

MONITORAMENTO AMBIENTAL DE NOROVÍRUS GII EM AMOSTRAS DE ESGOTO NÃO TRATADO

JENIFER SEVERO BERETTA¹; BRUNO ASCHIDAMINI PRANDI²; NICÓLE VERARDO DE MATTOS²; PAULO MICHEL ROEHE²; ANA CLÁUDIA FRANCO²; FABRÍCIO SOUZA CAMPOS³

¹*Centro Universitário Ritter dos Reis – jeniferberettas@gmail.com*

²*Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – aschidamini.b@gmail.com, nicolev.ufrgs@gmail.com, proehe@gmail.com, anafranco.ufrgs@gmail.com*

³*Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – camposvet@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a preservação do ambiente em que vivemos é um dos assuntos mais discutidos a nível mundial e entre os fatores ambientais que podem ocasionar uma série de doenças estão principalmente a poluição da água e a precariedade ou ausência de sistemas de saneamento e abastecimento de água. Segundo Surabhi Singh (2024), pelo menos 204 espécies de vírus que causam enfermidades em humanos podem ser encontradas no esgoto. Dentre elas, destacam-se os vírus entéricos, grupo de vírus que normalmente estão presentes no trato gastrointestinal, podendo causar doença ou infecção assintomática (WYN-JONES & SELWOOD, 2001).

Nesse grupo de vírus entéricos, está presente o Norovírus (NoV) que é o principal agente etiológico causador de surtos de gastroenterites agudas em todo o mundo, com uma taxa de infecção estimada em 685 milhões de casos a cada ano (GUO, 2022). O norovírus pertence à família *Caliciviridae* e ao gênero *Norovirus*, que contém seis genogrupos (GI a GVI), dos quais GI, GII e GIV infectam humanos, sendo GII o de maior importância epidemiológica por sua capacidade de causar surtos.

O NoV é altamente infeccioso e o período de incubação da doença varia de 24 a 48 horas, porém o indivíduo pode eliminar o vírus por semanas mesmo após a cura (MACCANNELL et al., 2011). Os sintomas agudos de febre, náuseas, vômitos, dor epigástrica e diarreia duram cerca de 2 a 5 dias (SIEBENGA et al., 2009). Considerando que as pessoas excretam o vírus nas fezes e que ele pode ser encontrado em efluentes não tratados, a vigilância de efluentes não tratados torna-se uma importante ferramenta epidemiológica.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo evidenciar a detecção de Norovírus GII em amostras de efluentes urbanos no Rio Grande do Sul para confirmar a presença ou a ausência do material genético viral em água de esgoto não tratado.

2. METODOLOGIA

O Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas de Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em conjunto com o Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) realizou a coleta de 22 amostras de Estações de Tratamento de Esgotos (ETE). As coletas foram realizadas na ETE

Guarani (Capão da Canoa), ETE Santa Rosa, ETE Samae Tega (Caxias do Sul), ETE Araucária (Passo Fundo) e ETE Serraria (Porto Alegre).

As amostras foram previamente concentradas por ultracentrifugação (GIRARDI et al., 2017). Resumidamente, as amostras de águas residuais (36 mL) foram centrifugadas a 110.000 x g a 4°C por 1 hora. Em seguida, o pellet foi ressuspensionado em 4 mL de tampão glicina 0,25 N pH 9,5, transferido para um tubo falcon de 15 mL e incubado por 30 minutos no gelo com agitação por vórtex a cada 5 minutos. Foram adicionados 4 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS 2X, pH 7,4), em seguida as amostras foram clarificadas a 3.000 x g por 20 minutos para remoção de partículas em suspensão.

Os sobrenadantes foram coletados e ultracentrifugados a 110.000 x g a 4°C por 1 hora. Em seguida, o pellet viral foi ressuspensionado em 500 µL de tampão PBS 1X, e as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até a extração de RNA. Foi realizada a extração de RNA através do Kit de Purificação de Ácido Nucleico Total Viral Maxwell e testes de RT-qPCR foram realizados utilizando os primers e sondas desenhadas para o gene NSP (Non-Structural Polyprotein) (KAGEYAMA, 2003).

