LUANA DE CÁSSIA UMEDA

**Métodos clássicos e moleculares para avaliação da qualidade
viroológica de lodo de esgoto e de água de reúso:
determinação da eficiência e limites de detecção**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

LUANA DE CÁSSIA UMEDA

Métodos clássicos e moleculares para avaliação da qualidade virológica de lodo de esgoto e de água de reúso: determinação da eficiência e limites de detecção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert.

Versão corrigida. Versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Umeda, Luana de Cássia.

Métodos clássicos e moleculares para avaliação da qualidade virológica de lodo de esgoto e de água de reúso: determinação da eficiência e limites de detecção / Luana de Cássia Umeda. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Virologia

Versão do título para o inglês: Standard and molecular methods for surveillance of human enteric viruses in sludge and reclaimed water: efficiency and detections limits.

1. Rotavírus 2. Adenovírus 3. Água de reúso 4. Lodo de esgoto
5. Metodologias determinação da eficiência e limites de detecção
6. Legislação I. Mehnert, Profa. Dra. Dolores Ursula II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB071/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luana de Cássia Umeda.

Título da Dissertação: Métodos clássicos e moleculares para avaliação da qualidade virológica de lodo de esgoto e de água de reúso: determinação da eficiência e limites de detecção.

Orientador(a): Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 348 referente ao projeto intitulado: "*Métodos clássicos e moleculares aplicados à detecção e quantificação de vírus no lodo e esgoto tratado: determinação da eficiência e limite de detecção*" sob a responsabilidade de Luana Cássia Umeda, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 17 de novembro de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, Regina e Sergio,
por todo amor, carinho, ajuda, apoio e incentivo nos estudos
e em todos os momentos da minha vida.

Aos meus familiares, amigos e namorado
por toda força, compreensão e apoio.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. Dolores Ursula Mehnert pela oportunidade, apoio, amizade e orientação.

À MSc. Telma Alves Monezi pela amizade, conselhos, apoio e orientação.

À Dr. Patrícia Garrafa pela amizade, conselhos e ajuda principalmente no início do projeto.

À MSc. Arianna Sassaroli pela amizade e apoio.

À Elizabeth Moura pelas conversas, amizade e apoio.

À Raphaela Almeida pelas conversas, amizade e ajuda.

Aos amigos e alunos que passaram e estão ainda no laboratório: Meire, Angelita e Elian.

À professora Dra, Charlotte Marianna Hársi, do Laboratório de Biologia Molecular de adenovírus, pela ajuda e por manter sempre a disposição seu laboratório.

As alunas do Laboratório da Prof. Dra Charlotte, Joselma e Juliana pela ajuda e amizade.

Aos professores Dr. Armando Moraes Ventura e Dr. Paolo Zanotto por permitir a utilização da estufa de cultura de células.

Ao Sr. José Gomes e Elaine de Fátima dos Santos do SAT pelo suporte técnico dado a este trabalho.

À Dra. Veridiana Munford pelo auxílio e amizade.

Ao Prof. Dr. Enrique Boccadio pelas conversas e amizade.

Ao Sr. Carlos Augusto pelo apoio e amizade.

À Eva, Renata, Valéria e Mônica, funcionárias da biblioteca pela paciência durante a fase final de elaboração da dissertação.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro a esta pesquisa e também pela bolsa de mestrado para execução desse trabalho.

*Para ser grande, sê inteiro. Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.*

Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

RESUMO

Umeda LC. Métodos clássicos e moleculares para avaliação da qualidade virológica de lodo de esgoto e de água de reúso: determinação da eficiência e limites de detecção [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Os vírus entéricos humanos são encontrados no esgoto e em subprodutos dos processos de tratamento. Recentemente vem sendo recomendados como indicadores de qualidade microbiológica em normas da legislação brasileira e também nas de outros países, mas ainda com parâmetros a definir. O objetivo do estudo é a avaliação e a comparação entre métodos clássicos e moleculares aplicados à detecção de vírus entéricos em amostras de água de reúso e de lodo, visando subsidiar a legislação brasileira. Ensaio de semeadura experimental de protótipos de rotavírus e de adenovírus foram realizados nas matrizes ambientais e os vírus detectados por métodos clássicos (cultivo celular e reação de imunoperoxidase) e moleculares (PCR/*nested*-PCR, RT-PCR e ICC-PCR), determinando-se os limites de detecção de cada método para cada matriz. A pesquisa de rotavírus e adenovírus presentes naturalmente em 25 amostras de água de reúso e em 25 de lodo possibilitou a comparação dos métodos propostos. O ICC-PCR mostrou ser o método mais factível a ser aplicado na área de saneamento.

Palavras-chave: Rotavírus. Adenovírus. Água de reúso. Lodo de esgoto. Metodologias. Legislação.

ABSTRACT

Umeda LC Standard and molecular methods for surveillance of human enteric viruses in sludge and reclaimed water: efficiency and detections limits [Masters thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Human enteric viruses are common contaminants of raw sewage and subproducts of sewage treatment processes. In recent years, those viruses were recommend as new microbiological indicators in different matrices in Brazilian legislation and others countries, although some questions should be elucidated. At present, the aim was to evaluate and compare the efficiencies of standard and molecular virological methods for detection of human enteric viruses in sludge and reclaimed water samples. Rotavirus and adenovirus were experimentally spiked in the proposed matrices and virus recovery and detection limits established for each method and matrice. Viruses naturally presented in 25 samples of sludge and 25 samples of reclaimed water were assayed by all methods and results evaluated and compared for statistical significance. From all methods evaluated, ICC-PCR showed to be the most suitable for virus surveillance in sludge and reclaimed water.

Keywords: Rotavirus. Adenovirus. Reclaimed water. Sludge. Methods. Legislation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Representação esquemática da estrutura de rotavírus (A e B).....	21
Figura 2- Representação esquemática da partícula de adenovírus.....	23
Figura 3- Células HEp-2 não infectadas (A) e infectadas com o protótipo viral HAdV-5 observados ao microscópio no quarto (B) e sétimo dia (C) pós-infecção. Aumento de 200x.....	58
Figura 4-Detecção de rotavírus em células MA-104 pela técnica de imunoperoxidase direta. (A) Células não infectadas, (B e C) células infectadas por rotavírus. Aumento de 400x.....	59
Figura 5-Resultados da cinética da infecção de adenovírus em células HEp-2 revelada por reação de imunoperoxidase direta. Células infectadas por 16h (A), 18h (B), 20h (C) e 22h (D) e células não infectadas (E). Aumento 200X.....	60
Figura 6-Determinação do limiar de detecção da técnica de PCR, utilizando o protótipo viral HAdV-5. Marcador de peso molecular: DNA <i>ladder</i> de 100 pb (L); Controle negativo(C-). Gel de agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídeo.....	62
Figura 7-Determinação do limiar de detecção da técnica de ICC-PCR utilizando o protótipo viral HAdV-5.Marcador de peso molecular DNA <i>ladder</i> de 100 pb (L).Gel de agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídeo.....	62
Figura 8-Determinação do limiar de detecção da técnica de RT-PCR e ICC-RT-PCR utilizando o protótipo viral SiRV-A/SA-11. Marcador de peso molecular DNA <i>ladder</i> de 100 pb (L); Controle negativo (C-); Controle positivo (C+). Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo.....	64
Figura 9-Resultado da PCR para detecção de adenovírus em amostras de água de reúso. (C+) controle positivo: HAdV-5; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.....	71
Figura 10-Resultado da <i>nested</i> - PCR para detecção de adenovírus em amostras de água de reúso. (C+) controle positivo: HAdV-5; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.....	72
Figura 11-Resultado da ICC-PCR para detecção de adenovírus em amostras de água de reúso. (C+) controle positivo: HAdV-5; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.....	72
Figura 12 - Resultado da RT-PCR para detecção de rotavírus em amostras de água de reúso. (C+): controle positivo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo.....	73
Figura 13-Resultado da ICC-RT-PCR para detecção de rotavírus em amostras de água de reúso. (C+) controle positivo: SiRV-A/SA-11; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.....	74

Figura 14-Resultado da PCR para detecção de adenovírus em amostras de lodo de esgoto. (C+) controle positivo: HAdV-5; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.....75

Figura 15-Resultado da *nested*-PCR para detecção de adenovírus em amostras de lodo de esgoto. (C+) controle positivo: HAdV-5; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.....75

Figura 16-Resultado da ICC-PCR para detecção de adenovírus em amostras de lodo. (C+) controle positivo: HAdV-5; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.....76

Figura 17-Resultado da RT-PCR para detecção de rotavírus em amostras de lodo. (C+): controle positivo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.....76

Figura 18-Resultado da ICC-RT-PCR para detecção de rotavírus em amostras de lodo. (C+) controle positivo: SiRV-A/SA-11; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.....77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-Patógenos emergentes encontrados em água potável e água residuais.....	24
Quadro 2-Parâmetros microbiológicos e tipos de tratamento sugeridos para diferentes categorias de reúso.....	30
Quadro 3-Limites aceitáveis de redução de patógenos em biossólidos classe A.....	31
Quadro 4-Processos de tratamento adotados nas diferentes ETEs de São Paulo selecionadas para este estudo.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Patógenos na água potável: dose infectante, incidência estimada e sobrevivência na água potável em dias nos Estados Unidos.....	25
Tabela 2-Sequência e posição dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação gênica de adenovírus e rotavírus.....	53
Tabela 3- Limiares de detecção das técnicas de cultura celular, PCR e ICC-PCR para o protótipo viral HAdV-5.....	63
Tabela 4-Determinação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, RT-PCR, ICC-RT-PCR e IPX direta, utilizando o protótipo viral SiRV-A/SA-11.....	65
Tabela 5- Índice de recuperação do método de concentração viral aplicado a amostras de água de reúso.....	66
Tabela 6- Determinação e comparação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, PCR e ICC-PCR utilizando o protótipo viral HAdV-5 semeado experimentalmente em amostras de água de reúso. Resultado das quadruplicatas em cada ensaio.....	66
Tabela 7- Índice de recuperação do método de concentração viral aplicado a amostras de lodo da ETE.....	67
Tabela 8- Determinação e comparação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, PCR e ICC-PCR utilizando o protótipo viral HAdV-5 semeado experimentalmente em amostras de lodo.....	67
Tabela 9 - Índice de recuperação do método de concentração viral aplicado a amostras de água de reúso de uma das ETE do município de São Paulo.....	68
Tabela 10- Determinação e comparação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, RT-PCR, ICC-RT-PCR e imunoperoxidase direta utilizando o protótipo viral SiRV-A/SA-11 semeado experimentalmente em amostras de água de reúso.....	69
Tabela 11-Índice de recuperação do método de concentração viral aplicado a amostras de lodo de uma das ETE do município de São Paulo.....	70
Tabela 12 -Determinação e comparação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, RT-PCR, ICC-RT-PCR e imunoperoxidase direta utilizando o protótipo viral SiRV-A/SA-11 semeado experimentalmente em amostras de lodo.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: Porcentagem

μL: Microlitro

μm: Micromolar

μg: Micrograma

ATCC: American Type Culture Collection

CDC: Centro de Controle de Doenças

cDNA: DNA complementar

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

ECP: Efeito Citopático

EDTA: Acido Etilenodiaminotetracético

EPA: Environmental Protection Agency

ETE: Estação de Tratamento do Estado de São Paulo

ICB: Instituto de Ciências Biomédicas

ICC-PCR: Integrated Cell Culture-Polimerase Chain Reaction

IPX: Imunoperoxidase

MME: Meio Mínimo Essencial

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação em cadeia de polimerase

SABESP: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

SFB: Soro Fetal Bovino

UFF: Unidade Formadora de Foco

UFP: Unidade Formadora de Placa

UPCR: Unidade de PCR

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1.SANEAMENTO BÁSICO E DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA.....	18
1.1.1 Rotavírus.....	20
1.1.2 Adenovírus.....	22
1.2 PATÓGENOS EMERGENTES.....	23
1.3 MÉTODOS DE TRATAMENTO DE ESGOTO E SEUS DERIVADOS.....	26
1.3.1 Água de reúso.....	29
1.3.2 Lodo.....	30
1.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO VIRAL.....	32
1.5 LEGISLAÇÃO.....	38
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 AMOSTRAGEM.....	42
3.1.1 Água de reúso.....	42
3.1.2 Lodo de ETE.....	42
3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REÚSO.....	43
3.2.1 Concentração viral por filtração.....	43
3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO.....	44
3.4 RECONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO.....	45
3.5 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM VERTREL-XF E ANTIBIÓTICOS.....	45
3.6 CÉLULAS E PROTÓTIPOS VIRAIS.....	45
3.6.1 Linhagens celulares.....	45
3.6.2 Protótipos virais.....	46
3.7 SUBCULTIVO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES.....	46
3.8 PREPARO DAS SUSPENSÕES DOS PROTÓTIPOS VIRAIS.....	46
3.9 TITULAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE PROTÓTIPOS VIRAIS.....	47
3.9.1 Adenovírus (HAdV-5).....	47
3.9.2 Rotavírus (SiRV-A/SA-11).....	47
3.10 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE DIRETA PARA DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS.....	49
3.10.1 Titulação em bloco do soro anti-adenovírus conjugado com peroxidase.....	49
3.10.2 Cinética de infecção dos adenovírus <i>in vitro</i>.....	49
3.10.3 Absorção de imunoglobulinas inespecíficas do soro com papa de células.....	50
3.11 DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE DETECÇÃO VIRAL DAS METODOLOGIAS CLASSICAS E MOLECULARES UTILIZANDO OS PROTÓTIPOS VIRAIS NO MEIO DE CULTURA E NAS MATRIZES ÁGUA DE REÚSO E LODO DE ESGOTO.....	50
3.11.1 Metodologias clássicas.....	50
3.11.1.1 Cultura celular.....	50
3.11.1.2 Reação de imunoperoxidas direta (IPX).....	51
3.11.2 Metodologias moleculares.....	51
3.11.2.2 Extração do material nucléico viral.....	51
3.11.2.1.1 Extração de DNA.....	51
3.11.2.1.2 Extração de RNA.....	52

3.11.2.2 Oligonucleotídeos.....	52
3.11.2.3 Reação de PCR para detecção de adenovírus.....	54
3.11.2.4 Reação de nested-PCR para detecção de adenovírus.....	54
3.11.2.5 Reação de transcrição reversa e de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para detecção de rotavírus.....	55
3.11.2.6 Método de ICC-PCR/ RT-PCR para detecção de adenovírus e rotavírus.....	56
3.12 ENSAIOS DE SEMEADURA EXPERIMENTAL NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REÚSO.....	56
3.13 ENSAIOS DE SEMEADURA EXPERIMENTAL NAS AMOSTRAS DE LODO.....	57
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4 RESULTADOS.....	58
4.1 TITULAÇÃO DO PROTÓTIPO VIRAL HAdV-5.....	58
4.2 TITULAÇÃO DO PROTÓTIPO VIRAL SiRV -A/SA-11.....	58
4.2.1 Cultivo celular.....	58
4.2.2 Reação de Imunoperoxidase direta.....	59
4.3 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE DIRETA PARA ADENOVÍRUS.....	59
4.4 DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE DETECÇÃO DAS METODOLOGIAS CLÁSSICAS E MOLECULARES UTILIZANDO O PROTÓTIPO VIRAL HAdV5.....	61
4.5 DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE DETECÇÃO DAS METODOLOGIAS CLÁSSICAS E MOLECULARES UTILIZANDO O PROTÓTIPO VIRAL SiRV-A/SA-11.....	63
4.6 ENSAIOS DE SEMEADURA EXPERIMENTAL UTILIZANDO O PROTÓTIPO VIRAL HAdV-5	65
4.6.1 Água de reúso.....	65
4.6.1.2 Determinação do limiar de detecção das técnicas clássicas e moleculares na matriz água de reúso.....	66
4.6.2 Lodo.....	67
4.6.2.1 Determinação do limiar de detecção das técnicas clássicas e moleculares na matriz lodo.....	67
4.7 ENSAIOS DE SEMEADURA EXPERIMENTAL UTILIZANDO O PROTÓTIPO VIRAL SiRV-A/ SA11.....	68
4.7.1 Água de reúso.....	68
4.7.1.2 Determinação dos limiares de detecção das técnicas clássicas e moleculares na matriz de água de reúso.....	69
4.7.2 Lodo.....	69
4.7.2.1 Determinação dos limiares de detecção das técnicas clássicas e moleculares na matriz lodo.....	70
4.8 DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS PRESENTES NATURALMENTE NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REÚSO E LODO POR TÉCNICAS CLÁSSICAS MOLECULARES.....	71
4.8.1 ÁGUA DE REÚSO.....	71
4.8.1.1 Adenovírus.....	71
4.8.1.2 Rotavírus.....	73
4.8.2 Lodo.....	74
4.8.2.1 Adenovírus.....	74
4.8.2.2 Rotavírus.....	76
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
5 DISCUSSÃO.....	79

6 CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS.....	90
ANEXO A- Resultados obtidos com as metodologias clássicas (cultivo celular) e moleculares (PCR, <i>nested</i> -PCR e ICC-PCR) na pesquisa de adenovírus em amostras de água de reúso.....	100
ANEXO B- Resultados obtidos com as metodologias clássicas (cultivo celular e IPX) e moleculares (RT-PCR e ICC-RT-PCR) na pesquisa de rotavírus em amostras de água de reúso.....	101
ANEXO C- Resultados obtidos com as metodologias clássicas (cultivo celular) e moleculares (PCR, <i>nested</i> -PCR e ICC-PCR) na pesquisa de adenovírus em amostras de lodo.....	102
ANEXO D- Resultados obtidos com as metodologias clássicas (cultivo celular e IPX) e moleculares (RT-PCR e ICC-RT-PCR) na pesquisa de rotavírus em amostras de lodo.....	103
ANEXO E- Comparação das metodologias aplicadas para detecção de adenovírus nas amostras de água de reúso e lodo de esgoto.....	104
ANEXO F- Comparação das metodologias aplicadas para detecção de rotavírus nas amostras de água de reúso e lodo de esgoto.....	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 SANEAMENTO BÁSICO E DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA

O saneamento básico garante uma melhor qualidade de vida para milhões de pessoas. Uma melhor gestão dos recursos hídricos pode reduzir a transmissão de doenças e salvar muitas vidas. A importância global da água, do saneamento e da higiene para a redução da pobreza vem sendo discutida nos relatórios das Comissões das Nações Unidas e em diversos fóruns internacionais de Desenvolvimento Sustentável.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004), 1,8 milhões de pessoas morrem por ano de doenças como diarreia, dentre as quais 90% são crianças abaixo de 5 anos. Aproximadamente 88% dos casos estão relacionados com doenças de veiculação hídrica e para reduzir o risco dessas doenças à saúde da população, foram estabelecidos métodos pela OMS que possibilitam avaliar a qualidade da água. Estas metodologias foram adotadas por muitos países. O monitoramento desses programas é realizado de acordo com critérios de qualidade (Jiang, 2006).

Doenças de veiculação hídrica podem ser transmitidas pelo consumo de água contaminada, através do uso recreacional ou contato direto com a pele ou inalação. Os vírus entéricos estão diretamente relacionados com essas doenças visto que são excretados pelas fezes de indivíduos infectados e introduzidos no meio ambiente através do lançamento de esgoto doméstico e ou derivados de seu tratamento como lodo de esgoto e esgoto tratado, contaminando o solo, a água do mar, águas estuarinas e de rio. Os processos de tratamento disponíveis são muitas vezes insuficientes para remoção desses patógenos (Bosch et al., 2008; Fong e Lipp, 2005; Goyal et al., 1984; Melnick e Gerba, 1980; Rajtar et al., 2008).

Há mais de 150 vírus patogênicos que podem ser excretados através das fezes humanas e de animais (Goyal et al., 1984; Melnick, 1984; Rao et al., 1986). Esses vírus entéricos pertencem às famílias *Picornaviridae* (poliovírus, enterovírus, coxsakievírus, vírus da hepatite A e echovírus), *Adenoviridae* (adenovírus), *Caliciviridae* (calicivírus, norovírus) *Astroviridae* (astrovírus) e *Reoviridae* (reovírus e rotavírus) (Fong e Lipp, 2005).

As infecções por rotavírus humano e adenovírus são as principais causas de gastroenterites acometendo principalmente em crianças menores de 5 anos (Logan et al., 2006). Entretanto nos últimos anos, outro vírus, o norovírus tem sido bastante prevalente na

população humana adulta, sendo responsável por inúmeros surtos de gastroenterite (Centers for Disease Control and Prevention, 2010).

A determinação da presença de vírus entéricos humanos em amostras ambientais começou em 1940, mas somente em 1980 com avanços significativos na área de virologia ambiental que os vírus entéricos foram reconhecidos como agentes causadores de inúmeras gastroenterites não-bacterianas assumindo grande importância em termos de saúde pública (Fong e Lipp, 2005). Inúmeros estudos documentaram a presença de vírus entéricos em água de abastecimento bruta e tratada, no efluente de esgoto doméstico e no lodo de estações de tratamento de esgoto (Abbaszadegan et al., 1999; Garrafa, 2001, 2009; Keswick et al., 1984,1990; Mehnert e Stewien, 1992; Mehnert et al., 1997; Payment, 1981; Sassaroli, 2002).

Vilhena et al. (2003), estudando amostras de esgoto na cidade do Cairo, Egito e na cidade de Barcelona, Espanha detectaram a presença de rotavírus em ambas as cidades. Cho et al. (2000) em estudo realizado na China detectaram a presença de adenovírus em 87,5% das amostras de água analisadas em um rio.

