

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

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. Ensaios 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.

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 capsídeo 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).

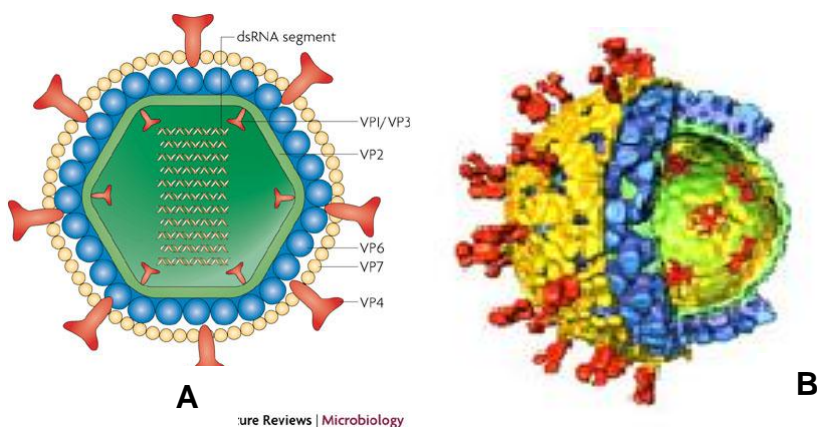
O cápside externo é formado pelas proteínas estruturais VP7 e VP4. A proteína estrutural VP7 é a segunda glicoproteína mais abundante no vírion e a mais abundante do cápside externo. Por muito tempo a VP7 foi considerada como o único antígeno com características neutralizantes. Esta proteína pode ser 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).



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) (Matthijnsens 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).

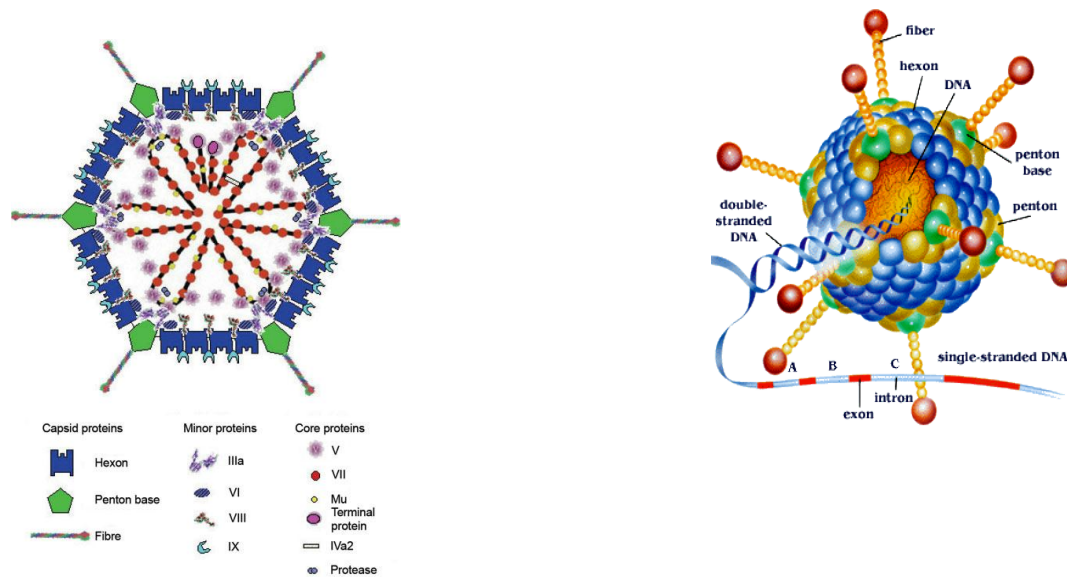
Há quatro combinações G/P que são detectadas com maior frequência ao redor do mundo: P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4. Eventualmente há relatos de infecção por sorotipos G não usuais e recentemente ocorreu a emergência do sorotipo G9 com P[6] e mais usualmente em associação com [P8] em muitos países como 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/pbuttgerit/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 bienersi</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 ingeridor 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 usaram 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 desinfectantes 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 desinfectante 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 desinfectante produz uma menor concentração de ácidos halogênicos que o cloro, é um desinfectante 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 desinfectante 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 desinfectante 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 desinfectante residual na água tratada assim um pós-desinfectante 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 | ≤ 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 | ≤ 200 coliformes fecais/100 mL |
| | Desinfecção | |
| Industrial | Secundário e | ≤ 200 coliformes fecais/100 mL |
| | Desinfecção | |
| Ambiental | Variável | ≤ 200 coliformes fecais/100 mL |
| | Secundário | |
| | 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 | |
| | Necessário 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 à 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 para 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 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 n° 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 contaminates 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 n° 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.

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 epithelial cells of a duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. *Lancete.* 1974; 1:149-51.
- Bitton D. *Introduction 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 n° 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-Hiriati 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 potential 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. Quantification 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 the 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 of 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 Nutr*. 2000;18:5-14.

Invin LS, Smith FA. One-year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluents at an 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 review. *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 hemagglutination 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 diarrhoea 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 potential 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. Comparison of four techniques of measles diagnosis: virus isolation, immunofluorescence, 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 method with human immune serum globulin for broad-spectrum detection of cultivable human enteric viruses: application to enumeration of cultivable virus in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 1985;50:1308-10.

Payment P, 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. Eletropositiva 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 hepatitis due to hepatitis 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. *Appl 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 Attration 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: BrowdyCL, 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.