

**Pesquisa de vírus entéricos humanos em  
lodos de esgoto originários de duas**

**ETEs do Estado de São Paulo:**

estabelecimento de metodologia para recuperação e  
detecção viral.

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

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Dolores Ursula  
Mehnert.

São Paulo  
2008

## RESUMO

Barrella KM. Pesquisa de vírus entéricos humanos em lodos de esgoto originários de duas ETEs do Estado de São Paulo: estabelecimento de metodologia para recuperação e detecção viral, 150p. [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

O objetivo do trabalho foi desenvolver e avaliar uma metodologia simplificada de detecção de vírus entéricos humanos em lodo de esgoto. O método foi baseado em eluição viral com solução protéica, seguida de ultracentrifugação. Alguns parâmetros foram avaliados (tempo e pH de eluição, condições de clarificação e purificação). A seguir, o método foi aplicado à pesquisa de adenovírus, vírus da hepatite A e norovírus em amostras colhidas ao longo de 12 meses em duas ETEs do estado de São Paulo. Amostras pareadas de esgoto foram também examinadas como referência da presença viral. A detecção viral por PCR e RT-PCR revelou a presença de adenovírus, incluindo os entéricos (espécie F) e vírus da hepatite A, tanto no esgoto quanto no lodo de ambas as ETEs. Norovírus não foram detectados. Vírus infecciosos não foram detectados no lodo submetido ao tratamento químico (ETE A). Parte dos vírus presentes no esgoto ficou retida no lodo, e análises estatísticas revelaram que o tratamento químico adotado na ETE A é eficiente para a inativação viral.

**Palavras-chave:** lodo de esgoto, adenovírus entéricos, vírus da hepatite A, estação de tratamento de esgoto, PCR, esgoto.

## ABSTRACT

Barrella KM. Detection of human enteric viruses in sewage sludge from two sewage treatment plants in São Paulo state [PhD thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

The aim of the study was to develop and evaluate a simplified methodology for detection of human enteric viruses in sewage sludge. The method was based on viral elution with protein solution, followed by ultracentrifugation. Several parameters were evaluated, including time and elution pH, clarifying and purifying conditions. The method was applied to the detection of adenoviruses, hepatitis A virus and noroviruses in sewage sludge samples collected for twelve months at two sewage treatment plants in Sao Paulo state. Raw sewage samples were also collected as a reference for viral presence. PCR and RT-PCR revealed the presence of adenoviruses, including the enteric ones (species F) and hepatitis A virus found both in sewage and sludge. Noroviruses were not detected in any samples. Cell culture infectious viruses were not detected in the sludge subjected to chemical treatment (STP A), and statistical analyses revealed the efficiency of this treatment for virus inactivation

**Key words:** sewage sludge, enteric adenoviruses, hepatitis A virus, sewage treatment plant, PCR, sewage.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Saneamento básico e saúde

A falta de saneamento básico e higiene e as doenças de veiculação hídrica são responsáveis por 4% das mortes anuais no mundo (FUNASA, 2004; Prüss et al., 2002). Apesar do aumento na proporção de pessoas com acesso a água e esgoto entre 1990 e 2002 (WHO/Unicef, 2004), atualmente mais de 1,1 bilhões de pessoas não possuem acesso a fornecimento de água tratada e estima-se que 2,6 bilhões de indivíduos não possuem acesso a serviços de saneamento adequados. Na América Latina 66% das pessoas têm acesso a um sistema de saneamento; as situações mais críticas são encontradas Ásia e na África, onde essa porcentagem é de apenas 18% e 13%, respectivamente. Um estudo desenvolvido pelo *Pacific Institute* (Gleick, 2002) estimou que caso não seja tomada uma ação para mudança dessa situação, até 2020 ocorrerão 135 milhões de mortes que poderiam ser evitadas.