No Brasil, vários estudos tem revelado a presença de vírus entéricos em águas de córregos e esgoto. Christovão et al. (1967) detectaram a presença do vírus da poliomielite, além de coxsakievírus em águas utilizadas na irrigação de hortas do município da cidade de São Paulo. Em 1979, Stewien detectou e quantificou *Enterovirus* em amostras de esgoto em dois subdistritos da cidade de São Paulo. Na década de 90, Mehnert e Stewien (1992), introduziram a metodologia para detecção e quantificação de rotavírus em esgoto e córregos poluídos. Estudo subsequente (Queiroz, 1999; Pauli, 2003), aplicando técnicas moleculares revelaram um aumento significativo nos índices de positividade para rotavírus nos mesmos locais estudados por Mehnert e Stewien (1992). Em meados do ano 2000, foram realizadas pesquisas visando a detecção de vírus da Hepatite A (Sassaroli, 2002) e adenovírus (Santos et al., 2004), também na cidade de São Paulo. Recentemente, Garrafa (2009) detectou a presença de vírus em efluente doméstico tratado, disponibilizado para reúso urbano e Guimarães et al (2008) detectaram a presença de astrovírus em amostras de esgoto tratado coletadas em Estações de Tratamento no Rio de Janeiro. No Brasil, Barrella (2008), analisou as amostras de lodo de esgoto originários de duas Estações de Tratamento do Estado de São Paulo (ETE) e detectou a presença de adenovírus e o vírus da hepatite A. As análises estatísticas revelaram que o tratamento químico adotado em uma das ETEs é ineficiente para inativação viral.

1.1.1 Rotavírus

O principal agente das gastroenterites agudas em crianças ao redor do mundo é o rotavírus humano, provocando 39% das internações nos hospitais de crianças com relatos de diarreia, sendo estimado cerca de 611.000 mortes por ano com igual incidência em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (Gurgel et al., 2008; Kosek et al., 2003; Parashar et al., 2003).

O rotavírus humano foi detectado pela primeira vez em 1973 na Austrália com o uso de microscopia eletrônica na análise de uma biópsia do duodeno obtido de uma criança com diarreia aguda (Bishop et al., 1974).

O gênero Rotavirus foi oficialmente reconhecido em 1976 pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) e incluído na Família *Reoviridae*, gênero Rotavirus.

Atualmente os rotavírus são divididos em cinco espécies, rotavírus A e E (RV-A a RV-E), com duas possíveis espécies adicionais RV-F e RV-G (Fauquet et al., 2007). São classificados em grupos, subgrupos e sorotipos/genótipos de acordo com suas propriedades antigênicas das proteínas do capsídeo. A proteína viral VP6, que está localizada na camada intermediária do capsídeo, determina um sorogrupo antígeno específico (A-G), é considerada a maior proteína imunogênica. Os grupos A, B e C foram todos identificados em humanos sendo o grupo A o principal responsável pela maioria das doenças. Os rotavírus pertencentes ao grupo A são diferenciados por sorotipos/genótipos determinados através da expressão de antígenos presentes em seu capsídeo viral (Estes e Cohen, 1989; Koopmans e Brown, 1999).

É caracterizado por sua estrutura icosaédrica, não envelopada e com 70 nm de diâmetro. Possui como genoma uma dupla fita de RNA segmentada de 18,5kb, composta por 11 segmentos, que variam de 667 a 3.302 pb (Estes, 1996). Cada um dos segmentos, com exceção do décimo primeiro, codifica proteínas estruturais virais [(VP1, VP2, VP3, VP4, VP5+VP8), VP6 e VP7] e proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5) (Estes e Cohen, 1989; Gurgel et al., 2008).

Os seis polipeptídeos estruturais estão organizados nas três camadas, sendo que o *core*, camada mais interna que circunda o genoma, é composto principalmente pela proteína VP2, além da VP1 e VP3, codificadas pelos segmentos 2, 1 e 3, respectivamente. Alguns trabalhos têm demonstrado a possibilidade do core ser subdividido em duas camadas. Cento e oitenta moléculas da proteína VP2 formariam uma camada intermediária entre o cápside interno e o

subcore, este constituído pelas proteínas VP1 e VP3, associadas ao genoma viral (Prasad e Chiu, 1994; Shaw et al., 1993).

O cápside interno é formado pela proteína VP6, codificada pelo segmento 6, e disposta numa camada contínua. Cada vírion é composto por 780 moléculas de VP6 arranjadas em trímeros sendo esta a proteína mais abundante do rotavírus e comum à todos os vírus do género Rotavírus (Prasad e Chiu, 1994) e que possibilita distinção da espécie A-E (Matthijnssens et al., 2012).

O cápside externo é formado pelas proteínas estruturais VP7 e VP4. A proteína estrutural VP7 é a segunda glicoproteína mais abundante no vírion e a mais abundante do cápside externo. Por muito tempo a VP7 foi considerada como o único antígeno com características neutralizantes. Esta proteína pode ser codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 do RNA dupla fita, dependendo da cepa viral. As 780 moléculas desta proteína se organizam em pentâmeros ou hexâmeros e recobrem toda a superfície da partícula viral (Estes et al., 1996; Prasad e Chiu, 1994).

A proteína VP4 é codificada pelo segmento 4 do genoma viral. No vírion podem ser encontradas 120 moléculas em forma de espícula, que na presença de enzimas proteolíticas são clivadas originando duas outras proteínas, a VP5* e a VP8*, respectivamente. Esta proteína está aparentemente envolvida em funções como aglutinação de hemácias, virulência, entrada do vírus na célula e indução de anticorpos neutralizantes (Estes et al., 1996).

As proteínas NSP1, NSP2, NSP3 e NSP5 provavelmente possuem propriedades de ligação a ácidos nucleicos, atividades de replicase e envolvimento na replicação do genoma viral (Aponte et al., 1996; Brottier et al., 1992).

A estrutura e a morfologia do rotavírus podem ser visualizadas na Figura 1.

Figura 1- Representação esquemática da estrutura de rotavírus (A e B).

Fonte: www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n7/fig_tab/nrmicro1692_F1.html.

A proteína VP7 define o sorotipo/genótipo G (para glicoproteína) e a proteína VP4 define o sorotipo P (sensível à protease) (Kapikian et al., 1981). Baseado no sistema sorológico há 35 genótipos P (12 encontrados em humanos) e através de métodos moleculares foram caracterizados 27 genótipos G (11 encontrados em humanos) (Matthijnssens et al., 2011). Quanto ao sorotipo G (G1-G6, G8-G10, G12 e G15) foram encontrados 15 sorotipos sendo que 11 foram encontrados em humanos. Os genes que codificam as proteínas VP7 e VP4 segregam independentemente assim numerosas combinações de sorotipos G e P são possíveis (Hoshino e Kapikian, 2000).

Há quatro combinações G/P que são detectadas com maior frequência ao redor do mundo: P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4. Eventualmente há relatos de infecção por sorotipos G não usuais e recentemente ocorreu a emergência do sorotipo G9 com P[6] e mais usualmente em associação com [P8] em muitos países como Brasil, Malawi, Estados Unidos, França, Índia, Argentina, Inglaterra e Austrália (Carmona et al., 2006; Santos et al., 2005). A larga distribuição global das infecções causadas por rotavírus tem contribuído para o desenvolvimento de vacinas (Gurgel et al., 2008).

1.1.2 Adenovírus

Os adenovírus são os mais prevalentes, depois dos rotavírus, nos casos de gastroenterite aguda infantil (Zlateva, 2005). Esses vírus foram inicialmente isolados de humanos e identificados como agentes causadores de uma epidemia respiratória que afetava recrutas militares em meados de 1950 (Hilleman e Werner, 1954).

Os adenovírus humanos são caracterizados por uma estrutura de simetria icosaédrica com 90 nm a 100 nm de diâmetro, não envelopada. O genoma viral é constituído por um DNA fita dupla linear com tamanho variando de 20 a 30 kb, que representa cerca de 15% da massa viral e codificam mais de 30 proteínas estruturais e não-estruturais (Brown et al., 1996). A proteína *hexon* é o principal componente do capsídeo, comum a todos os adenovírus. Os vértices do icosaédro são constituídos pela proteína *penton* base da qual emergem fibras protéicas trimérica com uma estrutura globular no terminal carboxi (Horwitz et al., 1990). A estrutura está representada na Figura 2.

Figura 2- Representação esquemática da estrutura da partícula de adenovírus.

Fonte: <http://www.ictvdb.org/Images/Ackerman/Animalvi/Adenovir/799-16.htm>
<http://home.debitel.net/user/pbuttgerreit/adenoschema.htm>

Há cerca de 51 diferentes sorotipos de adenovírus classificados originalmente de acordo com a capacidade de neutralização por um anti-soro específico de animal. Os sorotipos estão divididos em seis espécies ou subgrupos (A-F) baseados em suas propriedades de hemaglutinação, potencial oncogênico, homologia do DNA e a presença dos pares de base GC no seu DNA (De Jong et al., 1993; Russel, 2009). O subgrupo F (sorotipo 40, 41) é o mais encontrado em quadros de gastroenterites virais em crianças menores de 2 anos ocupando cerca de 1-20% dos casos de diarreia (Shimizu et al., 2007; Verma et al., 2009). Mais raramente os sorotipos 31, 12 e 18 do subgrupo A e os sorotipos 1, 2, 5 e 6 do subgrupo C também estão relacionados com a etiologia da gastroenterite aguda (Baum, 2000).

1.2 PATÓGENOS EMERGENTES

Coliformes totais, coliformes fecais ou *E.coli* e *Enterococcus* são os mais comuns indicadores microbianos da qualidade da água. Porém, nos últimos anos, a ocorrência e concentração de vírus e cistos de protozoários vem sendo considerada devido a diferenças morfológicas e físico-química de indicadores bacterianos. Vírus são significativamente menores e podem escapar das barreiras de filtração utilizadas na remoção bacteriana. Além

disso, vírus e cistos de protozoários são mais resistentes aos processos de tratamento e a degradação ambiental do que indicadores bacterianos (Jiang, 2006).

Nos últimos anos, o surgimento de patógenos emergentes que são resistentes a métodos convencionais de tratamento de água e desinfecção, o aumento de imunodeprimidos na população, o uso crescente de águas residuais e também o surgimento de novas tecnologias que tornou possível a quantificação e detecção, quantificação de patógenos emergentes na matriz água contribuíram no surgimento de novos critérios de qualidade da água (Crockett, 2007).

Para evitar riscos à saúde humana a EPA publicou o Safe Drinking Water Act com a lista de possíveis candidatos contaminantes emergentes nos últimos cinco anos (Quadro 1) (Jiang, 2006).

Quadro 1- Patógenos emergentes encontrados em água potável e água residuais

Patógenos emergentes encontrados na lista de contaminates da USEPA	Outros patógenos emergentes em potencial
Acanthamoeba	<i>Entamoeba histolytica</i>
Adenovírus	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Giardia lamblia</i>
Calicivirus	<i>Cryptosporidium parvum</i>
Coxsackievirus	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>
Cianobactéria	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>
Echovirus	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
Microsporidio	Norwalk vírus
<i>Mycobacterium avium intracellulare</i>	Poliovírus

Fonte: Crockett (2007).

Os microrganismos patogênicos entéricos e oportunistas são transmitidos pela via fecal-oral e podem ser encontrados na água (Tabela 1). A taxa de inativação e a dose de infecção são características importantes desses microrganismos. Alguns como *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* são capazes de sobreviver ao tratamento da água mas sem proliferação. Outros podem

sobreviver e proliferar na água potável como *Legionella pneumophila* e *Mycobacteria* (Ford, 1999).

Tabela 1- Patógenos na água potável: dose infectante, incidência estimada e sobrevivência na água potável em dias nos Estados Unidos.

	Dose infectante	Incidência	Sobrevivência na água em dias
Bactéria			
<i>Vibrio cholera</i>	10 ⁸	^A poucos	30
<i>Shigella spp.</i>	10 ²	35.000	30
<i>Campylobacter spp</i>	10 ⁶	320.0000	7
<i>Legionella pneumophila</i>	>10	13.000	Longa
<i>Mycobacterium avium</i>	?	?	Longa
Protozoário			
<i>Giardia lamblia</i>	1-10	260.000	25
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1-30	420.000	?
Vírus	1-10	6.500.000	^B 5-27

Abreviações: ?-desconhecido. A-Poucos surtos de cólera ocorreram nos Estados Unidos e na maioria das vezes esses surtos estão relacionados a alimentos.

B-Estimado para HAV, Norwalk vírus e rotavírus.

Fonte: Adaptada de Ford (1999).

Um grande número de microrganismos podem ser encontrados no esgoto bruto e tratado. Vírus entéricos podem ser encontrados em grande número, aproximadamente 10⁹ partículas virais por mL (rotavírus) e 10⁶-10⁸ partículas virais por mL no caso de adenovírus e astrovírus (Carter, 2005).

Em países de clima tropical como o Brasil, alguns vírus entéricos como adenovírus e rotavírus são veiculados pela água de esgoto durante todos os meses do ano, sem sazonalidade (Mehnert e Stewiwn, 1993; Santos et al., 2004).

No meio ambiente os vírus entéricos são encontrados em uma ampla faixa de variação de pH (3-10) e em baixas temperaturas por um longo período. Alguns vírus podem manter sua capacidade de infecção por volta de 130 dias na água do mar, 120 dias no esgoto e 100 dias no solo numa temperatura variando de 20-30 °C (Fong e Lipp, 2005).

Os patógenos virais são mais resistentes que as bactérias ao tratamento convencional do esgoto que envolve os processos de cloração e o uso de luz ultravioleta (UV) como principais etapas para a inativação viral (Thurston-Enriquez et al., 2003).

Foi observado que com uma quantidade de 8 mg de cloro por litro de efluente não há redução viral. Altas doses de concentração de cloro por litro promovem 99,9% de destruição dos vírus encontrados no esgoto, porém compostos tóxicos como organoclorados podem ser formados.

Em estudos avaliando a resistência de 25 tipos diferentes de vírus entéricos o tempo para a inativação de 99,99% do vírus pode variar quando submetidos as mesmas condições de 3 minutos a 2 horas (Melnick et al., 1984). Nos poliovírus tipo 1 e bacteriófagos f2 o cloro causa danos no ácido nucléico viral (Vaughn e Novotny, 1991).

O adenovírus tem se mostrado mais resistente a radiação UV que outros vírus. Esse fato se deve ao seu DNA dupla fita que pode ser reparado no hospedeiro (Bitton, 1997).

Assim o adenovírus pode ser um bom indicador para a poluição fecal na água devido a sua frequente ocorrência em ambientes aquáticos, suas implicações a saúde pública e sobrevivência ao tratamento de esgoto sendo frequentemente detectados até mesmo em águas que não têm contaminação por enterovírus (Carter, 2005; Pina et al., 1998a; Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

1.3 MÉTODOS DE TRATAMENTO DE ESGOTO E SEUS DERIVADOS

No início do século XIX doenças de circulação hídrica foram crescendo e muitas epidemias apareceram em Londres fazendo milhares de vítimas. A conscientização sobre o papel dos microrganismos como causadores de doenças levou a uma maior preocupação com o tratamento de águas residuais (Gerba, 2000).

O esgoto doméstico é composto basicamente por excretas humanas e de animais (fezes e urina) e água derivada de atividades domésticas. Esse esgoto é constituído por proteínas (40-60%), carboidratos (25-50%), óleos e gorduras (19%), uréia derivada da urina e traços de componentes orgânicos incluindo pesticidas, surfactantes, fenol e outros poluentes. Há ainda uma última categoria que compreende metais, não-metais, compostos de benzeno e composto clorados. A maior parte da matéria orgânica presente em águas residuais domésticas é facilmente biodegradável (Bitton, 1997).

No tratamento do esgoto estão envolvidos processos físicos, químicos e biológicos que se dividem em quatro etapas: tratamento preliminar, primário, secundário e terciário.

No tratamento preliminar o objetivo é a remoção de materiais grosseiros através da retenção por grelhas de crivos grossos, além da separação da água residual da areia, a partir da utilização de caixas de areia para a retenção desse material.

O tratamento primário é realizado por processos físicos-químicos. Nessa etapa o fluxo do esgoto é bombeado para um tanque de sedimentação primário onde o esgoto flui e permite que os sólidos em suspensão de maior densidade sedimentem no fundo formando o lodo primário bruto. O lodo resultante está sujeito a um processo de digestão anaeróbia num digestor anaeróbio ou tanque séptico. Os materiais flutuantes como graxas e óleos são removidos na superfície. Nessa fase não há remoção de patógenos, a não ser os adsorvidos no material particulado que sedimentou (Gerba, 2000).

O tratamento secundário remove sólidos e matéria orgânica não sedimentável e alguns nutrientes como nitrogênio e fósforo. Nessa etapa ocorre a degradação biológica de compostos carbonáceos através da utilização de processos unitários biológicos (lodo ativado, filtros de pedra e lagoas de estabilização) e químicos (desinfecção). Com a degradação biológica, ocorre naturalmente a decomposição de carboidratos, óleos e graxas, proteínas e compostos mais simples. As bactérias que efetuam o tratamento se reproduzem e tem sua massa total aumentada em função da quantidade de matéria degradada (Gerba, 2000).

Dentre os processos de tratamento o lodo ativado é o mais utilizado. O sistema de lodo ativado tem duas funções principais: oxidação da matéria orgânica biodegradável em tanques de aeração e floculação que consiste na separação da biomassa formada do efluente tratado.

O efluente primário é bombeado em tanques de aeração onde o esgoto é agitado com o ar injetado e uma massa líquida de microorganismos (lodo ativado) que se alimentam da matéria orgânica contida no efluente. Em seguida o efluente é bombeado ao decantador secundário onde o efluente líquido fica na parte superior e o lodo é sedimentado no fundo do tanque. Uma parte desse lodo retorna ao tanque de aeração e o restante é removido (lodo secundário). Ambos os processos de aeração e sedimentação influenciam na remoção ou inativação de patógenos e parasitas. Durante a fase de aeração fatores ambientais (temperatura) e biológicos (presença de microorganismos antagônicos) tem impacto na sobrevivência de patógenos e parasitas. Já na fase de sedimentação alguns microorganismos são adsorvidos ou incorporados ao lodo secundário. A eliminação da DBO (demanda

bioquímica de oxigênio) alcança entre 85% e 98% e a de organismos patogênicos entre 60 e 90% (Bitton, 1997; Gerba, 2000).

O processo de lodo ativado é considerado o mais eficiente na remoção de vírus no esgoto. Após 10 horas de aeração 25% dos vírus são removidos por adsorção ao material particulado e 75% são removidos na inativação. Os vírus podem ser inativados por bactérias presentes no esgoto que possuem atividades antivirais ou ingeridos por protozoários (ciliados) e pequenos metazoários, porém somente a inativação não é suficiente para a remoção viral visto que o tempo de retenção varia de 6 a 12 horas.

No tratamento terciário ocorre a remoção de nutrientes, DBO, patógenos e parasitas e algumas substâncias tóxicas e a desinfecção dos esgotos tratados (Bitton, 1997).

A desinfecção é um processo onde ocorre a destruição de microrganismos que causam doenças. A desinfecção usando a cloração teve início no começo do século XX e o primeiro sistema de cloração instalado foi em Middlekerke, na Bélgica em 1902. Em 1908 os Estados Unidos começaram a usar o cloro em larga escala na desinfecção da água em Nova Jersey. A destruição de patógenos e parasitas através da desinfecção contribuiu consideravelmente na redução de doenças de veiculação hídrica. Anos depois estudos demonstraram que a cloração pode levar a formação de subprodutos que podem ser tóxicos ou genotóxicos para seres humanos e animais. Assim outros tipos de desinfetantes como o ozônio, a radiação UV e dióxidos de cloro são empregados no tratamento de esgotos sanitários (Bitton, 1997).

A eficiência do processo de cloração como desinfetante viral depende de uma série de fatores como temperatura, pH, presença de matéria orgânica e o estado físico dos vírus (adsorvido, agregado, etc.). Na presença de grande quantidade de matéria orgânica nos efluentes derivada dos lodos ativados, a remoção viral não é realizada com sucesso pois o cloro pode se combinar com resíduos orgânicos.

O dióxido de cloro quando usado como desinfetante produz uma menor concentração de ácidos halogênicos que o cloro, é um desinfetante microbiano rápido e eficaz e é geralmente superior ao cloro na ativação de bactérias e vírus em água e de águas residuais. No caso dos rotavírus a eficiência virucida aumenta com a elevação do pH de 4,5 para 9,0 (Bitton, 1997).

O ozônio está sendo usado em várias partes do mundo como desinfetante de águas residuais. A sua eficácia não está relacionada a alterações de pH e não há interação com a amônia, porém a desinfecção por ozônio tem um custo maior quando comparada a processos como cloração e radiação UV. Por não deixar resíduos, o ozônio pode ser utilizado como

desinfetante primário seguido de processos de cloração. Esse tipo de tratamento aumenta as taxas de inativação e remove a fase de latência característica do processo de cloração.

Estudos mostram que o ozônio é um oxidante mais eficiente que o cloro, em simian rotavírus o ozônio se mostrou mais eficaz que o cloro e o dióxido de cloro na inativação viral (Bitton, 1997).

Oppenheimer et al. (1959), mostrou que a radiação UV poderia ser empregada na inativação viral em água e outras substâncias líquidas. Carlson et al. (1942) demonstrou que esse método é mais eficiente que a filtração, adsorção e floculação. A radiação UV causa danos no DNA microbiano, no caso dos vírus o dano inicial ocorre no genoma viral seguido de danos na estrutura de revestimento viral. A eficácia da desinfecção por radiação UV depende da dose aplicada e do tipo de microorganismo considerado. O uso da radiação UV não ocasiona a formação de produtos tóxicos, carcinogênicos ou mutagênicos e é um método eficiente na inativação de vírus, bactérias e protozoários porém apresenta baixa eficiência devido a turbidez presente em alguns efluentes e não pode ser usado como desinfetante residual na água tratada assim um pós-desinfetante como o cloro deve ser adicionado.

1.3.2 Água de reúso

Até o ano de 2020, a população mundial deverá aumentar e com este crescimento virá uma maior necessidade de água para atender diversas necessidades. Muitas comunidades em todo o mundo estão se aproximando dos limites de suas fontes de água disponíveis, assim a recuperação de água e reúso tornaram-se quase necessário para a conservação e ampliação do abastecimento de água. O reúso da água foi aceito e aprovado pelo público em muitas áreas urbanas e agrícolas, projetos devidamente implementados de reúso de água não potável podem ajudar as comunidades a atender a demanda de água e a superar os desafios de abastecimento sem quaisquer conhecidos riscos significativos à saúde.

Segundo a Agência Americana de Proteção Ambiental (United States Environmental Protection Agency, 2004), o reúso é classificado em tipos de aplicação e pode ser dividido nas seguintes categorias e com qualidades microbiológicas diferentes, dependendo da sua aplicação.

