hipoclorito de sódio.
- 30) Após término do experimento, permitir que a sala fechada permaneça com a lâmpada UV ligada por pelo menos 30min.

APÊNDICES

APÊNDICE D – RESULTADOS DAS COLETAS DE DADOS

PISO

Tratamento	Coleta 1/3										Coleta 2/3										Coleta 3/3														
Granito + UV 5'	Data da coleta/extração 10.05/11.05										17.05/18.05										24.05/29.05														
	Controle negativo					Indeterm					Indeterm					Indeterm					Indeterm					Indeterm									
	Controle positivo					20,41					22,65					22,52					24,59					24,39									
	Controle positivo NDE					21,74					21,72					21,58					20,97					23,51					23,59				
	Amostra					S1					S2					S3					S1					S2					S3				
	Limpeza					36,76 35,91 36,27 35,5 35 35,38					34,44 34,76 35,85 34,72 34,76 34,91					Indeterm 39,27 40,44					Indeterm Indeterm Indeterm														
	Desinfecção					39,36 39,86 41,27 41,4 41,8 41,17					37,08 36,4 38,51 37,77 34,47 34,05					Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm																			
ranito + Hipoclorito	Data da coleta/extração 15.05/16.05										22.05/23.05										25.05/29.05														
	Controle negativo					Indeterm					Indeterm					Indeterm					Indeterm					Indeterm									
	Controle positivo					22,62					22,83					23,17					23,29					24,26					24,48				
	Controle positivo NDE					17,96					18,1					29,31					29,03					22,21					22,29				
	Amostra					S1					S2					S3					S1					S2					S3				
	Limpeza					Indeterm 41,88 42,07 41,61 Indeterm 41,81					37,19 35,29 36,78 35,01 35,61 35,91					Indeterm Indeterm 42,03 40,09 Indeterm Indeterm																			
	Desinfecção					Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm					Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm					Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm																			
Vinil + UV 5'	Data da coleta/extração 15.05/16.05										24.05/26.05										25.05 / 30.05														
	Controle negativo					Indeterm					5,92					Indeterm					Indeterm					Indeterm									
	Controle positivo					24,24					24,11					23,78					24,18					20,51					20,75				
	Controle positivo NDE					19,9					19,35					24,13					23,33					19,56					19,72				
	Amostra					S1					S2					S3					S1					S2					S3				
	Limpeza					31,48 31,54 28,88 28,73 28,95 29,5					40,14 Indeterm 41,46 Indeterm 41,57 40,28					37,86 37 36,13 36,22 38,74 37,06																			
	Desinfecção					39,44 39,1 41,05 38,88 38,98 40,24					Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm					Indeterm 41,67 41,8 42,03 Indeterm Indeterm																			
Vinil+ Hipoclorito	Data da coleta/extração 17.05/18.05										22.05/23.05										25.05 / 29.05														
	Controle negativo					Indeterm					Indeterm					Indeterm					Indeterm					Indeterm									
	Controle positivo					31,76					31,76					23,73					24,38					20,82					20,8				
	Controle positivo NDE					21,9					21,94					23,33					23,06					20,94					20,74				
	Amostra					S1					S2					S3					S1					S2					S3				
	Limpeza					32,94 32,95 37,93 36,8 38,71 36,5					39,36 Indeterm 38,3 38,29 39,79 39,46					38,92 37,56 38,59 40,13 37,76 38,71																			
	Desinfecção					Indeterm Indeterm Indeterm 42,11 Indeterm Indeterm Indeterm					Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm Indeterm																								

AR

Tratamento	Coleta 1/3						Coleta 2/3						Coleta 3/3					
Granito + UV 5'	Data da coleta						Data da coleta						Data da coleta					
	10/05/17						17.05/18.05						24.05/29.05					
	Indeterm			42,02			Indeterm			Indeterm			Indeterm			Indeterm		
	37,98			38,79			Indeterm			40,92			Indeterm			Indeterm		
	A1		A2		A3		A1		A2		A3		A1		A2		A3	
	37,24	36,36	31,59	31,55	38,06	37,23	41,51	39,59	Indeterm	Indeterm	Indeterm	39,66	38,62	38,61	39,87	40,88	41,14	40,55
Granito + Hipoclorito	Data da coleta						Data da coleta						Data da coleta					
	15.05/16.05						22.05/23.05						25.05/29.05					
	Indeterm			Indeterm			Indeterm			Indeterm			40,84			Indeterm		
	41,59			41,48			Indeterm			Indeterm			Indeterm			41,87		
	A1		A2		A3		A1		A2		A3		A1		A2		A3	
	37,06	37,46	37,17	38,07	Indeterm	Indeterm	35,71	34,9	35,92	35,1	37,66	37,56	37,79	36,91	40,69	40,51	Indeterm	39,87
Vinil + UV 5'	Data da coleta						Data da coleta						Data da coleta					
	15.05/16.05						24.05/26.05						25.05/30.05					
	Indeterm			Indeterm			Indeterm			Indeterm			Indeterm			Indeterm		
	41,72			41,39			Indeterm			Indeterm			Indeterm			41,77		
	A1		A2		A3		A1		A2		A3		A1		A2		A3	
	36,05	37,49	37,48	37,65	39,26	39,28	37,79	37,98	41,38	41,41	Indeterm	Indeterm	35,27	34,45	36,5	36,75	39,67	40,89
Vinil+ Hipoclorito	Data da coleta						Data da coleta						Data da coleta					
	17.05/18.05						22.05/23.05						25.05/29.05					
	Indeterm			Indeterm			40,59			42,1			Indeterm			Indeterm		
	Indeterm			Indeterm			Indeterm			42,02			44,38			40,65		
	A1		A2		A3		A1		A2		A3		A1		A2		A3	
	Indeterm	Indeterm	Indeterm	Indeterm	39,5	37,41	36,7	37,74	37,76	38,5	Indeterm	Indeterm	37,35	36,86	38,6	36,62	39,98	39,38
Desinfecção						Desinfecção						Desinfecção						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
40,91						39,86						40,35						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
39,87						39,87						39,87						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						
Indeterm						Indeterm						Indeterm						