A reação de RT-qPCR foi realizada com o kit AgPath One-Step RT-qPCR (Thermofisher), e as condições de termociclagem utilizadas foram: 15 minutos a 50 °C para a reação de transcrição reversa, pré-aquecimento a 95 °C por 10 minutos, seguido por 45 ciclos de amplificação de 15 segundos a 95 °C e 30 segundos a 55 °C. As amostras foram consideradas positivas quando o ciclo de quantificação (CQ) foi inferior a 40 ciclos, caso contrário, negativas (ou seja, sem detecção do RNA do Norovírus na amostra).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vinte e duas amostras de efluentes foram testadas por RT-qPCR para a detecção de Norovirus GII, sendo que 4 foram positivas e 19 negativas para a presença do RNA de Norovirus GII. As estações de tratamento de esgoto (ETE) que apresentaram amostras positivas foram a Araucária, Santa Maria e a Serraria. O RNA de Norovirus GII não foi detectado nas estações de tratamento Samae Tega, Santa Rosa e Guarani.

O valor do ciclo de quantificação (CQ) variou entre 33 e 37 o que indica uma baixa circulação viral nas regiões analisadas. Nenhum surto de Norovirus GII foi descrito nas regiões durante o período das coletas, o que está de acordo com os resultados observados. Isto demonstra que a técnica aplicada tem potencial como ferramenta de vigilância epidemiológica, visto que tem a capacidade de detectar baixas concentrações do RNA viral mesmo na ausência de surtos, podendo ser utilizada como uma ferramenta de alerta precoce para surtos.

4. CONCLUSÕES

Com base nestes resultados, nossos achados confirmam a presença do Norovírus GII nos efluentes urbanos em Passo Fundo, Santa Maria e Porto Alegre, destacando a importância da vigilância contínua e do monitoramento ambiental como ferramentas essenciais para a detecção precoce e controle de surtos de gastroenterite aguda.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GIRARDI, V.; DEMOLINER, M.; RIGOTTO, C.; SCHNEIDER, V.E.; PAESI, S.; SPILKI, F.R. Assessment of diversity of adenovirus DNA polymerase gene in recreational waters facilitated by ultracentrifugal concentration. **Journal of Water and Health** **16(1)**, 102-111. 2017.
- GUO, Y.; LI J.; O'BRIEN, J.; SIVAKUMAR M.; JIANG, G. Back-estimation of norovirus infections through wastewater-based epidemiology: A systematic review and parameter sensitivity. **Water Research**, 2022.
- KAGEYAMA, T.; KOJIMA S.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F.B.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 2003.
- MACCANELL T., UMSCHEID, C.A.; AGARWAL, R.K.; LEE, I.; KUNTZ, G.; STEVENSON, K.B. Guideline on the prevention and control of Norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. HICPAC Guideline. **Infection Control Hospital Epidemiology**, 2011.
- SIEBENGA, J.J.; VENNEMA, H.; ZHENG, D.; VINJE', J.; LEE, B.E.; PANG, X.; HO, E.C.M.; LIM, W.; CHOUDEKAR, A.; BROOR, S.; HALPERIN, T.; RASOOL, N.B.G.; HEWITT, J.; GREENING, G.E.; JIN, M.; DUAN, Z.; LUCERO, Y.; O'RYAN, M.; HOEHNE, M.; SCHREIER, E.; RATCLIFF, R.M.; WHITE, P.A.; IRITANI, N.; REUTER, G.; KOOPMANS, M. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of Norovirus GII.4 variants, 2001-2007. **Journal of Infectious Diseases**, 2009.
- SURABHI S.; AMINA I.A.; SUMAYYA A.; SHAIKHA A.; ASHRAF A.; GIOVANNI O.; MARIE A.C.; SAMARA, B.S.; GRZEGORZ B.; WAEL E. A narrative review of wastewater surveillance: pathogens of concern, applications, detection methods, and challenges. **Frontiers in Public Health**, 2024.
- WYN-JONES, A. P.; SELWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 945-962, 2001.