Quadro 2- Parâmetros microbiológicos e tipos de tratamento sugeridos para diferentes categorias de reúso.

Tipo de Reúso	Tratamento	Qualidade da água recuperada
Reúso urbano	Secundário Filtração Desinfecção	Não detecção de coliformes fecais/100mL
Área de irrigação restrita	Secundário Desinfecção	$\leq$ coliformes fecais/100 mL
Reúso agrícola de culturas alimentícias (processadas comercialmente)	Secundário Desinfecção	<200 coliformes fecais/100 mL
Reúso agrícola de culturas alimentícias (não processadas comercialmente)	Secundário Filtração Desinfecção	Não detecção de coliformes fecais/100 mL
Reúso agrícola de culturas não-alimentícias	Secundário Desinfecção	< 200 coliformes fecais/100 mL
Recreacional irrestrito	Secundário	Não detecção de coliformes fecais/100 mL
	Filtração	
	Desinfecção	
Recreacional restrito	Secundário	$\leq$ 200 coliformes fecais/100 mL
	Desinfecção	
Industrial	Secundário e	$\leq$ 200 coliformes fecais/100 mL
	Desinfecção	
Ambiental	Variável	
	Secundário	$\leq$ 200 coliformes fecais/100 mL
	Desinfecção	
Recarga de água (em locais onde o acesso público é restrito)	Dependendo do local Primário ou Secundário	Variável dependendo do local e uso da água
Uso indireto da água	Secundário, Filtração	Não detecção de coliformes fecais/100 mL
	Desinfecção	
	Nessário talvez filtração ou Tratamento avançado da água	

Fonte: Adaptado USEPA (2004).

1.3.2 Lodo

No tratamento de esgotos há a formação de subprodutos sólidos: material granulado, areia, espuma, lodo primário, lodo secundário e lodo químico, conforme o tipo de tratamento empregado (Von Sperling e Andreoli, 2003). O lodo possui muitos nutrientes sendo considerado um bom fertilizante para o solo, porém contém muitos microrganismos patogênicos como bactérias, vírus, protozoários. A EPA incentiva a aplicação desse material

desde que seja tratado e disposto de forma adequada. Em 1995, aproximadamente 50% do lodo produzido no tratamento de esgoto nos Estados Unidos foi reutilizado.

Esses patógenos podem causar doenças a seres humanos e animais quando há contato direto (toque direto no lodo, manejo do solo onde ocorreu a disposição, caminhada na área logo após a aplicação do lodo ou através da inalação aerossóis formados também logo após a aplicação) ou contato indireto como: consumo de alimentos contaminados com esse lodo ou consumo inadequados de alimentos em locais onde houve a aplicação, contato com vetores de locais próximos a aplicação e ingestão de água contaminada nas proximidades da aplicação do lodo (USEPA, 2003).

Assim muitos países regulamentaram o uso e o tratamento desse tipo de resíduo para proteger a saúde da população. O lodo de esgoto que recebe o tratamento adequado e atende as normas federais para a sua aplicação recebe o nome de biossólido.

Devido ao tratamento utilizado para a redução de patógenos presentes no lodo, o mesmo pode ser classificado em duas categorias: Classe A e B.

Na classe A há a redução de patógenos (incluindo vírus, bactérias patogênicas e ovos de helmintos) abaixo de níveis detectáveis. Na classe B há a redução de patógenos a níveis que não causam danos a saúde pública e ao meio ambiente. Os biossólidos da classe B são dispostos no solo com restrições de uso e lugar para minimizar efeitos na exposição humana e animal.

Na classe de biossólidos A são encontrados seis métodos alternativos para a redução de patógenos. O objetivo desses métodos é a redução de patógenos em densidades abaixo dos limites detectáveis como podemos observar no quadro abaixo.

Quadro 3- Limites aceitáveis de redução de patógenos em biossólidos classe A.

Patógeno	Limite de detecção
<i>Salmonella</i> sp.	Menor que 3MPN por 4 g de biossólido total (peso seco)
Vírus entéricos	Menor que 1UFP por 4 g de biossólido total (peso seco)
Ovos viáveis de helmintos	Menor que um ovo de helminto viável em 4 g de biossólido total (peso seco)

Fonte: USEPA (2003).

Os processos utilizados para uma maior redução de patógenos são: compostagem (lodo disposto em pilhas de compostagem estáticas aeradas ou sistemas fechados como reatores biológicos onde a temperatura do lodo é mantida por 55 °C ou mais por três dias consecutivos); secagem por calor (onde o lodo é seco por contato direto ou indireto de gases

quentes para a redução do teor de umidade a 10% ou inferior); tratamento utilizando calor (lodo é aquecido a uma temperatura de 180 °C ou superior por 30 minutos); digestão aeróbia termofílica (o lodo é agitado e aerado e agitado por 10 dias a uma temperatura variando entre 55 °C e 60 °C); irradiação de raios beta (lodo é irradiado por raios beta por um acelerador de elétrons a temperatura ambiente); irradiação de raios gama (o lodo é irradiado por raios gama de um acelerador de isótopos a temperatura ambiente); pasteurização (a temperatura do lodo é mantida por 70 °C ou mais por um período de no mínimo 30 minutos) (Rao et al., 1986; USEPA, 2003).

Os biossólidos da classe B possuem uma certa quantidade de patógenos, havendo apenas uma redução da densidade, onde o limite aceitável para essa classe corresponde a 2 milhões de UFC por grama total de biossólido (peso seco). Ovos de helmintos não precisam ser necessariamente reduzidos.

Os métodos utilizados para uma significativa redução de patógenos são: digestão aeróbica (oxigenação e agitação do lodo por um tempo e temperatura específico), digestão anaeróbica (oxidação da matéria orgânica em condições anaeróbicas gerando metano que pode ser usado como combustível), secagem (lodo é seco em leitos de areia por um período mínimo de 3 meses), compostagem (lodo disposto em forma de leiras, leiras aeradas ou reatores biológicos) e estabilização utilizando o cal (cal é adicionado ao lodo para elevação do pH) (Rao et al., 1986; USEPA, 2003).

1.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO VIRAL

As partículas virais possuem polaridade e podem ser adsorvidas por uma grande variedades de matrizes carregadas como por exemplo membranas filtrantes. Consideradas como proteínas, as partículas virais tem elevada massa molecular e podem ser concentradas por ultracentrifugação. Baseando-se nessas propriedades gerais vários métodos foram desenvolvidos para concentração viral em amostras ambientais.

Um bom método de concentração das amostras ambientais de água deve conter os seguintes requisitos: ser tecnicamente simples, rápido, adequado para vírus entéricos, apresentar elevadas quantidades de vírus, prover um pequeno volume de concentração e ter baixo custo. Há alguns procedimentos adotados para a concentração dos vírus como a filtração baseado no método de adsorção e eluição, a precipitação e a ultrafiltração (Bosch, 1998; Bosch et al., 2008; Fong e Lipp, 2005; Wyn-Jones e Sellwood, 2001) mas nenhum

desses métodos quando utilizados isoladamente possuem todos esses requisitos (Bosch, 1998; Bosch et al., 2008).

A maioria dos métodos de concentração usa um volume de 1-100 litros de amostra. No caso de métodos em que se utilizam membranas filtrantes o volume máximo a ser filtrado dependerá da turbidez da amostra.

Em 1976, Wallis e Melnick desenvolveram métodos adsorção/eluição viral. Em geral os vírus contidos na amostra são colocados em contato numa matriz aonde os vírus serão adsorvidos em condições específicas de pH e forças iônicas. Uma vez que os vírus são adsorvidos a água da suspensão original pode ser descartada. Assim o vírus é eluído dessa matriz utilizando normalmente três soluções extrato de carne pH 9.5, leite desnatado com pH 9.0 ou glicina /NaOH com pH 9.5-11.5. Cada método de concentração possui vantagens e desvantagens (Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

O método de chumaço de gaze consiste em mergulhar um chumaço de gaze com algodão em uma corrente de água de forma que os vírus fiquem adsorvidos é considerado um método simples, porém aplica-se apenas em amostras com muito material em suspensão não apresentando uma abordagem quantitativa.

O método de concentração viral mais usado para a concentração viral é aquele em que são utilizados filtros de microporosidade carregados eletricamente. Nessa metodologia as partículas virais de vírus entéricos, que se apresentam naturalmente carregadas negativamente, são adsorvidas a matriz de um filtro de celulose carregado positivamente. Porém na presença de uma solução de eluição protéica altamente alcalina, a polaridade é invertida havendo uma repulsão entre as cargas positivas do filtro e a da superfície das partículas virais. Assim a solução de eluição carrega as partículas virais desabsorvidas. Esse método foi considerado um dos melhores métodos para a recuperação viral de vírus entéricos de água potável (Hill et al., 2009).

Esse método de concentração através de membrana eletropositiva foi desenvolvido inicialmente por Sobey e Jones (1979). Posteriormente outros pesquisadores utilizaram esse método para detecção viral em amostra de esgoto e água de córrego (Barrella et al., 2008; Mehnert e Stewien, 1992; Queiroz, 2001; Santos et al., 2004).

Outro método utilizado para a concentração viral é a ultracentrifugação. Esse método é capaz de concentrar todos os vírus presentes na amostra e ultracentrifugações diferenciais permitem a separação de diferentes tipos de vírus. Porém apenas um volume limitado da

amostra pode ser processado por vez, assim essa metodologia é utilizada como método de concentração viral secundário (Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

Na pesquisa de vírus no lodo, os procedimentos devem permitir a recuperação viral a partir de diferentes tipos de lodo, apresentarem baixo custo e serem eficientes na remoção de contaminantes bacterianos e fúngicos, além de substâncias tóxicas às culturas celulares (Farrah, 1987).

Os métodos utilizados para concentração viral envolvem etapas de eluição das partículas virais, clarificação por centrifugação com retirada do sobrenadante. Na eluição das partículas virais são utilizados como eluentes soluções com volume de duas a nove vezes maior que o volume do lodo inicial.

A mistura entre o lodo e o diluente pode ser realizada por agitação mecânica ou magnética, sonicação ou pela sonoicação deles (Ahmed e Sorensen, 1995). Em seguida a clarificação é realizada por centrifugação com velocidade e tempos variáveis visto que cada metodologia proposta estabeleceu uma velocidade como 1500 x g por 15 minutos ou 5000 x g por uma hora (Ahmed e Sorensen, 1995). Alguns métodos sugerem após a neutralização do sobrenadante a filtração do sobrenadante (Schloter et al, 1995) ou a concentração por floculação orgânica (Glass et al., 1978).

Recentemente Barrela et al. (2008) propôs modificações na técnica usada por Ahmed e Sorensen (1995) alterando o tempo de processamento das amostras e o pH da solução eluente que deve ser ajustado conforme o vírus a ser recuperado.

Um fator decisivo na metodologia de detecção viral é o sistema utilizado para o isolamento e identificação dos vírus. Os métodos tradicionais de detecção viral em amostras clínicas podem ser aplicados em amostras ambientais, no entanto, um aspecto importante a ser considerado é o fato de que muitos agentes virais encontram-se abaixo dos limites de detecção, exigindo adaptações para a aplicação destes em amostras ambientais.

Existem técnicas que não apresentam bom desempenho quando aplicadas a pesquisa de vírus em amostras ambientais como, por exemplo, a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) que apresenta limite de sensibilidade na faixa de aproximadamente 10^7 partículas virais (Linhares et al., 1981; Mehnert et al., 1992; Payment et al., 1983) e a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE).

Atualmente a análise virológica de amostras ambientais compreende a detecção dos vírus por metodologias clássicas ou moleculares como o PCR (Bosch, 1998; Rajtar et al., 2008).

Estudos mais recentes tem sido baseados em análises metagenômica e sequenciamento gênico, contudo são métodos onerosos, demorados e tecnicamente difícil de serem implantados em áreas de saneamento para avaliação de qualidade microbiológica de matrizes geradas .

Dentre os métodos de detecção viral clássicos, as culturas celulares são bastante utilizadas para o isolamento e a determinação da infectividade dos vírus em amostras ambientais (Fong e Lipp, 2005).

A multiplicação viral pode ocorrer somente dentro das células vivas, redirecionando sua bioquímica par a produção de vírus. Diferentes métodos de isolamento e identificação foram desenvolvidos e utilizados em diferentes laboratórios porém a cultura celular é ainda bastante utilizada na pesquisa de vírus em amostras ambientais. Culturas primárias e secundárias que podem ser encontradas comercialmente ou preparadas em laboratório podem ser utilizadas. Devido a especificidade viral em diferentes células hospedeiras é comum o uso de diferentes tipos de cultura na pesquisa de diferentes agentes virais (Grabow, 1978).

Os adenovírus podem ser cultivados e isolados em diferentes linhagens celulares incluindo células de carcinoma de cólon humano (Caco-2), células epiteliais humana tipo 2 (Hep-2), células de rim de macaco verde africano (Vero) entre outras. Estudos mostram que a susceptibilidade das culturas celulares na replicação viral pode variar de acordo com a amostra utilizada e o tipo de pesquisa realizada (Jiang, 2006).

Os vírus podem ser quantificados pelo método de tubo de ensaio onde diluições seriadas da suspensão viral são preparadas e uma porção quantitativa de cada diluição é inoculada em um número apropriado de tubos com culturas celulares. As células inoculadas são observadas para a análise dos efeitos citopáticos (ECP). Dependendo da concentração viral e do tipo de vírus o aparecimento do efeito citopático pode variar de um dia a três semanas. O efeito citopático pode ser caracterizado por arredondamento celular, formação de sincícios ou completa destruição da monocamada celular (Hamza et al., 2011). O título é então expresso como 50% de dose infectante viral ou $DICT_{50}$ que corresponde a quantidade de vírus presentes na suspensão viral que provocou efeitos citopáticos em metade dos tubos que foram inoculados (Reed e Muench, 1938).

Outra metodologia utilizada para quantificação viral de vírus entéricos na água é a técnica de plaqueamento. O método envolve a inoculação das culturas celulares com a suspensão viral seguida de imobilização com ágar para manter a formação de placas

separadas. Uma placa formada (UFP) corresponde a uma partícula viral infecciosa. Porém muitos vírus não forma não formam placas e por isso não são detectados nessa metodologia.

Essas técnicas são consideradas metodologias morfológicas visto que não são considerados específicos para um vírus em particular. Assim os patógenos virais precisam ser confirmados por metodologias moleculares, ensaio imunoenzimáticos ou imunológicos (Hamza et al., 2011).

A utilização de métodos imunológicos como as reações de imunoperoxidase e imunofluorescência permitem a detecção e quantificação das partículas virais infecciosas das amostras ambientais e estão sendo empregadas em muitos estudos para detecção viral em amostras ambientais (Espinosa et al., 2008; Mehnert e Stewien, 1992; Payment e Trudel, 1985; Queiroz et al., 2001; Steinman, 1981). Na imunoperoxidase direta a enzima peroxidase é conjugada com um anticorpo específico que ao reagir com um substrato (peróxido de hidrogênio) na presença de um cromógeno como o tetrahidrocloreto de diaminobenzidina produz um precipitado de coloração marrom (Herrman et al., 1974).

Já a reação de imunofluorescência consiste na detecção de células infectadas através de um anticorpo específico conjugado a uma substância que quando submetida à luz ultravioleta se torna fluorescente. Gerba (1982) foi um dos primeiros a adaptar essa reação para amostras ambientais.

Segundo Rao e Melnick (1986) esta reação é considerada de 100 a 1.000 vezes mais sensível que a reação de imunofluorescência. Mehnert e Stewien (1992) em estudo analisando a presença de rotavírus em amostras ambientais utilizando as técnicas como imunofluorescência indireta e imunoperoxidase direta demonstrou que a técnica de imunoperoxidase apresenta sensibilidade duas vezes maior que a imunofluorescência indireta.

Entre as técnicas moleculares se destaca a reação de PCR (polimerase chain reaction) onde ocorre a amplificação do ácido nucléico através de oligonucleotídeos iniciadores específicos. Esses oligonucleotídeos são sintetizados artificialmente sendo que suas sequências de nucleotídeos são complementares as sequências específicas que flanqueiam a região alvo. Usando um determinado número de ciclos de aquecimento ocorre a denaturação, anelamento e extensão da fita dupla do DNA alvo através da DNA polimerase.

A amplificação de aproximadamente 10^6 cópias de um único DNA alvo ocorre em poucas horas (Saiki et al., 1987). A alta sensibilidade e especificidade dessa técnica e a redução do tempo para a detecção viral tornou a PCR uma técnica muito utilizada na detecção viral em amostras ambientais sendo que nessas é capaz de detectar vírus em grandes volumes

de água (100 a 1000 litros) (Abbaszadegan, 1993). Porém uma significativa redução da sensibilidade dessa técnica pode ocorrer devido a presença de inibidores presentes em amostras ambientais (Jiang, 2006).

No caso de vírus que possuem como material genético RNA há a utilização da enzima transcriptase reversa e esse processo é conhecido como (RT-PCR). Nessa técnica primeiramente a enzima transcriptase reversa copia a informação da sequência do RNA alvo para uma fita complementar de DNA (cDNA) utilizada em seguida na reação de PCR.

Atualmente algumas variações da técnica de PCR convencional estão sendo utilizadas como as reações de *nested* - PCR que aumentam a especificidade e sensibilidade da reação por utilizar oligonucleotídeos iniciadores que irão se anelar com regiões mais internas do fragmento amplificado da primeira reação de PCR. Os ensaios de *Nested*-PCR para adenovírus como relatado por Allard et al. (1994) mostraram aumento da sensibilidade das reações em relação ao PCR convencional, com limite de detecção de uma partícula de adenovírus. Devido a essa característica a técnica é muito utilizada para confirmação do PCR (Pina et al., 1998).

Pares específicos de oligonucleotídeos iniciadores de regiões conservadas ou genes encontrados no genoma viral são desenhados para detecção de cada vírus em particular. Por exemplo, a região do genoma de adenovírus que codifica a proteína *hexon* do capsídeo viral pode ser usada para a detecção de adenovírus humanos como os do tipo 2, 40 e 41. A região não codificada 5' do genoma de enterovírus pode ser usada para a detecção de poliovírus, coxsackievírus e echovírus. Outras regiões do genoma viral que possuem maior variabilidade são úteis para genotipagem e estudos epidemiológicos (Rodriguez et al., 2009).

Apesar dos métodos baseados na técnica de PCR apresentarem grande sensibilidade e especificidade eles não fornecem a informação sobre a infectividade viral. Assim muitos estudos estão sendo realizados combinando as técnicas de cultura celular com PCR (ICC-PCR) (Chapron et al., 2000; Greening et al., 2002; Lee e Jeong, 2004; Van Heerden et al., 2005).

Nessa técnica, após a inoculação viral nas culturas celulares, somente vírus infecciosos, se presentes na amostra, irão se propagar. Em seguida, o material genético das culturas é extraído e a reação de PCR é realizada antes da observação dos efeitos citopáticos. Portanto, é um método capaz de detectar vírus infecciosos mesmo que não produzam efeito citopático (Fong e Lipp, 2005).

A sensibilidade obtida com o ICC-PCR é comparável com a obtida na segunda passagem da amostra em cultura celular. O ICC-PCR vem sendo descrito em estudos para detecção de enterovírus (Reynolds et al., 1996), vírus da hepatite A (Reynolds et al., 2001) e astrovírus (Grimm et al., 2004). Lee et al. demonstrou a detecção simultânea de enterovírus e adenovírus na mesma linhagem celular utilizando essa técnica.

Recentemente algumas variações dessa metodologia vem sendo utilizadas como uma técnica que combina o uso da cultura celular com RT-PCR para pesquisa de RNAm (RNA mensageiro) (Koo et al., 2003). Durante a infecção, o genoma viral é transcrito para o RNA mensageiro na célula hospedeira e usado para a síntese de proteínas virais ou na replicação do genoma. Assim a detecção do RNAm na célula hospedeira é um indicador da replicação e infectividade viral.

1.5 LEGISLAÇÃO

Nos Estados Unidos, coliformes totais e fecais são os organismos indicadores mais comumente usados em água de reúso como uma medida da eficiência da desinfecção, porém o uso desses indicadores na ocorrência e concentração de vírus e cistos de protozoários vem sendo questionada nos últimos anos visto que esses microrganismos são mais resistentes aos processos de tratamento da água e a degradação ambiental que os indicadores bacterianos.

Apesar das recomendações da USEPA, o estabelecimento das normas é de responsabilidade dos estados individuais, os quais assumem diferentes abordagens (Blumenthal et al., 2000; CMHC, 2005).

Alguns países possuem tratamentos adequados para os efluentes e parâmetros microbiológicos definidos. A Agência Nacional de Proteção Ambiental e o Departamento de Saúde Australiano estabelecem parâmetros microbiológicos utilizados na qualidade do tratamento da água destinada ao reúso em que são incluso além de indicadores bacterianos (10 *E.coli* por 100 mL), protozoários (1 protozoário por 50 L), helmintos (1 helminto por litro) e vírus (um vírus por 50 L). Na Tasmânia o monitoramento viral é proposto duas vezes ao ano.

O estado da Califórnia, apesar de não possuir parâmetros definidos para análise de patógenos virais propõe seu monitoramento. Por outro lado, o estado americano do Arizona apresenta parâmetros virais definidos para o reúso da água (CMHC, 2005).

Na Europa, o Reino Unido tem utilizado o efluente de águas residuais para aumentar o fluxo de rios e reservatórios. Para isso a qualidade da água utilizada é estritamente observada

incluindo o monitoramento de vírus bem como numerosos estudos sobre o impacto da reutilização no ambiente e saúde pública (Walker, 2001).

Recentemente, a Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, recomenda a realização de ensaios para detecção viral apenas em casos de surtos de doenças de veiculação hídrica. No que se refere a padrões de potabilidade recomenda-se apenas o monitoramento de vírus entéricos em pontos de captação de água de mananciais de superficiais de abastecimento com o intuito de avaliação de riscos biológicos. Portanto, para a avaliação da qualidade da água, não consta a definição dos vírus a serem monitorados e as metodologias a serem aplicadas na detecção viral.