Os impactos à saúde atribuídos à falta de saneamento são significativos e são causados pela exposição a patógenos através de várias rotas como ingestão de água contaminada, contato com parasitas como helmintos que vivem ou cujos ciclos de vida estão associados aos corpos d'água, contato direto ou indireto com fezes, contaminação da água antes ou após a captação e as relacionadas às toxinas produzidas por bactérias associadas à eutrofização de corpos d'água. Essas diferentes categorias, que muitas vezes estão associadas, demonstram como saneamento e doenças relacionadas à higiene podem afetar a população (Montgomery e Elimelech, 2007).

Quase 60% dos casos de mortalidade infantil está relacionado a doenças infecciosas, a maioria relacionada a água, saneamento e higiene (Unesco, 2003). A diarreia é a terceira maior causa de morbidade e a sexta causa de mortalidade no mundo. Devido a rápida desidratação, a diarreia é a segunda causa de mortalidade entre crianças, com 5000 mortes diárias. De cada 200 crianças que contraem diarreia, 1 vem a óbito (Pond et al., 2004; Unicef et al., 2002; UN, 2008).

A introdução de sistemas de tratamento de água e esgoto doméstico diminui drasticamente a incidência de doenças de veiculação hídrica. A OMS realizou uma pesquisa sobre avaliação dos custos e benefícios de intervenções

para melhorias nos sistemas de água e esgoto para atingir os objetivos de desenvolvimento do milênio (Hutton e Haller, 2004). O estudo levantou dados de 17 subregiões e fez uma análise a nível global. Os resultados demonstraram que em áreas em desenvolvimento cada US\$ 1,00 investido tem um retorno de US\$ 9,00. Como custo foi levado em conta o investimento total, além das despesas anuais. Os benefícios incluíram economia de tempo associado a um melhor acesso a água e esgoto, ganho em tempo de produtividade devido ao menor tempo em que o trabalhador fica afastado por estar doente, custos no setor de saúde, custos com pacientes devido a um menor número de tratamentos de doenças diarreicas, além do valor das mortes que foram prevenidas. Apesar das limitações do estudo, ficou demonstrado que os custos são realizados em um curto período, normalmente no primeiro ano, enquanto os benefícios não são tão tangíveis e são mais demorados para serem notados, o que por vezes desestimula o investimento nesse setor.

No ano 2000, a Organização das Nações Unidas estabeleceu oito metas de desenvolvimento do milênio e entre elas, a diminuição pela metade do número de pessoas sem acesso a água potável de qualidade e saneamento básico até o ano de 2015. Em 2006, a Assembléia Geral designou o ano de 2008 o ano internacional do saneamento (AIS) que tem por objetivo promover práticas de higiene e acelerar o fornecimento de saneamento adequado para as 2,6 bilhões de pessoas que não tem acesso a esse direito humano básico a fim de salvar vidas e melhorar os desenvolvimentos econômico e social (UN, 2008).

No Brasil, dados do IBGE (2004) demonstram um aumento na disponibilização de saneamento básico à população quando comparado com os dados de 1989. O abastecimento de água atinge mais de 90% dos municípios brasileiros, atendendo 76,1% da população.

Com relação aos serviços de coleta e tratamento de esgoto, a ampliação na rede ocorreu principalmente nas capitais da região Nordeste e nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná. Contudo, a situação é bastante precária: apenas 52,2% dos municípios brasileiros possuem serviços de coleta de esgoto, atendendo a 40% da população. O quadro é ainda mais grave ao verificar que, na realidade, a maioria dos municípios que possuem este tipo de serviço está concentrada na Região Sudeste (90% dos municípios, atendendo

63,6% da população). Nas outras regiões, a população atendida é de: 2,8% na Região Norte; 17,7% na Região Nordeste; 33,1% na Região Centro-Oeste e 26,1% na Região Sul (Brasil, 2004).

Em 1989, o volume de esgoto coletado era de quase 11 milhões de m<sup>3</sup>/dia, dos quais apenas 2 milhões eram tratados; em 2000 o volume coletado passou a ser de aproximadamente 14 milhões de m<sup>3</sup>/dia, com tratamento de aproximadamente 5 milhões de m<sup>3</sup>/dia (IBGE, 2004). O diagnóstico dos serviços de água e esgoto realizado em 2005 pelo Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento - Snis, verificou que apenas 31,7% dos esgotos gerados na área urbana são tratados (Snis, 2006).