Assim na maioria dos países não há critérios definidos na pesquisa de vírus em amostras ambientais e nem a recomendação de uma metodologia padrão para pesquisa de vírus em amostras de água.

No caso do lodo, na União Européia há 20 anos atrás foram estabelecidas diretrizes que estabelecem critérios para a redução de microorganismo patogênicos tipicamente encontrados no lodo como bactérias (*E.coli*, *Salmonella*), vírus (*Enterovirus*), protozoários (*Giardia*) e helmintos (*Ascaris*, *Toxacara*, *Taenia*) assim sugere que o lodo para ser considerado higienizado deve passar por processos de tratamento para apresentar uma redução de 10^4 desses microorganismos (Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction, 2001).

Outros países como a Austrália publicaram manuais com critérios para a aplicação e redução de contaminantes no lodo como o Guidelines for Sewage Systems Biosolids Management (2004). Esse guia sugere a redução de vírus e helmintos nos processos de tratamento para atender novas recomendações locais e jurisdições.

No Brasil, a Resolução nº 375 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), sobre o uso de lodo de ETE, entrou em vigor em setembro de 2006 e estabelece critérios e procedimentos para aplicação em áreas agrícolas, visando benefícios à agricultura, evitando riscos à saúde pública e ao ambiente. Esta resolução propõe critérios microbiológicos, incluindo parâmetros como a detecção de vírus entéricos (adenovírus, enterovírus, rotavírus e vírus da hepatite A) e o monitoramento viral da qualidade do lodo produzido no país onde os rotavírus e adenovírus foram designados como indicadores virais de contaminação. As metodologias propostas nesta resolução incluem métodos clássicos e moleculares, contudo a

eficiência de cada um na detecção dos vírus na matriz específica – lodo – não foi amplamente avaliada, mas se faz necessária.

Considerando a tendência das novas legislações incluírem os vírus entéricos como parâmetros para avaliação microbiológica é fundamental conhecer os limites de detecção dos diversos métodos disponíveis atualmente quando aplicados às matrizes ambientais. Assim, o presente estudo visa avaliar essas metodologias para subsidiar futuras normas que serão revisadas da legislação brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar metodologias clássicas e moleculares quanto a eficiência de detecção de adenovírus e rotavírus em amostras de água de reúso e de lodo provenientes de estações de tratamento de esgoto (ETE) do estado de São Paulo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de imunoperoxidase direta para adenovírus;
- Determinar o limite de detecção viral dos protótipos adenovírus e rotavírus nos métodos: PCR/RT-PCR, reação de imunoperoxidase direta, método de *Reed e Muench* para quantificação viral em culturas celulares (DICT₅₀) e PCR integrado a cultura celular (ICC-PCR/RT-PCR);
- Comparar as metodologias de PCR/RT-PCR, imunoperoxidase direta, cultura celular e ICC-PCR para detecção e quantificação de adenovírus e rotavírus nas matrizes ambientais;
- Determinar os índices de positividade e de negatividade de cada método proposto com base na pesquisa de adenovírus e rotavírus presentes naturalmente em amostras de água de reúso e de lodo de ETE;
- Avaliar estatisticamente a significância dos resultados obtidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

3.1.2 Água de reúso

No presente estudo foram coletadas 8 amostras de água destinada ao reúso contendo 4 litros cada para realização dos ensaios de semeadura experimental, essas foram coletadas na ETE ABC no mês de outubro de 2011. Vinte e cinco amostras de água de reúso, coletadas no período de janeiro de 2005 a novembro de 2006, previamente concentradas e disponíveis no banco de amostras do Laboratório de Vírus Entéricos Humanos e Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) foram gentilmente cedidas pela Dra. Patrícia Garrafa para verificar a aplicabilidade das metodologias propostas.

Todas as amostras são oriundas de estação de tratamento de esgoto (ETE) localizada entre os municípios de São Paulo e São Caetano do Sul que recebe esgoto doméstico das cidades de Santo André, São Bernardo, Diadema, São Caetano, Mauá e parte de cidade de São Paulo.

O esgoto entra na estação e passa pela estação elevatória final, em seguida se inicia o tratamento primário em que o esgoto passa por grades médias mecanizadas, tanques de areia e decantador primário. O efluente proveniente do decantador primário é bombeado para tanques de aeração e em seguida para os decantadores secundários. Nessa etapa apenas uma parte do efluente vai para a Estação de Condicionamento para Reúso (ECR) onde é realizada a filtragem grosseira com filtro cesto, pré-cloração com hipoclorito de sódio, coagulação e floculação com policloreto de alumínio, filtragem fina por filtro de pressão de dupla camada (areia, antracito e pedregulho), filtro cartucho (1 µm) e pós-cloração com hipoclorito de sódio.

As amostras de água foram transportadas ao laboratório em frascos de vidro, esterilizados e mantidos a temperatura ambiente.

3.1.2 Lodo de ETE

Um total de 25 amostras de lodo obtidas de diferentes estações de tratamento de esgoto no estado de São Paulo no período de 2009 a 2010 (Quadro 4) e disponíveis no banco de amostras do Laboratório de Vírus Entéricos Humanos e Animais (ICB-USP), foram utilizadas

para ensaios de semeadura experimental e também para verificar a aplicabilidade das técnicas propostas.

Quadro 4- Processos de tratamento adotados nas diferentes ETEs de São Paulo selecionadas para este estudo.

ETE	Nº. de amostras	Processo de tratamento		Adiciona ao processo de condicionamento		
		Fase líquida	Fase sólida	Cal	FeCl ₃	Polímero
A	4	Filtro biológico	Digestor, centrífuga e leito de secagem	-	-	Sim
B	4	Lagoas Aeradas de Mistura Completa seguidas de Lagoas de Sedimentação.	Centrífuga e secagem ao ar em leiras com revolvimento	-	-	Sim
C	4	Lodo ativado com aeração prolongada	Polímero catiônico e prensa desaguadora	-	-	Sim
D	8	Lodo ativado convencional	Digestor e filtro esteira	-	Sim	Sim
E	3	Lodo ativado convencional	Digestor e filtro prensa	-	Sim	Sim
F	2	Lodo ativado convencional	Digestor e filtro prensa	Sim	Sim	-

As amostras foram escolhidas de acordo com a quantidade de material disponível para a realização dos diversos ensaios.

3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REÚSO

3.2.1 Concentração viral por filtração

As partículas virais foram concentradas através de um sistema de filtração seguindo o método de concentração viral proposto por Mehnert et al. (1997), com modificações (Queiroz et al., 2001). O sistema de filtração é composto por membrana Zeta Plus 60S (AMF, Cuno Div., Meridenn, Conn.), constituída por celulose e terra de diatomáceas, carregadas positivamente, com microporosidade de 3,0 µm e um pré-filtro AP-20 (Millipore Corp. Belford, Mass.) em microfibra de vidro com porosidade de 0,45 µm, acomodados em um

aparelho de filtração de aço inoxidável com diâmetro de 293 mm (Millipore®), acoplado a uma bomba de pressão e a um tanque pressurizado de aço inoxidável com capacidade de 20 litros (Millipore®).

O pH das amostras foi ajustado para 6,0 e um volume de 1 litro de água destilada foi aplicado a membrana para a remoção da citotoxicidade e ativação das cargas elétricas na membrana (Queiroz et al., 2001). Em seguida a amostra foi filtrada em fluxo contínuo e os vírus adsorvidos a membrana foram eluídos em 100 mL de solução protéica de extrato de carne (Difco™ Beef Extract, Le pont de Claix, France) a 3% e glicina 0,05 M pH 9,0 (Ajinomoto, Americana, SP). Após a permanência da solução protéica em contato com a membrana por 10 minutos, esta foi filtrada e o pH da amostra foi ajustado para 7,0.

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO

As amostras foram processadas de acordo com a metodologia proposta por Ahmed e Sorensen (1995) e modificada por Barrella (2008).

A partir do teor de sólidos totais dos lodos, dado fornecido pelas ETEs de origem, foi calculada a massa em gramas da amostra equivalente a 12 g de sólidos totais. Esse valor é calculado aplicando a fórmula (USEPA, 2003):

$$X = \frac{12 \text{ g} \times 100}{\%ST}$$

Sendo:

X = massa de amostra a ser pesada

ST = teor estimado de sólidos totais em porcentagem

A massa de lodo foi macerada em um almofariz até reduzir significativamente os grumos. Em seguida, as partículas virais foram eluídas com solução protéica de extrato de carne (Difco™ Beef Extract, Le pont de Claix, France) a 3% e glicina 0,05M em pH 9,0 (BE-GLY). A solução BE-GLY foi adicionada a amostra numa proporção de 1:4 e submetida a agitação magnética (agitador modelo 263, Fanem, São Paulo) por aproximadamente 20 minutos. Em seguida a amostra foi clarificada por centrifugação a 5500 x g a 4 °C por 15 minutos (RC3C,

Sorval, Waltham, MA) utilizando rotor H6000A. Após decantação, o pH do sobrenadante foi ajustado para 7,0 com solução de HCl 6N.

3.4 RECONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO

As suspensões virais obtidas a partir da água de reúso (seção 3.2.1) e de lodo (seção 3.3), foram reconcentradas por ultracentrifugação a 100.000 x g por 2 horas a 4°C em ultracentrífuga L8-70M (Beckman®) utilizando o rotor SW 28 (Mehnert e Stewien, 1993). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em tampão 1 M pH 7,2.

3.5 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM VERTREL-XF® E ANTIBIÓTICOS

As amostras reconcentradas foram purificadas por tratamento com Vertrel-XF (1,1,1,2,3,4,4,5,5,5,5,-decafluoropentano, Clarus®, Hortolândia, SP) (Queiroz et al., 2001).

As amostras foram misturadas volume a volume com Vertrel-XF® e em seguida homogeneizadas em agitador mecânico Genie 2® (Fisher Vortex) por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos na centrífuga para microtubos 5415C (Eppendorf®). Em seguida o sobrenadante foi colhido cuidadosamente e o procedimento repetido por duas ou três vezes. Os sobrenadantes foram então descontaminados com antibióticos (1.000 UI de penicilina/mL e 1000 µg de estreptomicina/mL) e estocados a -20°C até o momento de uso.

3.6 CÉLULAS E PROTÓTIPOS VIRAIS

3.6.1 Linhagens celulares

HEp-2. Células de linhagem estabelecida de carcinoma epidérmico da laringe (ATCC, 2008c) foram cedidas pela Profa. Dra. Charlotte Marianna Hársi, do Laboratório de Biologia Molecular de Adenovírus (ICB - USP). Essas células foram utilizadas para o cultivo do protótipo viral adenovírus tipo 5 e para a detecção de adenovírus infecciosos presentes nas amostras.

MA-104. Células de linhagem estabelecida de rim fetal de macaco verde africano foram utilizadas para o cultivo do protótipo viral rotavírus símio e para detecção de rotavírus infecciosos presentes na amostras.

3.6.2 Protótipos Virais

Rotavírus. O protótipo viral SiRV-A/SA-11, foi cedido pela Profa. Dra. Charlotte Marianna Hársi, do Laboratório de Biologia Molecular de Adenovírus (ICB - USP) e foi utilizado nos ensaios de detecção e quantificação dos rotavírus.

Adenovírus. O protótipo viral HAdV-5, cedido pela Dra. Charlotte M. Hársi do Laboratório de Biologia Molecular de Adenovírus (ICB/USP) foi utilizado nos ensaios de detecção e quantificação de adenovírus.

3.7 SUBCULTIVO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES

As células foram mantidas em garrafas plásticas de 75 cm² com Meio Eagle Mínimo Essencial (MME), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Campinas, Brasil) e solução de antibióticos (P/E; Penicilina 1.000UI e Estreptomicina 1.000 µg/mL) e incubadas a 37 °C. No subcultivo, o meio de cultura das linhagens foi decantado e a monocamada celular lavada rapidamente com aproximadamente 7,0 mL de solução de tripsina a 0,25% (1: 250 Difco) acrescida de EDTA 0,02%. Posteriormente a solução foi descartada e as células ressuspensas em 3 mL de meio MME com 10% de SFB e 1% de P/E. Essa suspensão foi distribuída em três novas garrafas de 75 cm² e o meio completado para 20 mL em cada uma delas. Em seguida as células foram incubadas a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂.

3.8 PREPARO DAS SUSPENSÕES DOS PROTÓTIPOS VIRAIS

Os adenovírus e rotavírus foram cultivados nas linhagens celulares HEp-2 e MA-104, respectivamente, visando à obtenção de grandes volumes de suspensão viral.

As células cultivadas conforme descrito no item 3.7, foram inoculadas com um volume de 2 mL da suspensão viral e incubadas por 1 hora a 37 °C para a adsorção viral. Após este período, o volume foi completado com meio MME e sem SFB e as células foram novamente incubadas a 37 °C. Para os rotavírus o meio MME foi acrescido de tripsina (10 µg/mL).

Após o aparecimento de efeito citopático em aproximadamente 75% das células, as culturas foram congeladas a -20 °C até o momento de uso.

Os vírus foram liberados do interior das células infectadas através de três ciclos de congelamento e descongelamento a -20 °C. A suspensão viral foi concentrada por

ultracentrifugação conforme descrito no item 3.4. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de meio MME sem SFB, descontaminado com antibióticos (Penicilina G 1000U/mL e Estreptomicina 1000 µg/mL) conforme descrito no item 3.5 e estocado a -20 °C até o momento do uso.

3.9 TITULAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE PROTÓTIPOS VIRAIS

3.9.1 Adenovírus (HAdV-5)

A titulação foi realizada por meio de microtécnica (Hawke, 1979). Um volume de 100 µL de suspensão de células HEp-2, contendo 200.000 células/mL, foi depositado nas cavidades de uma placa de microtitulação com 96 cavidades (TPP®, Trasadigen, Suíça). As culturas foram incubadas em câmara úmida a 37 °C em 5% de CO₂ até confluência de 75% da monocamada celular (entre 18 e 20 horas). Diluições seriadas na base 10 da suspensão viral, variando de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰, foram preparadas em meio MME sem SFB e 50 µL de cada diluição foram acrescidos em quadruplicada às células previamente cultivadas. Às cavidades controle (não inoculadas) foram adicionados 50 µL de meio MME.

As culturas foram incubadas por 1 hora em câmara úmida a 37 °C a 5% de CO₂ para adsorção viral. Após esse período o volume de cada cavidade foi completado com 50 µL de meio MME com 1% de antibiótico P/E (item 3.5). Em seguida a microplaca foi mantida em câmara úmida a 37 °C por um período de 5 a 7 dias. As células foram observadas diariamente ao microscópio invertido para a constatação dos efeitos citopáticos. O título foi determinado pelo método de *Reed e Muench* e expresso em doses infectantes 50% por volume, DICT₅₀/50µL.

3.9.2 Rotavírus (SiRV-A/SA-11)

A titulação de rotavírus foi realizada através da reação de imunoperoxidase direta (Mehnert e Stewien, 1993).

Células da linhagem MA-104 foram cultivadas e inoculadas com diluições seriadas de rotavírus conforme descrito no item 3.9.1 preparadas com meio MME, sem SFB, acrescido de tripsina (10 µg/mL).

Após o período de incubação de 18 horas o meio de cultura foi cuidadosamente desprezado e a monocamada celular foi fixada com um volume de aproximadamente 100 µL por cavidade solução de formaldeído 3% preparado em tampão fosfato 0,01 M pH 7,2. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, o fixador foi decantado e repetiu-se nova fixação com formaldeído 3% preparado em PBS 0,01 M pH 7,2 acrescido de peróxido de hidrogênio 30 V (V/V) também num volume aproximado de 100 µL por cavidade. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, o fixador foi decantado e as células incubadas com 100 µL de solução de Triton X-100 (Sigma-Aldrich®, Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) a 1% por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram lavadas duas vezes com tampão fosfato 0,01 M pH 7,2 e uma vez com tampão fosfato 0,15 M, Tween 20 a 0,05% e albumina bovina a 1% (PBS-T-BSA).

O soro de coelho anti-rotavírus conjugado com peroxidase (Anti-Rotavirus NCDV (HRP) Polyclonal Antibody; THERMO SCIENTIFIC) foi diluído a 1:50 em tampão fosfato-Tween-albumina (PBS-T-BSA). Um volume de 50 µL do soro conjugado foi acrescido a cada cavidade e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. Para os controles foram utilizadas cavidades contendo células não inoculadas acrescidas do soro. Após a incubação, o soro foi decantado e as monocamadas celulares lavadas duas vezes com PBS 0,01 M pH 7,2.

A reação foi revelada através de uma solução contendo o cromógeno AEC (3-amino-9- etilcarbazol - Sigma Co. S. Louis, EUA) na concentração de 10 mg/mL, tampão de ELISA pH 5,5 (Ácido Cítrico, Na₂HPO₄.H₂O) e peróxido de hidrogênio 30 V a 2%. A reação enzimática foi interrompida com a lavagem das monocamadas celulares com água destilada. As células infectadas foram visualizadas por microscopia óptica e o número de partículas virais presentes calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{UFF}/50 \mu\text{L} = \text{Média UFF}/50\mu\text{L} \times \text{fator diluição}$$

Os resultados obtidos foram expressos em unidades formadoras de foco por 50 µL (UFF/50 µL).

3.10 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE DIRETA PARA DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS

A padronização dessa técnica para detecção e quantificação de adenovírus foi baseada no método descrito por Mehnert e Stewien (1992).

3.10.1 Titulação em bloco do soro anti-adenovírus conjugado com peroxidase

Culturas celulares da linhagem HEp-2 foram preparadas e inoculadas com suspensão de adenovírus padrão conforme apresentado no item 3.9.1. Em seguida as culturas foram fixadas após um período de incubação de 18 horas conforme descrito no item 3.9.2.

O soro de coelho anti-adenovírus conjugado com peroxidase (Anti-Adenovirus Polyclonal Antibody, HRP Conjugate; THERMO SCIENTIFIC) foi titulado em bloco frente a diluições de fator 10 da suspensão viral (10^{-1} a 10^{-10}).

Diluições do soro conjugado de 1:20, 1:40, 1:60 e 1:80 foram previamente preparadas em PBS-T-BSA. Um volume de 50 μ L do soro conjugado foram acrescentados a cada cavidade e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. Para os controles foram utilizadas cavidades contendo células não inoculadas acrescidas do soro.

Após a incubação, a realização da reação de imunoperoxidase direta foi realizada conforme descrito na seção 3.9.2.

3.10.2 Cinética de infecção dos adenovírus in vitro

Para estabelecimento do tempo ideal pós-infecção (pi) para fixação das células infectadas foram realizados experimentos de cinética.

Várias culturas celulares foram previamente preparadas e inoculadas com HAdV-5 conforme descrito na seção 3.9.1. As culturas foram incubadas em câmara úmida a 37 °C em 5% CO₂ e fixadas 16, 18, 20 e 22 horas pi. A presença das proteínas virais foi revelada pela reação de imunoperoxidase direta conforme descrito na seção 3.9.2.

3.10.3 Absorção de imunoglobulinas inespecíficas do soro com papa de células

Para preparar a papa de células, uma monocamada celular da linhagem HEp-2 formada em garrafa de 25 cm² foi tripsinizada com 3 mL de solução de tripsina a 0,25% acrescida de EDTA 0,02%. Posteriormente a solução foi descartada e as células ressuspensas em 3 mL de meio MME com 2% de SFB. As células foram então transferidas para um tubo Falcon[®] de 15 mL e centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos na temperatura ambiente. O sobrenadante foi decantado e o sedimento ressuspenso em 15 mL de PBS 0,01 M pH 7,5 e submetido novamente à centrifugação. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi misturado ao soro anti-adenovírus conjugado previamente diluído a 1:20 em solução de PBS/T/BSA.

A mistura foi incubada por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Após este período, as células foram removidas por centrifugação a 2000 rpm a 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido e estocado a -4 °C até o momento de uso. Os ensaios de cinética foram repetidos com esse soro conforme descrito na seção 3.10.2.

3.11 DETERMINAÇÃO DO LIMAR DE DETECÇÃO VIRAL DAS METODOLOGIAS CLÁSSICAS E MOLECULARES UTILIZANDO OS PROTÓTIPOS VIRAIS NO MEIO DE CULTURA E NAS MATRIZES ÁGUA DE REÚSO E LODO DE ESGOTO

3.11.1 Metodologias clássicas

3.11.1.1 Cultura celular

Culturas de células HEp-2 e MA-104 foram preparadas e inoculadas em quadruplicata com diluições seriadas da suspensão do protótipo viral HAdV-5 e SiRV-A/SA-11 respectivamente conforme descrito no item 3.9.1 com o intuito de determinar o limiar de detecção dessa técnica no meio de cultura e nas diferentes matrizes ambientais (lodo e água de reúso).

O título foi determinado pelo método de *Reed e Muench* e expresso em doses infectantes 50% por volume, $\text{DICT}_{50}/\mu\text{L}$.

3.11.1.2 Reação de imunoperoxidase direta (IPX)

Células da linhagem HEp-2 e MA-104 foram cultivadas e inoculadas em quadruplicata com diluições na base 10 de adenovírus e rotavírus respectivamente variando de 10^{-1} a 10^{-10} , conforme descrito no item 3.9.1. Após a incubação de 18 horas a realização da reação de imunoperoxidase direta foi realizada conforme descrito na seção 3.9.2 e 3.10.

As células infectadas foram visualizadas por microscopia óptica e o número de partículas virais presentes calculado onde os resultados obtidos foram expressos em unidades formadoras de foco por μL (UFF/ μL).

3.11.2 Metodologias moleculares

3.11.2.1 Extração do material nucléico viral

A extração do material genético de adenovírus (DNA) e rotavírus (RNA) foi realizada utilizando reagente TRIzolTM (InvitrogenTM, Carlsbad, Califórnia), conforme instruções do fabricante.

3.11.2.1.1 Extração de DNA

Um volume de 300 μL de cada diluição de vírus padrão (item 3.8) foi misturado com 900 μL de TRIzolTM e após incubação de 5 minutos a temperatura ambiente foram adicionados 240 μL de clorofórmio absoluto. As amostras foram homogeneizadas em Vortex-XF[®] por 15 segundos, incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguidas centrifugadas a 11.000 x g por 15 minutos a 4 °C em centrífuga para microtubos (Hettich Eba 12 R, Sigma[®]). O DNA viral foi recuperado da fase fenólica e da interfase, com solução de etanol seguido de centrifugação. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido ressuspendido em 500 μL de solução de citrato de sódio, incubado por 30 minutos à 25 °C. A lavagem com a solução de citrato foi repetida por mais duas vezes e em seguida o

DNA foi precipitado em etanol 75%. O DNA foi ressuspensionado em 50 µL de NaOH 8mM e mantido a -20 °C até o momento de uso.

3.11.2.1.2 Extração de RNA

O RNA presente na fase aquosa das amostras, obtidas conforme descrito no item anterior, foi precipitado em isopropanol e centrifugado a 11.000 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com solução de etanol a 75% e centrifugado a 8.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Após a total evaporação do etanol, o RNA foi ressuspensionado em 50 µL de dietilpirocarbonato 0,01% (DEPC, Sigma[®]) e usado em seguida para síntese de cDNA.

3.11.2.2 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para as reações de PCR, RT-PCR, *nested* – PCR são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Sequência e posição dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação gênica de adenovírus e rotavírus.

Oligonucleotídeos	Posição (nt)	Sequência (5' – 3')	Fragmento	Referências
Adenovírus				
PCR				
HexAA 1885	18.858-18.883	5'-GCC GCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C-3'	300 pb	Allard et al. (1990)
Hex AA 1913	19.136-19.158	5'-CAG CAC GCC GCG GAT GTC AAA GT-3'		
Nested – PCR				
nehexAA1893	18.937-18.960	5'-GCC ACC GAG ACG TAC TTC AGC CGT-3'	142 pb	Allard et al. (1992)
nehexAA1905	19.051-19.079	5' – TTG TAC GAG TAC GCG GTA TCC TCG CGG TC-3'		
Rotavírus				
Rotavírus foward	1.038- 1.058	5' –GGA CGC CGC ACT AGA TCA ATT – 3'	108 pb	Espinosa et al. (2008)
Rotavírus reverse	1.168- 1.146	5'- GGT CAT CAT GCT TTA CTG GTT CC – 3'		

3.11.2.3 Reação de PCR para detecção de adenovírus

A reação de PCR foi realizada segundo parâmetros descritos por Allard et al. (1990) e modificados por Santos et al. (2004).

Para determinação do limiar de detecção dessa técnica diluições seriadas em quadruplicata na base 10 de adenovírus variando de 10^{-1} a 10^{-10} , conforme descrito no item 3.9.1 foram realizadas.

Uma mistura de reagentes foi preparada contendo as seguintes concentrações: 100 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos (hexAA1985 e hexAA1913), dNTP a 10 mM (InvitrogenTM), 1U da enzima DNA polimerase *Thermus thermophilus* (Biotools[®]), tampão de reação (Tris HCl 7mM, KCl 50mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM), 1,5 mM de MgCl_2 e água ultrapura (MilliQ[®]) tratada com DEPC a 0,01 % (Sigma[®]) para um volume final de 50 μL . Uma alíquota de 7 μL do DNA extraído das amostras (item 3.10.2.1.2) foi acrescida à mistura de reagentes. Como controle negativo da reação foram adicionados 5 μL de água ultrapura (MilliQ[®]).

A reação foi realizada no termociclador *Mastercycle Gradient* (Eppendorf[®]). A etapa da desnaturação das fitas de DNA foi realizada a 94 °C/4 min. seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C/1 min., anelamento a 56° C/1 min e extensão a 72 ° C/1 min. A extensão final foi realizada a 72 °C por 5 min.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Gibco, Carlsbad, Califórnia, USA) a 1,5% em tampão Tris acetato 1X (TAE; 40 mM Tris-acetato, ácido acético 20 mM, EDTA 0,5 M pH 8,0) contendo 4 μL de brometo de etídeo a 5 mg /mL (InvitrogenTM). A corrida eletroforética foi realizada em cuba de eletroforese horizontal, contendo tampão TAE 1x, sob tensão de 80 volts. Após o período de uma hora e trinta minutos de corrida, a presença dos fragmentos foi evidenciada por exposição a luz U.V e o gel documentado em fotografias digitais utilizando o equipamento de captura de imagens Vilber Lourmat (Fotodocumnetador Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, França).

3.11.2.4 Reação de nested - PCR para detecção de adenovírus

Para confirmar a especificidade da reação as amostras foram submetidas a *nested*-PCR seguindo parâmetros descritos por Allard et al. (1992) . Os mesmos reagentes da reação de

PCR descrito na seção 3.10.2.3 foram utilizados na reação, com exceção dos oligonucleotídeos. Assim 100 pmoles do oligonucleotídeo nehex1905, 100 pmoles do oligonucleotídeo nehexAA1893 e 7 µL do produto amplificado da primeira reação foram adicionados a mistura para um volume final de 50 µL. Como controle positivo da reação foram adicionados 5 µL de DNA extraído do protótipo padrão HAdV-5 e, como controle negativo, 5 µL de água ultrapura (MilliQ®). A reação foi realizada no termociclador *Mastercycle Gradient* (Eppendorf®). A etapa da desnaturação das fitas de DNA foi realizada a 94 °C/4 min. seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C/1 min., anelamento a 57,2 °C/1 min e extensão a 72 °C/45 segundos. A extensão final foi realizada a 72 °C por 5 min.

Os produtos obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e os fragmentos amplificados evidenciados após exposição a luz U.V, conforme descrito na subseção 3.11.2.3

3.11.2.5 Reação de transcrição reversa e de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para detecção de rotavírus

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando parâmetros descritos por Espinosa et al. (2008) com modificações.

Para determinação do limiar de detecção dessa técnica, diluições seriadas em quadruplicata na base 10 de rotavírus variando de 10^{-1} a 10^{-10} , conforme descrito na seção 3.9.1 foram realizadas.

Para transcrição do genoma do vírus em fitas de DNA complementar foram utilizados como reagentes desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP - 10 mM), tampão 5X RT(250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂, Invitrogen™), 0,1 M de Dithiotreitol (DTT, Invitrogen™), 100 pmoles dos oligonucleotídeos rotavírus forward e rotavírus reverse e água ultrapura para um volume final de 25 µL. Uma alíquota de 10 µL da amostra foi adicionada. A mistura foi submetida a 99 °C por 4 minutos e transferida imediatamente para o gelo. A transcrição do genoma de rotavírus foi realizada com a adição de 2,5 U da enzima transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney, MMLV-RT (Invitrogen™) e a mistura permaneceu por 38 minutos a 48 °C e 10 minutos a 95 °C. O produto da reação (cDNA) foi utilizado na reação de PCR.

Para reação de PCR, uma mistura de reagentes foi preparada contendo as seguintes concentrações: 100 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos (rotavírus forward e rotavírus

reverse - gene bank VP1), dNTP a 10 mM (InvitrogenTM), 1U da enzima DNA polimerase *Thermus thermophilus* (Biotools[®]), tampão de reação (Tris HCl 7mM, KCl 50mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM), 1,5mM de MgCl₂ e água ultrapura (MilliQ[®]) tratada com DEPC a 0,01 % (Sigma[®]) para um volume final de 50 µL. Uma alíquota de 7 µL do cDNA da amostra foi acrescida à mistura de reagentes. Como controle negativo da reação foram adicionados 5 µL de água ultrapura (MilliQ[®]).

A reação foi realizada no termociclador *Mastercycle Gradient* (Eppendorf[®]). A etapa da desnaturação das fitas de DNA foi realizada a 95 °C/10 min. seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C/15 segundos, anelamento a 61 °C/1 min e extensão a 72 °C/1 min. A extensão final foi realizada a 72 °C por 7 min.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo (5 mg /mL) conforme descrito na seção 3.11.2.3.

3.11.2.6 Método de ICC-PCR/RT-PCR para detecção de adenovírus e rotavírus

A técnica de ICC-PCR/RT-PCR foi realizada de acordo Chapron et al. (2000). As culturas celulares foram preparadas e inoculadas com adenovírus e rotavírus conforme descrito nos itens 3.9.1 e 3.9.2 respectivamente.

As diluições presentes nas quatro cavidades foram submetidas a extração do material genético viral conforme descrito nas seções 3.11.2.1.1 e 3.11.2.1.2. Posteriormente esse material genético foi amplificado através da reação de PCR/RT-PCR conforme descrito nas seções 3.11.2.1.3 e 3.11.2.1.5 para confirmação da positividade das amostras.

3.12 ENSAIOS DE SEMEADURA EXPERIMENTAL NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REÚSO

Os ensaios de semeadura experimental foram realizados em quadruplicata. Oito amostras de água destinada ao reúso contendo um volume de 4 litros cada foram autoclavadas a 121 °C por 75 minutos conforme descrito por Queiroz et al. (2001). Ao atingirem a temperatura ambiente, quatro amostras foram semeadas com suspensão padrão HAdV-5 (10^{7,5} DICT₅₀/50 µL) e as quatro amostras restantes foram semeadas com suspensão padrão SiRV-A/SA-11(10^{5,5} DICT₅₀/50 µl) e mantidas sob agitação magnética constante por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a agitação magnética, o pH das amostras foi ajustado para 6,0 e

as partículas virais foram então concentradas conforme descrito nas subseções 3.2.1 e 3.4. perfazendo um fator de concentração de 4.000 vezes. Após isso as amostras foram tratadas com Vertrel XF[®] e antibióticos conforme descrito na seção 3.5.

3.13 ENSAIOS DE SEMEADURA EXPERIMENTAL NAS AMOSTRAS DE LODO

Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando o volume correspondente a 12 g de amostra de lodo não autoclavado que através da técnica de PCR apresentou negatividade para detecção de adenovírus e rotavírus. As triplicatas foram semeadas experimentalmente com 50 µL da suspensão do protótipo viral HAdV-5 (10^7 DICT₅₀/50µL) e 100 µL com a suspensão viral SiRV-A/SA-11($10^{5.5}$ DICT₅₀/50µL). O processamento das amostras seguiu a metodologia descrita nas seções 3.3 e 3.4. Após isso as amostras foram tratadas com Vertrel XF[®] e antibióticos conforme descrito na seção 3.5.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar a associação entre a presença de vírus, o tipo de material coletado, no caso a água destinada ao reúso e o lodo de esgoto foram realizadas comparações das diferentes metodologias empregadas.

4 RESULTADOS

4.1 TITULAÇÃO DO PROTÓTIPO VIRAL HAdV-5

As células infectadas pelo protótipo viral HAdV-5 apresentaram 7 dias pós-infecção alterações morfológicas sugestivas caracterizadas por arredondamento celular, aumento do volume citoplasmático e agrupamento de células em forma de cachos como pode ser observado nas Figuras 3B e 3C. Esse aspecto celular diferiu do apresentado pelas células não infectadas, as quais mantiveram morfologia poligonal, constituindo uma camada confluenta (Figura 3A).

Figura 3- Células HEp-2 não infectadas (A) e infectadas com o protótipo viral HAdV-5 observadas no microscópio no quarto (B) e sétimo dia (C) pós-infecção. Aumento de 200x.

Fonte: Umeda (2012).

O título viral, calculado pelo método de *Reed e Muench*, foi de $10^{7.5}$ DICT₅₀/50μL da suspensão viral.

4.2 TITULAÇÃO DO PROTÓTIPO VIRAL SiRV-A/SA-11

4.2.1 Cultivo celular

O protótipo viral SiRV-A/SA-11 foi titulado na sua décima passagem em linhagem MA-104 (T10) e o título viral, calculado pelo método de *Reed e Muench*, foi de $10^{5.5}$ DICT₅₀/50μL da suspensão viral.

4.2.2 Reação de imunoperoxidase

O protótipo viral SiRV-A/SA-11, também na sua décima passagem em culturas celulares (T10) foi titulado por meio de técnica de imunoperoxidase direta. A presença do rotavírus nas células infectadas foi revelado pelo citoplasma intensamente corado, sem envolvimento nuclear e com a presença de grânulos situados na região perinuclear (Mehnert e Stewien, 1993) como podemos observar na Figura 4 (seta). Células não infectadas não apresentam coloração.

Figura 4- Detecção de rotavírus em células MA-104 pela técnica de imunoperoxidase direta. (A) Células não infectadas e (B, C) células infectadas por rotavírus. Aumento de 400x.

Fonte: Umeda (2012).

O número de unidades formadoras de foco determinada matematicamente foi de $7,5 \times 10^4$ UFF de rotavírus em 50 μ L da suspensão viral.

4.3 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE DIRETA PARA ADENOVÍRUS

A titulação em bloco do soro de coelho anti-adenovírus conjugado com peroxidase mostrou que apenas a diluição 1: 20 apresentou marcação das proteínas virais possíveis de serem visualizadas. Mesmo assim, os resultados iniciais não foram fidedignos devido a marcação simultânea no núcleo e no citoplasma das células infectadas, bem como marcação inespecífica de células não infectadas.

Em face aos resultados observados neste ensaio realizado primeiramente com período pós infecção de 18 horas, fez-se necessária a realização de uma cinética para estabelecer o período ideal pós-infecção para detecção das proteínas virais ainda no citoplasma.

Assim, vários períodos de tempo foram avaliados e alguns resultados são apresentados na Figura 5.

Através das imagens podemos observar que houve variação nos padrões de marcação nos diversos tempos de incubação. No tempo de incubação de 16, 18 e 20 horas (Figura 5A, 5B e 5C) algumas células infectadas apresentaram uma marcação somente no citoplasma enquanto outras apresentaram marcação apenas no núcleo. Já no período de 22 horas de incubação as células apresentaram um padrão de marcação localizado no núcleo celular (Figura 5D). Porém, devido a intensa coloração de fundo presente nas reações, incluindo em células não infectadas (Figura 5E) os experimentos não foram conclusivos.

Figura 5- Resultados da cinética da infecção de adenovírus em células HEp-2 revelada por reação de imunoperoxidase direta. Células infectadas por 16 h (A), 18 h (B), 20 h (C) e 22 h (D) e células não infectadas (E). Aumento 200X.

Fonte: Umeda (2012).

Esta coloração de fundo foi atribuída ao excesso de peroxidase endógena nas células que não foi totalmente esgotada durante o processo de fixação das culturas. Os ensaios foram repetidos, com maior esgotamento da peroxidase endógena, mas sem que houvesse alteração nos efeitos observados.

Assim, a hipótese da presença de possíveis anticorpos anti-HEp-2 que ainda estariam presentes no soro comercial, por ser policlonal foi cogitada. Portanto, com o intuito de diminuir a inespecificidade do soro foi realizada a absorção do soro conjugado com papa de células HEp-2. Esse conjugado depois de tratado foi utilizado novamente na diluição 1:20 em uma nova reação de imunoperoxidase direta, porém as células não infectadas usadas como controle da reação continuaram a reagir com esse anticorpo apresentando uma coloração de fundo.

Portanto concluímos que o soro utilizado não é recomendável e devido a esse problema os ensaios ainda não foram conclusivos.

4.4 DETERMINAÇÃO DO LIMAR DE DETECÇÃO DAS METODOLOGIAS CLÁSSICAS E MOLECULARES UTILIZANDO O PROTÓTIPO VIRAL HAdV-5

O limiar de detecção da técnica de cultivo celular foi determinado após um período de sete dias quando foi possível observar a presença de efeito característico de adenovírus até a diluição 10^{-7} , equivalendo ao título de $10^{7.5}$ DICT₅₀/50 μ L e a uma dose infectante viral.

Pela reação de PCR foi observada a amplificação do produto esperado de 300 pb na diluição 10^{-8} do template equivalendo a 1 unidade de PCR (UPCR) como podemos observar na Figura 6.

Figura 6- Determinação do limiar de detecção da técnica de PCR, utilizando o protótipo viral HAdV-5. Marcador de peso molecular: DNA *ladder* de 100 pb (L); Controle negativo(C-). Gel de agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídeo.

Fonte: Umeda (2012).

A detecção de adenovírus pela reação de ICC-PCR mostrou-se mais eficiente do que a detecção baseada na visualização do ECP, pois possibilitou a detecção de vírus até a diluição 10^{-8} , bem além da diluição end-point (10^{-7}) como podemos observar na Figura 7.

Figura 7- Determinação do limiar de detecção da técnica de ICC-PCR utilizando o protótipo viral HAdV-5. Marcador de peso molecular DNA *ladder* de 100 pb (L). Gel de agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídeo.

Fonte: Umeda (2012).

Esse resultado nos mostra que utilizando essa técnica foi possível a detecção de 0,1 dose infectante viral na diluição 10^{-8} da suspensão viral. A comparação dos limiares de detecção das diferentes técnicas empregadas para detecção de adenovírus podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3- Limiares de detecção das técnicas de cultura celular, PCR e ICC-PCR para o protótipo viral HAdV-5.

Diluição da suspensão viral HAdV-5	Cultura celular (DICT ₅₀)				PCR				ICC-PCR			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Não diluído	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-7}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-8}	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-9}	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10^{-10}	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*nd- não detectado

Fonte: Umeda (2012).

Portanto, com base nesses resultados obtidos concluímos que o limiar de detecção da técnica de ICC-PCR para adenovírus é 10 vezes maior que o limiar de detecção observado em cultura celular e semelhante ao limiar da técnica de PCR convencional.

4.5 DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE DETECÇÃO DAS METODOLOGIAS CLÁSSICAS E MOLECULARES UTILIZANDO O PROTÓTIPO VIRAL SiRV-A/SA-11

A técnica de cultivo celular, após um período de sete dias, revelou a presença de efeito citopático característico de rotavírus até a diluição 10^{-5} , que corresponde ao título de $10^{5,5}$ DICT₅₀/50 μ L e a uma dose infectante viral.

Nos ensaios de imunoperoxidase direta a presença de unidades formadoras de foco (UFF) foi revelada até a diluição 10^{-5} , perfazendo um total de $1,5 \times 10^5$ UFF/100 μ L.

A amplificação do produto esperado de 108 pb pela técnica de RT-PCR foi verificada até a diluição 10^{-6} equivalendo a 1 UPCR.

Já aplicando a técnica de ICC-RT-PCR, o limiar de detecção foi até a diluição 10^{-8} da amostra correspondendo a 0,001 dose infectante viral (DICT₅₀).

Figura 8- Determinação do limiar de detecção da técnica de RT-PCR e ICC-PCR utilizando o protótipo viral SiRV-A/SA-11. Marcador de peso molecular DNA *ladder* de 100 pb (L); Controle negativo (C-); Controle positivo (C+). Gel de agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídeo.

Fonte: Umeda (2012).

A comparação do limiar de detecção das técnicas aplicadas podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4- Determinação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, RT-PCR, ICC-RT-PCR e IPX direta, utilizando o protótipo viral SiRV-A/SA-11.

Diluição da suspensão viral SiRV-A/SA-11	Cultura celular ($DICT_{50}$) 1 2 3 4	RT-PCR				ICC-RT-PCR				IPX			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Não diluído	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-6}	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-7}	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+
10^{-8}	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+
10^{-9}	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10^{-10}	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*nd- não detectado.

Fonte: Umeda (2012).

Portanto, podemos concluir considerando os resultados apresentados que o limiar de detecção da técnica de ICC-RT-PCR para rotavírus é 100 vezes maior que o limiar de detecção observado na técnica de RT-PCR e 1000 vezes maior quando comparado a técnica de cultura celular e imunoperoxidase direta.

4.6 ENSAIOS DE SEMEADURA EXPERIMENTAL UTILIZANDO O PROTÓTIPO VIRAL HAdV-5

4.6.1 Água de reúso

A semeadura experimental das amostras de água de reúso com $10^{7.5}$ $DICT_{50}/50 \mu L$ da suspensão viral permitiu estabelecer o índice de recuperação viral após todo o processamento das amostras. A recuperação média obtida pelo método de concentração foi de 0,005% para a água de reúso. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Índice de recuperação do método de concentração viral aplicado a amostras de água de reúso.

Experimento	Adenovírus (DICT ₅₀ /50 µL)			
	Semeado	Recuperado	% de Recuperação	Média da recuperação (%) + DP
A	1 x 10 ^{7,5} /50 µL	10 ^{1,08} /50 µL	0,000038	0,005±0,00575
B	1 x 10 ^{7,5} /50 µL	10 ^{1,08} /50 µL	0,000038	
C	1 x 10 ^{7,5} /50 µL	1x 10 ^{3,5} /50 µL	0,01	
D	1 x 10 ^{7,5} /50 µL	1x 10 ^{3,5} /50 µL	0,01	

Fonte: Umeda (2012).

4.6.1.2 Determinação do limiar de detecção das técnicas clássicas e moleculares na matriz água de reúso

Os resultados dos ensaios de determinação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, PCR e ICC-PCR para adenovírus na matriz água de reúso podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Determinação e comparação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, PCR e ICC-PCR utilizando o protótipo viral HAdV-5 semeado experimentalmente em amostras de água de reúso. Resultado das quadruplicatas em cada ensaio.

Diluição da suspensão viral (HAdV-5)	Cultura celular (ECP)				PCR				ICC-PCR			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Não diluído	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻¹	nd	nd	+	+	nd	nd	+	+	+	+	+	+
10 ⁻²	nd	nd	+	+	nd	nd	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	nd	nd	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+
10 ⁻⁴	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+
10 ⁻⁵	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10 ⁻⁶	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10 ⁻⁷	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

* nd – não detectado.

Fonte: Umeda (2012).

Analisando os resultados apresentados acima, notamos que nos dois primeiros ensaios houve uma diminuição da quantidade viral quando comparado aos ensaios posteriores, essa perda provavelmente pode estar relacionada com uma das etapas da concentração viral.

Obsevando os resultados obtidos para cada uma das metodologias testadas, verifica-se que o limite de detecção da técnica de ICC-PCR é 10 vezes superior as técnicas de cultura celular e 100 vezes superior que a técnica de PCR convencional na matriz água de reúso.

4.6.2 Lodo

Os resultados dos ensaios de semeadura experimental realizados com amostra de lodo estão apresentados na Tabela 7. A taxa de recuperação dos $10^{7.5}$ DICT₅₀/50 µL da suspensão viral semeados foi avaliada em triplicata. A recuperação média obtida foi de 0,01% para lodo.