O sancionamento da Lei nº 11445 (Brasil, 2007), que estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento básico, juntamente com o Programa de Aceleração do Crescimento (PAC) do governo federal (Brasil, 2007b) poderá levar a uma melhoria no quadro atual. A Lei nº 11445 é o marco regulatório do saneamento, onde estão descritas de maneira clara as regras para o setor. Já o PAC prevê o investimento de R\$ 40 bilhões no período 2007-2010, investimento esse que virá do governo central, estatais federais e do setor privado.

A meta é que a porcentagem de domicílios atendidos pela coleta de esgoto possa atingir 55,0%, o que significa 25,4 milhões de pessoas atendidas. Com relação ao fornecimento de água, o objetivo é atingir 86,0% de domicílios atendidos, enquanto que para a coleta de lixo, a meta é 47% (Brasil, 2007b). A prioridade de investimento é para saneamento integrado em favelas e palafitas, cidades grandes e cidades com até 50 mil habitantes.

## **1.2 Esgoto doméstico**

O esgoto doméstico é uma combinação de excretas humanos e animais (fezes e urina) e águas cinzas, resultantes de lavagens, banhos e cozimento, além de esgoto proveniente do comércio e de algumas indústrias (Bitton, 1997).

A composição química dos excretas é bastante complexa e fazem parte da composição cálcio, carbono, nitrogênio, matéria orgânica, fósforo (como P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e potássio (como K<sub>2</sub>O) (Feachem et al., 1983; Bitton, 1997).

O esgoto doméstico é composto principalmente por proteínas (40-60%), carboidratos (25-50%), óleos e gorduras (10%), uréia derivada da urina e traços de diversos compostos orgânicos como pesticidas, surfactantes, fenóis e poluentes como não metais (As, Se), metais (Cd, Hg, Pb), compostos de benzeno (benzeno, etilbenzeno) e compostos clorados (clorobenzeno, tetracloroetano, tricloroetano). A massa de matéria orgânica é facilmente biodegradável e consiste principalmente de carboidratos, aminoácidos, peptídeos e proteínas, ácidos voláteis, ácidos graxos e seus ésteres. A matéria orgânica ocorre como carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono orgânico particulado (COP), este último representa aproximadamente 60% do carbono orgânico e uma parte pode ser removida por sedimentação. A determinação da matéria orgânica é normalmente feita utilizando três técnicas: demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e carbono orgânico total (COT) (Bitton, 1997).

As fezes podem conter uma ampla variedade de vírus, bactérias patogênicas, ovos de helmintos e cistos de protozoários e diversas doenças infecciosas importantes são associadas aos excretas humanos. Muitos microrganismos transmitidos pela rota fecal-oral são estáveis na água e em alimentos (Feachem et al., 1983; Rusin et al., 2000). A Tabela 1 apresenta os principais patógenos encontrados no esgoto.

Tabela 1: Patógenos detectados no esgoto

<b>Patógenos</b>	<b>Doenças ou sintomas causados no organismo</b>
<b>Bactérias</b>	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenterite
<i>Escherichia coli enteropatogênica</i>	Gastroenterite
<i>Salmonella</i> spp.	Febre tifóide e gastroenterite
<i>Shigella</i> spp.	Desintéria bacilar
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
<i>Yersinia</i> spp	Gastroenterite aguda
<b>Helmintos</b>	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Distúrbios digestivos e dores abdominais
<i>Ascaris suum</i>	Tosse, dores no tórax
<i>Hymenolepis nana</i>	Himenolepíase
<i>Necatu americanis</i>	Ancilostomose
<i>Strongiloides stercoralis</i>	Estrongiloidíase
<i>Taeniorhyncus saginata</i> (antigamente denominada <i>Taenia saginata</i> )	Teníase
<i>Taenia sollium</i>	Teníase, cisticercose
<i>Trichuris trichiura</i>	Dores abdominais, diarréias, anemia, perda de peso