Tabela 7 - Índice de recuperação do método de concentração viral aplicado a amostras de lodo da ETE.

Experimento	Adenovírus (DICT ₅₀ /50 µL)			
	Semeado	Recuperado	% de Recuperação	Média da recuperação (%) + DP
A	$10^{7.5}$ /50 µL	$10^{3.5}$ /50 µL	0,01	0,01 ± 0
B	$10^{7.5}$ /50 µL	$10^{3.5}$ /50 µL	0,01	
C	$10^{7.5}$ /50 µL	$10^{3.5}$ /50 µL	0,01	

Fonte: Umeda (2012).

4.6.2.1 Determinação do limiar de detecção das técnicas clássicas e moleculares na matriz lodo

Os resultados dos ensaios de determinação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, PCR e ICC-PCR para adenovírus na matriz lodo podem ser observados na Tabela 8.

Analisando os resultados obtidos, observamos que na matriz lodo a técnica de ICC-PCR também apresentou um limite de detecção 10 vezes maior para adenovírus que a técnica de PCR e cultura celular, compatível com os resultados encontrados na detecção de adenovírus padrão.

Tabela 8- Determinação e comparação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, PCR e ICC-PCR utilizando o protótipo viral HAdV-5 semeado experimentalmente em amostras de lodo.

Diluição da suspensão viral (HAdV-5)	Cultura celular (ECP)			PCR			ICC-PCR		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Não diluído	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+
10 ⁻⁴	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10 ⁻⁵	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10 ⁻⁶	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10 ⁻⁷	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*nd – não detectado.

Fonte: Umeda (2012).

4.7 ENSAIOS DE SEMEADURA EXPERIMENTAL UTILIZANDO O PROTÓTIPO VIRAL SiRV-A/SA-11

4.7.1 Água de reúso

A semeadura experimental das amostras de água de reúso com $1,5 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ da suspensão viral da suspensão viral permitiu estabelecer o índice de recuperação viral após todo o processamento das amostras. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Índice de recuperação do método de concentração viral aplicado a amostras de água de reúso de uma das ETE do município de São Paulo.

Experimento	Rotavírus (UFF/100 μL)			
	Semeado	Recuperado	% de Recuperação	Média da recuperação (%) + DP
A	$1,5 \times 10^5/100 \mu\text{L}$	$3,5 \times 10^4$	23,3	23,7 $\pm$ 0,74106
B	$1,5 \times 10^5/100 \mu\text{L}$	$3,4 \times 10^4$	22,8	
C	$1,5 \times 10^5/100 \mu\text{L}$	$3,6 \times 10^4$	24,2	
D	$1,5 \times 10^5/100 \mu\text{L}$	$3,68 \times 10^4$	24,5	

Fonte: Umeda (2012).

A recuperação viral média obtida para rotavírus na matriz água de reúso foi de 23,7%.

4.7.1.2 Determinação dos limiares de detecção das técnicas clássicas e moleculares na matriz água de reúso

Os resultados obtidos nos ensaios de semeadura experimental na matriz água de reúso para rotavírus a fim de determinar o limiar de detecção das técnicas de cultura celular, PCR, ICC-RT-PCR e imunoperoxidase direta podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10 - Determinação e comparação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, RT-PCR, ICC-RT-PCR e imunoperoxidase direta utilizando o protótipo viral SiRV-A/SA-11 semeado experimentalmente em amostras de água de reúso.

Diluição da suspensão viral SiRV-A/SA-11	Cultura Celular (ECP)				RT-PCR				ICC-RT-PCR				IPX			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Não diluído	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻¹	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻²	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	nd	nd	nd	nd	-	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd
10 ⁻⁶	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd
10 ⁻⁷	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*nd – não detectado.

Fonte: Umeda (2012).

Analisando os resultados notamos que o limiar de detecção da técnica de ICC-RT-PCR é 10 vezes superior a técnica de RT-PCR convencional e 100 vezes superior que a técnica de imunoperoxidase direta. A técnica de cultura celular apresentou um baixo limiar de detecção devido a difícil visualização dos efeitos citopáticos, porém a infectividade viral foi confirmada pela técnica de imunoperoxidase direta.

4.7.2 Lodo

Os resultados dos ensaios de semeadura experimental realizados com amostra de lodo estão apresentados na Tabela 11. A taxa de recuperação dos 1,5 x10⁵ UFF/100 µL da suspensão viral semeados foi avaliada em triplicata.

A média de recuperação viral obtida para rotavírus na matriz lodo foi de 18,43 %.

Tabela 11 - Índice de recuperação do método de concentração viral aplicado a amostras de lodo de uma das ETE do município de São Paulo.

Experimento	Semeado	Rotavírus (UFF/100µL)			Média da recuperação (%) + DP
		Recuperado	% de Recuperação		
A	1,5x10 ⁵ /100 µL	2,86 x10 ⁴	19,06		18,43±0,98077
B	1,5x10 ⁵ /100 µL	2,84 x 10 ⁴	18,93		
C	1,5x10 ⁵ /100 µL	2,6 x10 ⁴	17,3		

Fonte: Umeda (2012).

4.7.2.1 Determinação dos limiares de detecção das técnicas clássicas e moleculares na matriz lodo

Os resultados referentes aos ensaios para a determinação dos limiares de detecção das técnicas de cultura celular, PCR, ICC-RT-PCR e imunoperoxidase direta para rotavírus na matriz lodo estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12- Determinação e comparação do limiar de detecção das técnicas de cultura celular, PCR, ICC-RT-PCR e imunoperoxidase direta utilizando o protótipo viral SiRV-A/SA-11 semeado experimentalmente em amostras de lodo.

Diluição da suspensão viral SiRV-A/SA-11	Cultura Celular (ECP)			RT-PCR			ICC-RT-PCR			IPX		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Não diluído	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻²	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	nd	nd	nd
10 ⁻⁶	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10 ⁻⁷	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*nd – não detectado.

Fonte: Umeda (2012).

Analisando os resultados obtidos notamos que a técnica de ICC-RT-PCR apresentou limite de detecção 10 vezes superior que a técnica de imunoperoxidase direta e 1000 vezes superior que a técnica de PCR convencional.

4.8 DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS E ROTAVÍRUS PRESENTES NATURALMENTE NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REÚSO E LODO POR TÉCNICAS CLÁSSICAS E MOLECULARES

4.8.1 Água de reúso

4.8.1.1 Adenovírus

Das 25 amostras de água de reúso submetidas ao cultivo celular, apenas 11 (44%) amostras apresentaram efeito citopático característico de adenovírus e 15 (60%) foram positivas pela PCR na primeira amplificação (ANEXO A).

Na Figura 9 é possível observar a presença do fragmento de 301 pb que corresponde a sequência genômica de adenovírus em algumas das amostras analisadas.

Figura 9- Resultado da PCR para detecção de adenovírus em amostras de água de reúso. (C+) controle positivo: HAdV-5; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.

Fomte: Umeda (2012).

As amostras que não foram amplificadas na primeira reação de PCR (40%), apresentaram resultado positivo na reação de *nested*-PCR como pode ser observado na Figura

10, confirmando a presença de adenovírus em 100% das amostras de água de reúso analisadas.

Figura 10 - Resultado da *nested*- PCR para detecção de adenovírus em amostras de água de reúso. (C+) controle positivo: HAdV-5; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.

Fonte: Umeda (2012).

Na Figura 10 além dos fragmentos esperados de 142 pb foram observados fragmentos com diferentes tamanhos, comuns em amostras ambientais.

Todas as amostras submetidas a técnica de ICC-PCR apresentaram 100% de positividade conforme observado na Figura 11 e no ANEXO A.

Figura 11- Resultado da ICC-PCR para detecção de adenovírus em amostras de água de reúso. (C+) controle positivo: HAdV-5; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.

Fonte: Umeda (2012).

4.8.1.2 Rotavírus

Em nenhuma das 25 amostras submetidas ao cultivo celular, foi possível identificar o efeito citopático característico de rotavírus. Ao contrário, a técnica de imunoperoxidase direta revelou a presença viral em 100% das amostras.

Quando submetidas a reação de RT-PCR, 22 (88%) do total de 25 se mostraram positivas para rotavírus (ANEXO B).

Na Figura 12, é possível observar a presença do fragmento de 108 pb que corresponde a sequência genômica de rotavírus em algumas das amostras analisadas.

Figura 12- Resultado da RT-PCR para detecção de rotavírus em amostras de água de reúso. (C+) : controle positivo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo

Fonte: Umeda (2012).

Aplicando a técnica de ICC-RT-PCR, todas as amostras analisadas apresentaram 100% de positividade para rotavírus conforme observado na Figura 13 e no ANEXO B.

Figura 13- Resultado da ICC-RT-PCR para detecção de rotavírus em amostras de água de reúso. (C+) controle positivo: SiRV-A/SA-11; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.

Fonte: Umeda (2012).

4.8.2 Lodo

4.8.2.1 Adenovírus

Do total de 25 amostras analisadas oriundas de diferentes ETEs, 24 amostras (96%) causaram efeito citotóxico nas células, o que dificultou a visualização dos efeitos citopáticos, assim, apenas 1 amostra (4%) apresentou ECP característico de adenovírus.

Quando submetidas a técnica de PCR apenas cinco (20%) das amostras foram positivas para adenovírus (ANEXO C).

Na Figura 14 é possível observar a presença dos produtos amplificados em algumas amostras.

Figura 14- Resultado da PCR para detecção de adenovírus em amostras de lodo de esgoto. (C+) controle positivo: HAdV-5; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.

Fonte: Umeda (2012)

As amostras que não apresentaram amplificação de fragmentos na primeira reação de PCR, apresentaram resultado positivo na reação de *nested*-PCR (Figura 15), confirmando a presença de adenovírus em 88% das amostras de lodo analisadas (ANEXO C).

Figura 15- Resultado da *nested*-PCR para detecção de adenovírus em amostras de lodo de esgoto. (C+) controle positivo: HAdV-5; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.

Fonte: Umeda (2012).

Na técnica de ICC-PCR, os adenovírus foram detectados em todas as amostras analisadas (100%) como pode ser observado no ANEXO C.

Figura 16- Resultado da ICC-PCR para detecção de adenovírus em amostras de lodo. (C+) controle positivo: HAdV-5; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.

Fonte: Umeda (2012).

4.8.2.2 Rotavírus

As 25 amostras coletadas em diferentes Estações de Tratamento de Esgoto apresentaram citotoxicidade quando inoculadas em culturas celular o que dificultou a visualização dos efeitos citopático.

Essa toxicidade também dificultou a visualização das células infectadas na técnica de imunoperoxidase direta, porém rotavírus foram detectados em todas as amostras testadas (100%).

Vinte e três amostras do total das 25 (92%) foram positivas para detecção de rotavírus pela reação de RT-PCR como observamos na Figura 17 e ANEXO D.

Figura 17- Resultado da RT-PCR para detecção de rotavírus em amostras de lodo. (C+): controle positivo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.

Fonte: Umeda (2012).

Todas foram 100% positivas para rotavírus pela técnica de ICC-RT-PCR (Figura 18 e ANEXO D).

Figura 18- Resultado da ICC-RT-PCR para detecção de rotavírus em amostras de lodo. (C+) controle positivo: SiRV-A/SA-11; (C-) controle negativo; (L) Invitrogen DNA ladder de 100 pb. Gel de agarose a 1,5 % corado com solução de brometo de etídeo.

Fonte: Umeda (2012).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As metodologias propostas para detecção de rotavírus e adenovírus presentes naturalmente nas amostras de água de reúso e lodo de esgoto foram comparadas entre si, estabelecendo-se a proporção de concordância e discordância entre elas.

A técnica de ICC-PCR quando comparada a técnica de cultura celular para detecção de adenovírus na matriz água de reúso apresentou uma proporção de concordância de 44% e discordância de 56%. Já comparada com a técnica de PCR convencional apresentou uma concordância de 60% e discordância de 40% (ANEXO E).

Na detecção de adenovírus na matriz lodo, a técnica de ICC-PCR apresentou uma proporção de concordância de 20% com a técnica de PCR convencional e 80% de discordância. Comparando essa técnica com a cultura celular observamos uma concordância de 4% e discordância de 96% (ANEXO E).

A técnica de ICC-RT-PCR quando comparada a técnica de RT-PCR convencional na detecção de rotavírus na matriz água de reúso apresentou uma concordância de 88% e discordância de 12%, quando comparada a técnica de imunoperoxidase direta apresentou uma concordância de 100%. Comparando essa técnica com a cultura celular observamos uma discordância de 100% (ANEXO F).

Na detecção de rotavírus na matriz lodo, a técnica de ICC-RT-PCR quando compara a técnica de RT-PCR convencional, apresentou concordância de 92% e discordância de 8%, e

quando comparada a técnica de imunoperoxidase direta apresentou uma concordância de 100%. Comparando essa técnica com a cultura celular observamos uma discordância de 100% (ANEXO F).

5 DISCUSSÃO

Atualmente mesmo com as melhorias nos processos de tratamento do esgoto, doenças de veiculação hídrica continuam a ter implicações econômicas e na saúde pública de países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Dentre os parâmetros microbiológicos adotados nas legislações em geral, os patógenos de baixa resistência aos processos de tratamento de esgoto (*E. coli* e outros) são adotados como indicadores de qualidade, principalmente pelo baixo custo dos ensaios para sua detecção. Contudo, patógenos muito mais resistentes acabam permanecendo infecciosos após esses tratamentos, representando risco à saúde da população e mostrando que muitas vezes a ausência de um indicador microbiológico não exclui a possibilidade de contaminação por outro microrganismo patogênico mais resistente. Estudo realizado Mehnert e Stewien (1992) e Piranha et al. (2003) no Brasil revelam a presença de vírus da Hepatite A e/ou adenovírus em águas cujo padrão de qualidade atende as normas estabelecidas.

Os vírus são considerados os principais agentes causadores de doenças de veiculação hídrica, visto que possuem uma dose infectante muito baixa e apenas a presença de poucas partículas virais pode causar riscos a saúde pública. A recente inclusão de vírus como indicador microbiológico da qualidade da água em diferentes países tornou necessário o desenvolvimento de metodologias rápidas e eficientes para detecção de pequenas quantidades de partículas virais infecciosas em amostras ambientais (Fong e Lipp, 2005). Dentre a grande diversidade de vírus entéricos, alguns são mais prevalentes na população humana, bem como em matrizes oriundas de estações de tratamento de esgoto, e possuem elevado impacto na saúde pública como adenovírus, enterovírus e rotavírus (Barrella, 2008; Christovão et al., 1967; Espinosa et al., 2008; Garrafa, 2009; Mehnert e Stewien, 1992).

O adenovírus foi incluído pela USEPA em 1998 na lista de patógenos emergentes contaminantes presentes na água potável devido sua resistência aos processos de tratamento. Estudos realizados na Europa e inclusive no Brasil sugerem a inclusão de adenovírus como indicador de poluição humana em ambientes aquáticos por se mostrarem mais persistentes e presentes ao longo de um ano hidrológico em número maior que os enterovírus no esgoto e em ambientes aquáticos contaminados (Garrafa, 2009; Jiang et al., 2001; Santos, 2004).

Os ensaios realizados no presente estudo foram baseados no protótipo viral HAdV-5 devido ao seu fácil cultivo *in vitro*. A presença de partículas virais em cultura celular é revelada pelo efeito citopático (ECP), que são alterações morfológicas resultantes do processo

de multiplicação viral. Os efeitos citopáticos observados variam de acordo com o vírus inoculado (Fong e Lipp, 2005). Assim na cultura celular foi observado a presença de efeito citopático caracterizado por arredondamento celular, aumento do volume citoplasmático e agrupamento de células em forma de cachos de uva, características que indicam efeito sugestivo de adenovírus (Lennette e Schmidt, 1979).

Os rotavírus foram selecionados para as análises pois são considerados os principais responsáveis por gastroenterites infantil ao redor do mundo.

A cada ano, há cerca de 111 milhões de casos de gastroenterites provocados por rotavírus e conseqüentemente 2 milhões de hospitalizações e um média de 440.000 mortes por ano de crianças com menos de 5 anos de idade. O número de casos de morte por rotavírus em crianças de países subdesenvolvidos é estimado em 82% (Parashar et al., 2003)

Rotavírus pertencentes ao Grupo A são os maiores agentes causadores de gastroenterites agudas em crianças ao redor do mundo, sendo responsável por 600.000-800.000 mil mortes por ano (Ho et al., 1988; Kapikian e Chanock, 1996; Logan et al., 2006). Na Europa, o Centro de controle de doenças (CDC) estima que aproximadamente 90.000 crianças menores de 5 anos apresentam sinais de infecção por rotavírus a cada ano (Gray et al., 2008).

Esse vírus tem sido detectado freqüentemente no esgoto bruto e em águas residuais (Garrafa, 2009; Vilhena et al., 2003). As partículas virais de rotavírus são encontradas nas fezes por semanas, com altos índices que variam de 10^{10} a 10^{11} por grama de fezes (Griffin et al., 2003). Além disso, são resistentes a uma ampla variação de pH (3-9.0) e a alguns processos de tratamento de esgoto.

Entretanto, o rotavírus é considerado um vírus difícil de ser cultivado *in vitro* e apresenta um índice de multiplicação limitado. Uma das principais proteínas estruturais do rotavírus é a VP4 (protease sensível) que está associada a restrição do seu crescimento em cultura de células (Babiuk et al., 1977). Além disso, seu efeito citopático está relacionado com a morte e a degradação celular o que dificulta a titulação viral pela técnica de cultura celular. Portanto, o protótipo viral foi titulado utilizando métodos sorológicos já padronizados como a imunoperoxidase direta (Mehnert e Stewien, 1992).

Devido a escassez de referência sobre a detecção de adenovírus (HAdV-5) em amostras ambientais utilizando a técnica de imunoperoxidase direta a padronização foi baseada na metodologia proposta por Mehnert e Stewien (1992) .

O ensaio baseia-se em promover a infecção viral *in vitro*, em células de rim de macaco (MA-104) facilitada por adição de tripsina o meio de cultura (Babiuk et al., 1977).

Aproximadamente 18 horas pós-infecção, as proteínas virais já podem ser detectadas no citoplasma das células infectadas e nenhum vírus foi ainda liberado do interior da célula infectada (Payment et al., 1981). Isto torna a reação adequada para determinação da infectividade viral, bem como a quantificação do número de partículas virais infecciosas presentes numa determinada matriz.

No primeiro ensaio realizado com adenovírus baseado no período de pós-infecção (pi) 18 horas, não foi possível determinar a exata localização das proteínas virais. Considerando que o protótipo viral HAdV-5 e o HAdV-2 fazem parte de um sorotipo que pertence a mesma espécie, a cinética viral foi baseada no estudo proposto por Silva et al. (2009) sobre a cinética de multiplicação do protótipo viral HAdV-2 em células HEK 293.

Segundo Silva (2009), após um período de pós-infecção de 24 horas já é possível observar a síntese de proteínas virais no citoplasma das células infectadas com HAdV-2, porém, após o período de 36 horas, uma grande quantidade de proteínas virais são encontradas no espaço intercelular em um gradiente radial emanando para infectar células vizinhas.

Como a liberação das primeiras partículas virais para o espaço intercelular não é interessante por conta da quantificação viral, vários períodos pós-infecção foram testados. Porém, diferentes padrões de marcações foram observados no núcleo e no citoplasma e padronização da técnica não foi possível. Além disso, uma intensa coloração de fundo em células não infectadas foi observada e levantou-se a hipótese que essa coloração poderia ser resultante da qualidade do anticorpo anti-adenovírus utilizado nos ensaios, já não se tratava da peroxidase endógena presente naturalmente em todas as células (Mehnert e Stewien, 1992), visto que o esgotamento da mesma foi realizado em ensaios posteriores.

O monitoramento da presença de vírus entéricos humanos em amostras ambientais começou em 1940 e em muitos estudos a cultura celular foi a técnica mais utilizada, sendo considerada pela EPA como melhor método para monitoramento e detecção de vírus entéricos infecciosos antes do surgimento de metodologias moleculares como o PCR (Jiang, 2006).

Atualmente, métodos moleculares como o PCR tem sido usado com sucesso no monitoramento viral de amostras ambientais (Abbaszadegan et al., 1999; Choi e Jiang., 2005; Di Pinto et al., 2003; Fong e Lipp., 2005) além do sequenciamento gênico e análise metagenômica (Symond et al., 2009), mas, especialmente as últimas abordagens, são pouco factíveis para a área de saneamento ambiental, dado o elevado custo, a necessidade de pessoal técnico altamente treinado e equipamentos onerosos.

Os métodos para detecção de rotavírus e adenovírus avaliados no presentes estudo vem sendo amplamente utilizados por pesquisadores no Brasil (Barella, 2008; Garrafa et al., 2009; Queiros et al., 2001, Santos et al., 2004; Sassarolli et al., 2002) e no exterior (Murrin e Slade, 1997; Saraguna et al., 2007), sem contudo uma avaliação e comparação da eficiência de cada método diretamente nas matrizes testadas.

Os parâmetros avaliados pelos métodos clássicos baseiam-se na infectividade viral e os moleculares na integridade do capsídeo viral e consequentemente na do genoma viral.

A infectividade viral pode ser descrita como a capacidade dos vírus entrarem na célula hospedeira e utilizarem os recursos celulares para produção de partículas virais infecciosas (virions). O virion da maioria dos vírus entéricos é formado por dois componentes principais: o capsídeo e o genoma. A proteína presente no capsídeo viral permite a interação entre vírus e célula hospedeira e contém antígenos específicos para receptores celulares usados para penetração celular (Rodriguez et al., 2009).

Uma das grandes vantagens da cultura celular consiste na determinação direta da infectividade viral presente na amostra. Além disso essa metodologia pode fornecer dados quantitativos, através de cálculos como o *Reed e Muench* ($DICT_{50}$) (Reed e Muench, 1938).

Porém é importante enfatizar algumas dificuldades na detecção de vírus infecciosos, como o uso de células específicas para o cultivo de cada tipo de vírus, o longo tempo consumido para o processo de multiplicação viral, o elevado custo para a manutenção das culturas e a incapacidade da observação de alguns efeitos citopáticos ao microscópio (Jiang, 2006).