Tabela 1 (continuação). Tabela 1: Patógenos detectados no esgoto

<b>Patógenos</b>	<b>Doenças ou sintomas causados no organismo</b>
<b>Protozoários</b>	
<i>Balantidium coli</i>	Diarréia, desintéria
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disenteria amébrica
<i>Cryptosporidium</i>	Gastroenterites, criptosporidiose
<i>Giardia intestinalis</i>	Giardíase
<b>Vírus</b>	
Poliovírus	Paralisia, meningite, febre
Coxsackievírus	Meningite, pneumonia, hepatite, febre
Echovírus	Meningite, paralisia, encefalite, febre
Vírus da Hepatite A	Hepatite
Vírus da Hepatite E	Hepatite
Reovírus humanos	Infecções do trato respiratório e gastroenterite
Rotavírus humanos	Gastroenterite aguda com diarréia grave
Adenovírus humanos	Conjuntivite, gastroenterite aguda, infecções do trato respiratório
Norovírus	Gastroenterites epidêmicas com grave diarréia
Astrovírus humanos	Gastroenterite
Parvovírus humanos	Gastroenterite
Coronavírus humanos	Gastroenterite e doenças do trato respiratório
Torovírus humanos	Gastroenterite

Fonte: Bitton et al., 1997; Bosch, 1998; Gerba e Smith Jr, 2005.

Apesar da diversidade de microrganismos patogênicos existentes no esgoto, o processo infeccioso dependerá da entrada, multiplicação e estabelecimento desses organismos no interior do hospedeiro. A infecção não aparente é uma infecção subclínica sem sintomas aparentes e, apesar de não causar os sintomas da doença, confere o mesmo grau de imunidade. Esse portadores saudáveis constituem uma fonte potencial de infecção para outras pessoas da comunidade. A maioria dos vírus entéricos causa infecção não aparente (Feachem et al., 1983, Bitton et al., 1997, Rusin et al., 2000).

O desenvolvimento da doença depende de vários fatores como dose infectante, patogenicidade (capacidade do agente infeccioso em causar doenças e danos ao hospedeiro) e fatores ambientais e do hospedeiro. O tempo entre a infecção e o aparecimento dos sintomas clínicos é denominado de tempo de incubação, variável conforme o microrganismo.

Para ocorrer a disseminação de uma infecção, uma dose infectante do agente patogênico tem de ser capaz de passar dos excretas do indivíduo infectado ou reservatório da infecção para a boca ou outra porta de entrada de um indivíduo suscetível. A disseminação dependerá do número de patógenos excretados, na diminuição desse número durante a transmissão e da dose necessária para infectar um novo indivíduo (Bitton et al., 1997).



A liberação dos patógenos nas fezes, urina e secreções respiratórias pode ocorrer em qualquer momento durante a infecção. Apesar da maior liberação ocorrer no auge da doença, isso não é uma regra: o vírus da hepatite A tem sua máxima excreção antes do estabelecimento do quadro clínico (Bitton et al., 1997, Rusin et al., 2000). A concentração de microrganismos liberadas nas fezes varia conforme o microrganismo e a rota de transmissão: para helmintos é de  $10^4$  a  $10^5$ , para protozoários parasitas de  $10^6$  a  $10^7$ , enquanto para vírus entéricos chega a  $10^{10}$  para rotavírus e  $10^{11}$  para adenovírus (Rusin et al., 2000).

A dose infectante é relacionada à suscetibilidade do novo hospedeiro. Os dados sobre dose infectante são muito difíceis de serem obtidos. Esses dados dependem de estudos realizados com voluntários humanos, normalmente realizados em países desenvolvidos com pessoas saudáveis e áreas não endêmicas. Em áreas endêmicas com pessoas expostas a essas infecções, principalmente crianças, esses dados têm que ser vistos com cautela, já que a dose infectante pode ser bem menor que a obtida nos estudos (Feachem et al., 1983).