Para vírus não citopatogênicos a confirmação da presença do vírus responsável pela infecção só pode ser demonstrada por outras metodologias baseadas em testes imunológicos como a técnica de imunoperoxidase ou imunofluorescência e moleculares como o PCR (Mehnert e Stewin, 1992; Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

A técnica de imunoperoxidase direta apresenta maior especificidade e sensibilidade que a técnica de cultivo celular pois utiliza anticorpos específicos para a detecção viral.

Nessa técnica, a detecção dos agentes patogênicos são obtidos em um tempo menor que o cultivo celular sendo considerada uma metodologia eficiente e de baixo custo pois apenas o uso de um microscópio óptico comum é necessário para visualização das células infectadas, característica importante para detecção viral em amostras ambientais. A quantificação das partículas virais infecciosas também pode ser determinada (Mehnert e Stewien, 1992; Njayou et al., 1991).

Metodologias moleculares tem sido extensivamente usadas na detecção de vírus entéricos em amostras ambientais desde o início dos anos 1990. A técnica de PCR fornece especificidade e sensibilidade pois utiliza oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de cada vírus.

A reação de PCR/RT-PCR tem sido extensivamente usada na detecção de vírus em amostras ambientais (Pallin et al., 1997; Puig et al., 1994).

Essa técnica pode ser utilizada para detecção de vírus difíceis de ser cultivados em culturas celulares e para detecção de vírus que não produzem efeito citopático. Outra vantagem dessa metodologia é a redução do tempo requerido para determinação da detecção viral (Rodriguez et al., 2009; Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

Apesar da eficiência, rapidez e sensibilidade, o PCR apenas fornece dados como a presença ou ausência viral nas amostras fornecendo pouca ou nenhuma informação relacionada aos riscos associados a saúde pública com a exposição em ambientes contaminados sobre quantidade e infectividade viral (Jiang et al., 2006).

Assim variações dessa técnica, como o ICC-PCR que integra cultura celular e PCR, tem sido bastante utilizadas e quando combinadas podem oferecer sensibilidade, eficiência, especificidade na detecção viral além de informações sobre infectividade viral (Fong e Lipp, 2005). O ICC-PCR fornece resultados em um curto período (aproximadamente 3 dias) comparada a técnica tradicional de cultura celular (Greenig et al., 2002).

Reynolds et al. (1996) e Murrin e Slade (1997) foram os primeiros a utilizarem essa técnica na pesquisa de vírus entéricos em amostras ambientais.

Para a determinação do limiar de detecção para adenovírus e rotavírus foram utilizadas as técnicas de cultura celular, imunoperoxidase direta, PCR/RT-PCR e ICC-PCR/RT-PCR.

Analizando as técnicas utilizadas para detecção de adenovírus notamos que o limiar da técnica de ICC-PCR para adenovírus é 10 vezes maior quando comparado a técnica de cultura celular e compatível ao limiar da técnica de PCR convencional.

No caso dos rotavírus, notamos que o limiar de detecção da técnica ICC-RT-PCR é 100 vezes maior que o observado na técnica de RT-PCR e 1000 vezes maior quando comparamos com a técnica de cultura celular e imunoperoxidase direta.

Estudos reportam que o RT-PCR para detecção de rotavírus grupo A apresenta uma positividade maior que outras técnicas como ensaios imunoenzimáticos ou microscopia eletrônica (Gunson et al., 2003; Pang et al., 1999).

O baixo limiar de detecção da técnica de cultura celular pode ser justificado pois no caso da propagação viral de rotavírus em células MA-104, talvez somente uma partícula viral infecciosa esteja presente no total de 40.000 partículas virais (Ward et al., 1984), no caso do adenovírus essa relação varia de 1:1000 (Grabow et al., 1992). Além disso, o efeito citopático do rotavírus nas células pode ser confundido com degradação celular tornando difícil sua visualização.

Assim a correlação entre os resultados obtidos pela técnica de RT-PCR e os da cultura celular ou imunoperoxidase direta na detecção viral deve ser vista com restrição pois a relação entre as partículas virais infecciosas e genomas detectados é variável. (Rodriguez et al., 2009).

Estudos mostraram que a técnica de ICC-(RT)-PCR pode aumentar a frequência de vírus encontrados normalmente com baixos níveis em amostras ambientais (Chapron et al., 2000; Greening et al., 2002; Lee e Kim, 2002;) visto que a partir do momento em que vírus são inoculados em cultura celulares ocorre a replicação viral e assim a quantificação do número de partículas virais infecciosas contida inicialmente na amostra é alterada.

Reynolds et al. (1996) demonstrou uma maior sensibilidade da técnica de ICC-PCR/RT-PCR quando comparada a técnica de cultura celular convencional pois as amostras analisadas que inicialmente apresentaram resultado negativo para enterovírus na cultura celular, apresentaram positividade na reação de RT-PCR.

Ensaio de semeadura experimental foram realizados para a determinação do limiar de detecção das técnicas clássicas e moleculares para detecção de adenovírus e rotavírus nas matrizes ambientais água de reúso e lodo de esgoto.

Na matriz água de reúso, os adenovírus apresentaram um baixo índice de recuperação, com uma média de recuperação de 0,005%. Já os rotavírus apresentaram uma média de recuperação maior de 23,7%.

Em trabalhos realizados por Garrafa et al. (2009) o índice de recuperação obtido para rotavírus na água de reúso foi de 27%, compatível com o resultado obtido no presente estudo.

Gregory et al. (2006) observou que alguns vírus podem ser perdidos nas etapas de processamento e purificação das amostras ambientais.

Outro fator que pode interferir na recuperação viral de adenovírus na água de reúso é a quantidade de cloro presente no processo de tratamento utilizado nessa água. Segundo Thurston-Enriquez et al. (2003), a cloração parece ser o método de desinfecção mais eficiente para adenovírus. Esse tratamento utilizado normalmente nas águas residuais pode ser suficiente para causar danos no capsídeo viral, diminuindo a infectividade viral (Dong et al.,

2011). No presente esta interferência do cloro foi desconsiderada, pois as amostras foram autoclavadas por longo período volatilizando o cloro residual.

Comparando o limiar de detecção para adenovírus através das técnicas de cultura celular, PCR e ICC-PCR na matriz água de reúso, notamos que a técnica de ICC-PCR possui um limiar de detecção 10 vezes superior a técnica de cultura celular e de 10 a 100 vezes superior que a técnica de PCR.

Analisando os resultados para rotavírus percebemos que o limiar de detecção da técnica de ICC-PCR é 10 vezes superior a técnica de PCR convencional e 100 vezes superior que a técnica de imunoperoxidase direta. A técnica de cultura celular apresentou um baixo limiar de detecção, devido a limitações da técnica como a dificuldade na visualização de efeito citopático citados anteriormente.

Recentes estudos publicados por Ko et al. (2003), sugerem que o material genético de vírus inativados inoculados em cultura celulares podem levar a resultados falso-positivos na técnica de PCR. Porém no presente estudo a positividade e infectividade viral foi confirmada através da técnica de imunoperoxidase direta.

Nos ensaios de semeadura experimental realizados para detecção de adenovírus na matriz lodo de esgoto, notamos também um baixo índice de recuperação viral, com uma média de 0,01%, enquanto a média para recuperação de rotavírus nessa matriz foi de 18,43%.

Os ensaios realizados por Barrella et al. (2008) para a recuperação de adenovírus em amostras de lodo de esgoto apresentaram uma taxa de recuperação de 10%, compatível com a recuperação viral dos rotavírus.

Estudos mostram que microrganismos encontrados normalmente nas amostras ambientais possuem um importante papel na inativação e degradação do genoma viral (Tsai et al., 1995). Isso ocorre devido a presença de nucleases liberadas por bactérias e outros microrganismos que podem provocar a degradação do RNA após a perda da infectividade viral (Rodriguez et al., 2009).

Comparando as metodologias para detecção de adenovírus no lodo de esgoto, notamos que a técnica de ICC-PCR apresentou um limiar de detecção 10 vezes superior que o observado nas técnicas de cultura celular e PCR convencional.

Para rotavírus a técnica de ICC-RT-PCR apresentou um limiar de detecção 10 vezes maior que a técnica de imunoperoxidase direta e 1000 vezes maior que a técnica de RT-PCR convencional. A técnica de cultura celular permaneceu apresentando um baixo limiar de detecção.

Alguns compostos presentes no lodo como o ácido húmico podem estar interferindo na reação de PCR/RT-PCR convencional visto que a diluição da amostra na cultura celular pode reduzir o efeito de compostos tóxicos que inibem a reação de PCR (Bosch, 1998) aumentando portanto o limiar de detecção da técnica de ICC-PCR/RT-PCR

Analisando os resultados obtidos na pesquisa de adenovírus encontrados naturalmente em amostras de água de reúso notamos um índice de positividade de 100% utilizando as técnicas de PCR/*nested*-PCR e ICC-PCR. A *nested*-PCR foi utilizada nas amostras em que mostraram resultados negativos na primeira reação de PCR por aumentar a sensibilidade da reação de PCR, visto que o produto obtido na primeira reação já está livre de inibidores que possam vir a interferir na reação. A técnica de cultura celular apresentou um índice de 44% de positividade.

Nos resultados obtidos na pesquisa de adenovírus encontrados naturalmente nas amostras de lodo de esgoto notamos que a técnica de cultura celular apresentou baixo índice de positividade devido a grande citotoxicidade presente nas amostras. Porém as técnicas de PCR/*nested*-PCR e ICC-PCR permaneceram apresentando altos índices de positividade variando de 88% a 100% respectivamente.

Muitos oligonucleotídeos para detecção de adenovírus foram publicados nos últimos anos (Girones et al., 1993; He e Jiang, 2005; Ko et al., 2003; Puig et al., 1994), porém os oligonucleotídeos iniciadores publicado por Allard et al. (1992) para reação de *nested*-PCR foi amplamente usado na detecção de adenovírus em amostras ambientais (Chapron et al., 2000; Cho et al., 2000; Fong et al., 2005; Lee e Jeong, 2004). Allard et al. e Van Heerden et al. demonstraram um aumento da sensibilidade utilizando essa técnica com um limite de detecção para adenovírus de uma partícula viral e 10^{-2} UFP respectivamente comparado ao PCR convencional (Fong e Lipp, 2005).

Puig et al. (1994) mostraram um índice de positividade maior para detecção viral através da técnica de *nested*-PCR quando comparado a cultura celulares. Greening et al. (2002) ao detectar adenovírus infecciosos em amostras ambientais, observou um aumento da porcentagem de positividade de 28,6% de detecção utilizando a técnica de cultura celular para 50% usando a técnica de ICC-PCR. Lee et al. (2005) demonstrou que 28% das amostras de água de corrente mostraram resultados positivos pela técnica de ICC-*nested*-PCR comparado com 16% de positividade utilizando a técnica convencional de cultura celular.

Garrafa et al. (2009), apresentou um índice de positividade de 88% para esgoto bruto e 47% no esgoto tratado. Barrella et al. (2008) detectaram a presença de 88% de positividade

para adenovírus nas amostras de lodo colhidas em uma das Estações de Tratamento de Esgoto do município de São Paulo através da técnica de PCR.

Na cidade de Atenas, Krikelis et al. (1985) detectou adenovírus em 100% das amostras de esgoto coletadas durante 15 meses. Irvin e Smith (1981) detectaram um índice de positividade de 96% de adenovírus em amostras de esgoto colhidas ao longo do ano na Austrália.

Na pesquisa de rotavírus presentes naturalmente nas amostras de água de reúso, as técnicas de ICC-RT-PCR e imunoperoxidase direta apresentaram um índice de 100% de positividade, confirmando o alto índice de infectividade viral presente nessas amostras. A técnica de RT-PCR apresentou 88% de positividade porém os resultados obtidos nas culturas celulares não foram considerados conclusivos.

Analisando os índices de positividade viral encontrados na pesquisa de rotavírus nas amostras de lodo de esgoto, também encontramos 100% de positividade nas amostras analisadas através das técnicas de imunoperoxidase direta e ICC-RT-PCR e 92% de positividade nas amostras analisadas pela técnica de RT-PCR. Porém a grande citotoxicidade encontra nas amostras de lodo prejudicaram a visualização dos efeitos citopáticos levando a resultados novamente não conclusivos.

Chapron et al. (2000) notou um aumento da sensibilidade utilizando a técnica de ICC-RT-PCR quando comparada a técnica convencional de cultura celular. Assim 68,9% das amostras mostraram positividade para vírus infecciosos através da técnica de ICC-RT-PCR comparada a 17,2% de positividade determinada tradicionalmente pelo método de cultura celular.

Garrafa et al. (2009), ao submeter as amostras de esgoto bruto e tratado a RT-PCR, os índices de positividade observados foram de 47,4 % para o esgoto tratado e 81,7% para o esgoto bruto. Resultados semelhantes com elevados índices de positividade através da técnica de RT-PCR foram obtidos. Pauli et al. (2003) detectou 92% de positividade analisando amostras de esgoto bruto na cidade de São Paulo. Keller e Gonçalves (2001) detectaram a presença de rotavírus em 33,3 % das amostras de esgoto analisadas na cidade de Vitória.

Assim, comparando os resultados obtidos, a técnica de ICC-PCR/RT-PCR se mostrou mais eficiente, rápida, sensível na detecção viral nas diferentes matrizes ambientais além de fornecer dados importantes sobre infectividade viral. A técnica de imunoperoxidase direta também pode ser considerada uma alternativa para detecção viral em amostras ambientais por fornecer resultados rápidos e aliar dados como infectividade viral e quantificação de

partículas virais, porém a detecção das partículas virais infecciosas algumas vezes é prejudicada devido a grande toxicidade presente nas amostras levando a resultados falso-negativos.

Entender a relação entre a persistência viral (detectada por métodos moleculares) e infectividade (detectada através de efeitos citopáticos em culturas celulares) tem sido muito importante para a prevenção de riscos a saúde pública.

O presente estudo comparou e analisou diferentes abordagens de detecção viral em matrizes com características diferentes como água de reúso e lodo de esgoto. A avaliação das vantagens e limitações de cada técnica em cada matriz é importante para contribuição na regulamentação das normas no país na pesquisa de vírus como indicador microbiológico na qualidade e também visa a definição de uma metodologia padrão que seja rápida, sensível e eficiente para detecção viral no monitoramento de amostras ambientais.

6 CONCLUSÕES

- O limiar de detecção para adenovírus e rotavírus das técnicas de cultura celular, IPX, PCR/RT-PCR, ICC-PCR/RT-PCR foi estabelecido nas diferentes matrizes ambientais (água de reúso e lodo de esgoto).
- A padronização da técnica de imunoperoxidase direta não foi possível, recomendando-se a utilização de um novo anticorpo conjugado.
- Os índices de positividade para rotavírus e adenovírus das amostras de lodo de esgoto e água de reúso foram determinados pelas metodologias propostas e demonstraram através da técnica de ICC-PCR/ RT-PCR 100% de infectividade nas vinte e cinco amostras analisadas de cada matriz.
- A técnica de ICC-PCR/RT-PCR, apresentou um limite de detecção de 10 a 1000 vezes superior quando comparado as técnicas de cultura celular, IPX, ICC-PCR na matriz lodo e água de reúso se mostrando ao mesmo tempo mais sensível e eficiente na detecção viral em amostras ambientais.

REFERÊNCIAS*

- Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP, Peper IL. Detection of enteriviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:1318-24.
- Abbaszadegan M, Stewart P, LeChevallier M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:444-9.
- Ahmed AU, Sorensen DL. Kinetics of pathogen destruction during storage of dewatered biosolids. *Wat Environ Res.* 1995;67:143-50.
- Allard A, Girones R, Per Juto, Wadell G. Polimerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2659-67.
- Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1992;37:149-57.
- Allard A, Kajon A, Wadell G. Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1994;44:250-7.
- Aponte C, Poncete D, Cohen J. Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *Journal of Virology,* 1996;80(2):333-9.
- Babiuk LA, Mohammed K, Spence L, Fauvel M, Petro R. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *J Clin Microbiol.* 1977;6:610-17.
- Barrella KM. Pesquisa de vírus entéricos humanos em lodos de esgoto originários de duas ETEs do Estado de São Paulo: estabelecimento e avaliação de metodologia para recuperação e detecção viral [dissertação (Doutorado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.
- Baum SG. Adenovirus. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases.* New York: Churchill Livingstone; 2000. p.1624-1630.
- Bishop RF, Davidson GP, Homes IH, Ruck BJ. Virus particles in ephitelial cells of a duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. *Lancete.* 1974; 1:149-51.
- Bitton D. *Introdution to wastewater treatment. Wastewater microbiology.* New York: Wiley-Liss; 1997. Chapter 7.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

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

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

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

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

Brown M, Grydsuk JD, Fortsas E, Petric M. Structural features unique to enteric adenoviruses. *Arch Virol Suppl*. 1996;12:301-7.

Canadá Mortgage and Housing Corporation (CMHC). Research report: water reuse standars and verification protocol. Ottawa: CMHC; 2005.

Carmona RC, Timenetsky Mdo C, Morillo SG, Richtzenhein LJ. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brasil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:963-8.

Carlson HJ, Ridenour GM, McKhann CF. Efficacy of Standard Purification Methods in Removing Poliomyelitis Virus from Water. *Am J Public Health Nations Health*. 1942;32(11):1256-62.

Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity , transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol*. 2005;98:1354-80.

Center for disease control and prevention (CDC). Guideline for the prevention and Control of Norovirus Gastroenteritis Outbreaks in Healthcare Settings: 2011.

Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin AB. Detection of Astroviruses, Enteroviruses , and Adenovirus Types 40 and 41 in Surface Waters Collected and Evaluated by the Information Collection Rule and an Integrated Cell Culture-Nested PCR Procedure. *Society*. 2000;66(6):2520-5.

Cho HB, Lee S, Cho J, Kim S. Detection of adenovirus and enteroviruses in in tap water and river waterby reverse transcription multiplex PCR. *Can J Microbial*. 2000;46(5):417-24.

Choi S, Jiang SC. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(11):7426-33.

Christovão DA, Candeias JAN, Iaria ST. Condições sanitárias das águas de irrigação de hortas do município de São Paulo. II. Isolamento de vírus entéricos. *Rev Saúde Pública*. 1967; 1:12-7.

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP). Informações sobre as estações de tratamento de esgoto da empresa. Disponível em: < <http://www.sabesp.com.br>> [2008 dez. 10].

Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 399 (Ago 29 2006). Diário Oficial da União, 167, Brasília, (2006 ago. 30); p.141-6.

Crockett CS. The role of wastewater treatment in protecting water supplies against emerging pathogens. *Water Environ Research*. 2007;79:221-32.

De Jong JC, Bijlsman K, Wermenbol AG, Verweiji-Uijterwaal MW, Vander Avoort HG, Wood DJ, Bailey AS, Osterhaus AD. Detection, typing, and sub typing of enteric adenoviruses 40 and 41 from fecal samples and observation of changing incidences of infections with these types and subtypes. *J Clin Microbiol*. 1993;31:1562-9.

Di Pinto A, Forte VT, Tantillo GM, Terio V, Buonavoglia C. Detection of hepatitis A virus in shellfish (*Mytilus galloprovincialis*) with RT-PCR. *J Food Prot*. 2003;66(9):1681-5.

Dong Y, Kim J, Lewis GD. Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater , drinking water , stream water and recreational waters. *J Appl Microbiol*. 2010;108:800-9.

Espinosa AC, Mazari-Hiriat M, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Méndez E, Arias CF. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water research*, 2008;42:2618-28.

Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*. 1989;53:410-49.

Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Fields BN. et al., editor. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott–Raven Publishers; 1996. p. 1625–55.

Farrah, SR. Ecology of phage in freshwater environments. In: Goyal SM, Gerba CP, Bitton G editors. *Phage Ecology*. New York: John Wiley & Sons; 1987. p. 125–36.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy. Eight report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego: academic press: 2007. 49 p.

Fong T, Lipp EK. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potencial water quality assessment tools. *Microbiol and Molecular Biol Reviews*. 2005;69(2):357-71.

Ford TE. Microbiological Safety of Drinking Water : United States and Global Perspectives. *Environ Health Perspect*. 1999;107:191-206.

Garrafa, P. Pesquisa do Vírus da Hepatite A em Águas de Córrego e Esgoto Utilizando Métodos de RT-PCR e RFLP. [monografia (bacharelado)]. São Paulo: Faculdade de Ciências Biológicas, Exatas e Experimentais Universidade Presbiteriana Mackenzie; 2001.

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

Gerba CP. Risk assessment. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP, editors. Environmental microbiology. San Diego: Academic Press; 2000. p. 557-70.

Girones R, Allard A, Wadell G, Jofre J. Application of PCR to the detection of adenoviruses in polluted Waters. Water Sci Technol. 1993; 27:235-41.

Glass JG, Van Sluis RJ, Yanko WA. Practical methods for detection of poliovirus in anaerobic digester sludge Appl Environ Microbiol. 1978;35:983-5.

Goyal SM, Adams WN, O'Malley MI, Lear DW. Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle atlantic region. Applied and Environmental Microbiology. 1984;48:758-63.

Grabow WO, Middendorff IG, Basson NC. Role of lime treatment in the removal of bacteria, enteric viruses, and coliphages in a wastewater reclamation plant. Appl Environ Microbiol. 1978;35(4):663-9.

Grabow WO, Puttergill DL, Bosch A. Propagation of adenovirus types 40 and 41 in the PLC/PRF/5 primary liver carcinoma cell line. J Virol Methods. 1992;37:201-7.

Gray AJ, Vesikari T, Damme PV, Giaquinto C, Mrukowicz J, Guarino A, et al. Rotavirus. J Pediatr. 2008;(6):24-31.

Greening GE, Hewitt J, Lewis GD. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. J App Microbiol. 2002;93:745-50.

Gregory JB, Litaker RW, Noble RT. Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples. Appl Environ Microbiol. 2006;72:3960-7.

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

Grimm AC, Cashdollar JL, Williams FP, Fout GS. Development of an astrovirus RT-PCR detection assay for use with conventional, real-time, and integrated cell culture/RT-PCR. Can J Microbiol. 2004;50:269-78.

Guimarães FR, Ferreira FFM, Vieira CB, Fumian TM, Shubo T, Leite JPG, Miagostovich MP. Molecular detection of human astrovirus in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2008;103(8): 819-823.

Gunson RN, Machie P, Leanord A, Carman WF. First rotavirus, now astrovirus: the evolving benefits of RT-PCR. Commun Dis Public Health. 2003;6(1):66-7.

Gurgel RQ, Cunliffe NA, Nakagomi O, Cuevas LE. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. *J Clin Virol*. 2008;43:1-8.

Hamza IA, Jurzik L, Uberla K, Wilhelm M. Methods to detect infectious human enteric viroses in environmental water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2011;214:424-36.

Hawke M. In: Lennete EH, Schmidt NJ. Diagnostic procedures for viral , rickettsial and chlamydial infections. 5th ed. American Public Health Organization, Inc; 1979. p. 229-49.

Hee J, Jiang S. Quabtification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real –time PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:2250-5.

Herrmann JE, Morse SA, Collins MF. Comparison of techniques and immunoreagents used for indirect immunofluorescence and immunoperoxidase identification of enteroviruses. *Infect Immun*. 1974;10(1):220-6

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

Hilleman MR, Werner JH. Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954;85:183-8.

Hoo MS, Glass RI, Pinsky PF, Anderson LJ. Rotavirus as a cause oh diarrheal morbidity and mortality in the United States. *J Infect Dis*. 1988;158:1112-6.

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

Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J health Popul Mutr*. 2000;18:5-14.

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

Jiang S, Noble R, Chu W. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal Waters of Southern California. *Appl Environ Microbiol*, 2001;67:179-84.

Jiang SC. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical rewien. *Environ Sci Technol*. 2006;40:7132-40.

Kapikian Az, Cline WL, Greenberg HB, Wyatt RG, Kalica Ar, Banks CE, et al. Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hamagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect Immun*. 1981;33:415-25.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Pérez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis.* 1996;Suppl 1:S65-72. Review.

Keller R, Gonçalves RT. Molecular techniques monitoring rotavirus in wastewater treatment plants. *Virus Reviews and Research: Abstract n. EV 4.* 2001;6;96.

Keswich BH, Gerba CP, Dupont HL, Rose JB. Detection of enterovirus in treated drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 1984;47:1290-4.

Keswich BH, Gerba CP, Secor SL. Survivor of enteric viruses and newer enteroviruses. In; Fields BN, editor. *Virology.* New York: Raven Press; 1990. p. 549-605.

Ko G, Cromeans TI, Sobsey MD. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:7377-84.

Koopmans M, Brown D. Seasonality and diversity of group A rotaviruses in Europe. *Acta Paediatr Suppl.* 1999;88:14-9.

Kosek MBC, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ.* 2003;81:197-204.

Koroglu M, Yakupogullari Y, Otlu B, Ozturk S, Ozden M, Ozer A, Sene K, Duramaz R. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. *New Microbiol.* 2011;34:17-24.

Krikelis V, Spyrou N, Markoulatos P, Serie C. Seasonal distribution of enteroviruses and adenoviruses in domestic sewage. *Can J Microbiol.* 1985;31:24-5.

Lee SH, Kim SJ. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res.* 2002;36:248-56.

Lee HK, Jeong YS. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:3632-6.

Lee SH, Lee C, Lee KW, Cho HB, Kim SJ. The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture –multiplex-nested PCR procedure. *J Appl Microbiol.* 2005;98:1020-9.

Lennette EH, Schmidt NJ. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5th ed. American Public Health Organization, Inc; 1979. p. 229-49.

Linhares AC, Pinheiro FP, Freitas RB, Gabbay YB, Shirley JA, Beards GM. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune isolated south american indian community. *Am J Epidemiol.* 1981;113:703-10.

Logan C, O'Leary J, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clinical Microbiol.* 2006;44:3189-95

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*, 2011.

Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johnw R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*, 2012.

Mehnert DU, Stewien KE. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59:140-3.

Mehnert DU, Stewein KE, Hársi CM, Queiroz APS, Candeias JMG, Candeias JAN. Detection of rotavirus in sewage and creekwater: efficiency of the concentration method. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92:97-100.

Melnick JL, Wallis C. Problems related to the use of serum and trypsin in the growth of monkey kidney cells. *Dev Biol Stand*. 1976;37:77-82

Melnick JL, Gerba CP. The ecology of enteroviruses in natural waters. *Crit Rev Environ Control*. 1980;10:65-93.

Melnick JL. Etiologic agents and their potencial for causing waterborne virus diseases. In: Melnick JL, editor. *Enteric viruses in water*. Switzerland; 1984. p. 1-16.

Murrin, K., and J. Slade. Rapid detection of viable enteroviruses in water by tissue culture and semi-nested polymerase chain reaction. *Water Sci Technol*. 1997;35:11-2.

Njayoul M, Balla A, Kapo E. Comparisohn of four techniques of measles diagnosis: virus isolation, imunnofluorescence, immunoperoxidase & ELISA. *Indian J Med Res*. 1991;93:340-4.

Oppenheimer F, Benesi E, Taylor AR. The ultraviolet irradiation of biological fluids in thin-flowing films. *Am J Public Health Nations Health*. 1959;49(7):903-23.

Pang XL, Joensuu J, Hoshino Y, Kapikian AZ, Vesikari T. Rotaviruses detected by reverse transcription polymerase chain reaction in acute gastroenteritis during a trial of rhesus-human reassortant rotavirus tetravalent vaccine: implications for vaccine efficacy analysis. *J Clin Virol*. 1999;13(1-2):9-16.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:565-71.

Pauli, V. Ocorrência e distribuição de genótipos G e P de rotavírus em efluente doméstico e córrego da cidade de São Paulo. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2003.

Payment P, Trudel M. Immunoperoxidase meyhod with huiman immune serum globulin for broad-spectrum detection of cultivable human enteric viruses: application to enumeration of cultivable virus in environmental samples. *Appl Environ Microbial*. 1985;50:1308-10.

Payment P, Ayache R, Trudel M. A survey of enteric viruses in domestic sewage. *Can J Microbiol.* 1983;29:111-9.

Paymente P. Isolation of viruses from drinking water at the Pont-Viau Water Treatment Plant. *Can J Microbiol.* 1981;27:417-20.

Pallin R, Wynjones AP, Place MB., Lightfoot NF. The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 1997;67:57-67.

Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral Pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(9):1-11.

Piranha JM, Pacheco A, Gamba R, Mehnert DU, Garrafa P, Barrella KM. Faecal Contamination (Viral and Bacteria) Detection in Groundwater used for Drinking Purposes in São Paulo, Brazil. *Geomicrobiology Journal.* 2006;23:279-83.

Prasad BVV., Chiu, W. Structure of rotaviruses. In: Ramig RF, editor. *Rotaviruses.* Berlin: Springer-Verlag; 1994. p. 9-29

Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted water by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60:2963-70.

Queiroz APS. Detecção e genotipagem de rotavírus presentes em amostras de água de esgoto e córrego da cidade de São Paulo, através da reação de RT-PCR. [dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1999.

Queiroz APS, Santos FM, Sassaroli A, Hársi CM, Monezi TA, Mehnert DU. Eletropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:4614-8.

Rajtar B, Majek M, Polanski L, Polz-Dacewicz M. Enteroviruses in water environment-A potential threat to public health. *Ann Agric Environ Med.* 2008;15:199-203.

Rao VC, Metcalf TG, Melnick JL. Human viruses in sediments, sludges, and soils. *Bulletin of the World Health Organization,* 1986;64(1):1-14.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The Am J Hyg.* 1938;27:493-7.

Reynolds KA, Gerba PC, Pepper LI. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell-culture-PCR procedure. *Appl Environ Microbiol.* 1996 Apr;62(4):1424-7.

Reynolds KA, Gerba CP, Abbaszadegan M, Pepper LL. ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Can J Microbiol.* 2001;47:153-7.

Rodriguez RA, Pepper IL, Gerba CP. Application of pcr-based meyhods to assess the infectivity of enteric viroses in environmentla samples. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(2):297.

Russel WC. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol.* 2009;90:1-20.

Saiki RK, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science.* 1987;239(4839):487-91.

Santos FM, Vieira MJ, Garrafa P, Monezi TA, Pellizari VH, Hársi CM, Mehnert DU. Discrimination of adenovirus types circulating in urban sewage and surface polluted wayers in São Paulo city, Brazil. *Wat Sci Tech: Water Supply.* 2004;4:79-85.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of na effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005;15:29-56.

Saraguna P, Rao A, Sudha Romana KM. Outbreak of acute viral hepatites due to hepate E vírus in Hyderabad. *Indian J Med Microbial.* 2007;25:378-82.

Sassaroli A. Vírus da Hepatite A: A presença e a identificação dos genótipos circulantes nas águas de esgoto e superfície da cidade de São Paulo, Brasil. [dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2002.

Schloter M, Assmus B, Hartmann A. The use of immunological methods to detec and identify bacteria in the environment. *Biotechnology Advances.* 1995;13:75-90.

Shaw AL, Rothmage R, Chen D, Ramig RF, Chiu W, Venkataram Prasad BV. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin estrutura. *Cell press,* 1993;74:693-701.

Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Manee N, Ushijome H. An outbreak af adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizura City, Japan. *Infect Genet Evol.* 2007;7:279-84.

Silva JS, Yeda FP, Favier AL, Mezin P, Silva ML, Barrella KM, Mehnert DU, Fender P, Hársi CH. Infection kinetics of human adenovirus serotypes 41 in HEK 293 cells. *Men Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(5):736-44.

Steinmann J. Detection of roravirus in sewage. *Appl Environ Microbial.* 1981;41:1043-5.

Stewien KE. Análise virológica da água: estudo comparativo entre dois métodos para concentração de vírus de água de esgoto e determinação da razão entre os números de Enterovírus e de coliformes.[tese (Livre-docência)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1979.

Sobsey MD, Jones BL. Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Appl Environ Microbiol.* 1979;37:588-95.

- Symonds EM, Griffin DW, Breitbart M. Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75:1402–9.
- Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Riley K, Gerba CP. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *App Environ Microbiol*. 2003;69:577-82.
- Tsai YL, Tran B, Palmer CJ. Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase –PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:363-6.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). Guideline for Water Reuse. EPA-625-R-04-108. Washington DC: EPA. 2004.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). Environmental regulations and technology. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge- EPA/625/R-92/013, 2003.
- Van Heerden J, Ehlers MM, Grabow WO. Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water. *J Appl Microbiol*. 2005;99(5):1256-64.
- Verma H, Chitambar SD, Varanasi G. Identification and characterization of enteric adenoviruses in infants and children hospitalized for acute gastroenteritis. *Journal of Medical Virology*. 2009;81:60-4.
- Vaughn JM, Novotny JF. Virus inactivation by disinfection In: Hurst CJ, editor. *Modelling the Environmental Fate of Microorganisms*. Washington, DC: American Society of Microbiology; 1991. p. 217-41.
- Vilhena C, El-Senousy WM, Abad FX, Pintó RM, Bosch A. Group A Rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: Emergence of Unusual Genotypes. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:3919-23.
- Von Sperling M, Andreoli CV. Introdução. In: Andreoli CV, Von Sperlog M, Fernandes F, editores. *Lodo de esgotos: tratamento e disposição final*. Belo Horizonte: UFMG; 2003. p. 13-6.
- Walker PJ, Cowley JA, Spann KM, Hodgson RAJ, Hall MR, Withyachumnarnkul B. Yellow head complex viruses: transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific region. In: Browdy CL, Jory DE, editors. *The New Wave: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming, Aquaculture 2001*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society; 2001. p. 227–37.
- Ward RL, Knowlton DR, Pierce MJ. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *J Clin Microbiol*. 1984;19:748-53.
- World Health Organization (WHO). Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Volume 2: Wastewater use in agriculture. Geneva: WHO; 2006a.
- Wyn-Jones AP, Sellwood J. Enteric viruses in the aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;91:945-62.

Zlateva KT, Maes P, Rahman M, Van Ranst M. Chromatography paper strip sampling of enteric adenoviruses type 40 and 41 positive stool specimens. *Virology*. 2005;2:6-10.

ANEXO A

Resultados obtidos com as metodologias clássicas (cultivo celular) e moleculares (PCR, *nested*-PCR e ICC-PCR) na pesquisa de adenovírus em amostras de água de reúso.

Amostras		Resultados por método			
Nº	Nº de Registro no Laboratório	Cultivo celular (ECP)	PCR	<i>Nested</i> -PCR	ICC-PCR
1	54	+	+	NT	+
2	66	+	+	NT	+
3	70	+	+	NT	+
4	78	+	neg	+	+
5	80	neg	neg	+	+
6	86	neg	+	NT	+
7	87	neg	+	NT	+
8	88	neg	+	NT	+
9	89	neg	neg	+	+
10	90	+	+	NT	+
11	91	+	+	NT	+
12	92	+	+	NT	+
13	94	+	+	NT	+
14	100	neg	neg	+	+
15	101	neg	+	NT	+
16	102	neg	+	NT	+
17	116	+	+	NT	+
18	117	neg	neg	+	+
19	130	+	+	NT	+
20	136	neg	+	NT	+
21	138	+	neg	+	+
22	141	neg	neg	+	+
23	143	neg	neg	+	+
24	148	neg	neg	+	+
25	153	neg	neg	+	+
Total		11 (44%)	25(100%)	25(100%)	

Amostras positivas (+) pela PCR não foram testadas por *nested*-PCR (NT); amostras cujos vírus não foram detectados (neg).

Fonte: Umeda (2012).

ANEXO B

Resultados obtidos com as metodologias clássicas (cultivo celular e IPX) e moleculares (RT-PCR e ICC-RT-PCR) na pesquisa de rotavírus em amostras de água de reúso.

Amostra		Resultados por método			
Nº	Nº Registro do laboratório	Cultivo celular (ECP)	RT-PCR	ICC-RT-PCR	IPX
1	54	neg	+	+	+
2	66	neg	+	+	+
3	70	neg	+	+	+
4	78	neg	+	+	+
5	80	neg	+	+	+
6	86	neg	+	+	+
7	87	neg	+	+	+
8	88	neg	+	+	+
9	89	neg	+	+	+
10	90	neg	+	+	+
11	91	neg	+	+	+
12	92	neg	+	+	+
13	94	neg	neg	+	+
14	100	neg	neg	+	+
15	101	neg	+	+	+
16	102	neg	+	+	+
17	116	neg	+	+	+
18	117	neg	+	+	+
19	130	neg	+	+	+
20	136	neg	+	+	+
21	138	neg	neg	+	+
22	141	neg	+	+	+
23	143	neg	+	+	+
24	148	neg	+	+	+
25	153	neg	+	+	+
Total		0 (0%)	22 (88%)	25 (100%)	25 (100%)

Fonte: Umeda, 2012.

Amostras positivas (+); amostras cujos vírus não foram detectados (neg).

ANEXO C

Resultados obtidos com as metodologias clássicas (cultivo celular) e moleculares (PCR, *nested*-PCR e ICC-PCR) na pesquisa de adenovírus em amostras de lodo.

Nº	Nº de registro no laboratório	Amostras			Resultados por método			
		Local de coleta	% Sólidos totais	Massa analisada (g)	Cultivo celular (ECP)	PCR	<i>nested</i> -PCR	ICC-PCR
1	919704	ETE A	85	14,12	NC	neg	neg	+
2	91704	ETE A	85	14,12	NC	neg	neg	+
3	919705	ETE B	20	60	NC	neg	+	+
4	919706	ETE C	67	17,91	NC	neg	+	+
5	919706	ETE C	67	17,91	NC	neg	neg	+
6	919774	ETE D	43,4	27,65	NC	neg	+	+
7	919774	ETE D	43,4	27,65	NC	neg	+	+
8	919774	ETE D	43,4	27,65	NC	neg	+	+
9	928803	ETE E	15	80	NC	neg	+	+
10	928803	ETE E	15	80	NC	+	NT	+
11	928803	ETE E	15	80	NC	neg	+	+
12	929170	ETE D	36,7	32,6	NC	neg	+	+
13	929170	ETE D	36,7	32,6	NC	neg	+	+
14	930671	ETE B	35	34,2	NC	+	NT	+
15	930671	ETE B	35	34,2	NC	neg	+	+
16	930671	ETE B	35	34,2	NC	neg	+	+
17	930672	ETE C	58	20,6	NC	neg	+	+
18	930672	ETE C	58	20,6	NC	neg	+	+
19	930673	ETE A	15	80	NC	+	NT	+
20	930673	ETE A	15	80	NC	neg	+	+
21	930892	ETE D	39,1	30,6	NC	+	NT	+
22	930892	ETE D	39,1	30,6	NC	neg	+	+
23	930892	ETE D	39,1	30,6	NC	neg	+	+
24	930893	ETE F	34,8	34,4	NC	neg	+	+
25	930893	ETE F	34,8	34,4	+	+	NT	+
Total					1 (4 %)	22 (88%)	25 (100%)	

Fonte: Umeda, 2012. Amostras positivas (+) pela PCR não foram testadas por *nested*-PCR (NT); amostras cujos vírus não foram detectados (neg); resultados não conclusivos (NC).

ANEXO D

Resultados obtidos com as metodologias clássicas (cultivo celular e IPX) e moleculares (RT-PCR e ICC-RT-PCR) na pesquisa de rotavírus em amostras de lodo.

Amostra					Metodologias			
N°.	N° Registro do laboratório	Local de coleta	% Sólidos totais	Massa analisada (g)	Cultivo celular (ECP)	RT-PCR	ICC-RT-PCR	IPX
1	919704	ETE A	85	14,12	NC	+	+	+
2	91704	ETE A	85	14,12	NC	+	+	+
3	919705	ETE B	20	60	NC	+	+	+
4	919706	ETE C	67	17,91	NC	+	+	+
5	919706	ETE C	67	17,91	NC	+	+	+
6	919774	ETE D	43,4	27,65	NC	+	+	+
7	919774	ETE D	43,4	27,65	NC	+	+	+
8	919774	ETE D	43,4	27,65	NC	+	+	+
9	928803	ETE E	15	80	NC	+	+	+
10	928803	ETE E	15	80	NC	+	+	+
11	928803	ETE E	15	80	NC	+	+	+
12	929170	ETE D	36,7	32,6	NC	+	+	+
13	929170	ETE D	36,7	32,6	NC	+	+	+
14	930671	ETE B	35	34,2	NC	+	+	+
15	930671	ETE B	35	34,2	NC	neg	+	+
16	930671	ETE B	35	34,2	NC	+	+	+
17	930672	ETE C	58	20,6	NC	+	+	+
18	930672	ETE C	58	20,6	NC	+	+	+
19	930673	ETE A	15	80	NC	neg	+	+
20	930673	ETE A	15	80	NC	+	+	+
21	930892	ETE D	39,1	30,6	NC	+	+	+
22	930892	ETE D	39,1	30,6	NC	+	+	+
23	930892	ETE D	39,1	30,6	NC	+	+	+
24	930893	ETE F	34,8	34,4	NC	+	+	+
25	930893	ETE F	34,8	34,4	NC	+	+	+
Total					0	23	25	25
					(0%)	(92%)	(100%)	(100%)

Fonte: Umeda, 2012. Amostras positivas (+); amostras cujos vírus não foram detectados (neg); resultados não conclusivos (NC).

ANEXO E

Comparação das metodologias aplicadas para detecção de adenovírus nas amostras de água de reúso.

CC	ICC-PCR		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	11	0	11
Negativo	14	0	14
Total	25	0	25

Fonte: Umeda, 2012.

Proporção de concordância: $\frac{A+E}{C+F} = \frac{11+0}{11+14} = 0,44$ ou 44%

Proporção de discordância: $\frac{B+D}{C+F} = \frac{0+14}{11+14} = 0,56$ ou 56%

PCR	ICC-PCR		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	15	0	15
Negativo	10	0	10
Total	25	0	25

Fonte: Umeda, 2012.

Proporção de concordância: $\frac{A+E}{C+F} = \frac{15+0}{11+14} = 0,60$ ou 60%

Proporção de discordância: $\frac{B+D}{C+F} = \frac{0+10}{11+14} = 0,40$ ou 40%

Comparação das metodologias aplicadas para detecção de adenovírus nas amostras de lodo de esgoto.

PCR	ICC-PCR		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	5	0	5
Negativo	20	0	20
Total	25	0	25

Fonte: Umeda, 2012.

Proporção de concordância: $\frac{A+E}{C+F} = \frac{5+0}{11+14} = 0,20$ ou 20%

Proporção de discordância: $\frac{B+D}{C+F} = \frac{0+20}{11+14} = 0,80$ ou 80%

ANEXO F

Comparação das metodologias aplicadas para detecção de rotavírus nas amostras de água de reúso.

RT-PCR	ICC-RT-PCR		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	22	0	22
Negativo	3	0	3
Total	25	0	25

Fonte: Umeda, 2012.

Proporção de concordância: $\frac{A+E}{C+F} = \frac{22+0}{11+14} = 0,88$ ou 88%

Proporção de discordância: $\frac{B+D}{C+F} = \frac{0+3}{11+14} = 0,12$ ou 12%

IPX	ICC-PCR		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	25	0	25
Negativo	0	0	0
Total	25	0	25

Fonte: Umeda, 2012.

Proporção de concordância: $\frac{A+E}{C+F} = \frac{25+0}{11+14} = 1,0$ ou 100%

Proporção de discordância: $\frac{B+D}{C+F} = \frac{0+0}{11+14} =$ não há

Comparação das metodologias aplicadas para detecção de rotavírus nas amostras de lodo de esgoto.

RT-PCR	ICC-RT-PCR		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	23	0	23
Negativo	2	0	2
Total	25	0	25

Fonte: Umeda, 2012.

Proporção de concordância: $\frac{A+E}{C+F} = \frac{23+0}{25} = 0,92$ ou 92%

Proporção de discordância: $\frac{B+D}{C+F} = \frac{0+2}{25} = 0,08$ ou 8%

IPX	ICC-PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	25	0	25
Negativo	0	0	0
Total	25	0	25

Fonte: Umeda, 2012.

Proporção de concordância: $\frac{A+E}{C+F} = \frac{25+0}{11+14} = 1,0$ ou 100%

Proporção de discordância: $\frac{B+D}{C+F} = \frac{0+0}{11+14} =$ não há