A resposta do hospedeiro é importante para determinar o efeito quando o indivíduo recebeu uma dada dose de um agente infeccioso. São importantes a imunidade adquirida e a relação da idade com a patologia. Por exemplo, em locais com pouco ou ausência de saneamento, as pessoas são infectadas ainda novas e crianças e adultos estão imunes. Com melhorias no saneamento, a infecção pode ocorrer mais tarde, quando as consequências patológicas são mais graves. Assim, apesar da redução na transmissão, a doença será restringida apenas com a aplicação da imunização. Um exemplo dessa situação acontece no momento na América Latina, onde o vírus da Hepatite A teve uma mudança de alta para média endemicidade (Tanaka, 2000).

Entre os microrganismos patogênicos, os vírus são os que possuem menor dose infectante e maior concentração nas fezes (Toze, 1997). Entre as doenças causadas pelos vírus, a gastroenterite aguda tem um grande impacto na população.

### **1.3 Gastroenterite aguda**

A gastroenterite aguda é uma das doenças mais comuns nos seres humanos e causa significativa de morbidade e mortalidade no mundo todo. Ela pode ser causada por mais de 20 agentes microbianos incluindo vírus, bactérias, parasitas, a maioria não produzindo inflamação.

Os sintomas clínicos podem variar de vômitos, diarreia ou ambos. Em casos graves pode levar à hospitalização e morte (Kilgore e Glass, 1997; McNulty, 1978; Wilhelm et al., 2003). A gastroenterite viral é causa de óbito de 5 a 10 milhões de pessoas por ano no mundo devido à diarreia intensa, associada ou não a febre e vômitos, que pode levar crianças a uma grave desidratação (Baron et al., 1982; Bern et al., 1992; Hudson et al., 2004; Medeiros et al., 2001; Kappus et al., 1982; Uhnoo et al., 1984; Waldman et al., 1987).

Historicamente os vírus têm sido relacionados como agentes de gastroenterites agudas quando nenhum outro patógeno é identificado. Entre 1950 e 1970, era difícil estabelecer a associação entre os vírus encontrados nas fezes com os casos de gastroenterite aguda. Vírus do gênero Enterovirus, como echovírus, coxsackie A e B, poliovírus, e outros, como adenovírus eram frequentemente isolados de indivíduos assintomáticos ou com outros problemas clínicos. Os avanços nos métodos de detecção de vírus possibilitaram a identificação dos vírus como agente etiológico da doença, e não um passageiro silencioso no trato intestinal (Kilgore e Glass, 1997). Aproximadamente metade dos casos de gastroenterites documentados todo ano não tem detectado seu agente etiológico e a suspeita é que muitos deles tenham origem viral (Abbaszadegan et al., 1999; Abad et al., 1994; Christensen, 1989; Rao e Melnick, 1986; Reynolds e Pepper, 2000; Rusin et al., 2000; Schwartzbrod, 1995).

A identificação, por microscopia eletrônica, de norovírus nas fezes de pessoas logo após um surto de gastroenterite não bacteriana na cidade de Norwalk (EUA) possibilitou a relação desse vírus como causa de gastroenterite (Kapikian et al., 1972). A partir desse trabalho, estudos empregando a microscopia eletrônica identificaram outros vírus e puderam associá-los a casos de gastroenterites. Bishop et al. (1973) observaram a presença de rotavírus na mucosa intestinal de crianças com gastroenterite. Em 1975,

astrovírus (Madeley e Cosgrove, 1975) e adenovírus (Flewett et al., 1975) também foram identificados nas fezes de crianças com diarreia aguda. As infecções virais do trato gastrointestinal variam de assintomáticas a causadoras de diarreia com grave desidratação. A gravidade da doença é caracterizada por grande perda de fluidos e eletrólitos e a rapidez com que essas perdas possam ser repostas (Kilgore e Glass, 1997).

Atualmente, os agentes virais comprovadamente responsáveis por gastroenterites agudas são: rotavírus (*Rotaviridae*), saporovírus e norovírus (*Caliciviridae*), adenovírus entéricos (*Adenoviridae*) e astrovírus (*Astroviridae*), torovírus e coronavírus (*Coronaviridae*) (Kilgore e Glass, 1997; Wilhelm et al., 2003).

As gastroenterites virais ocorrem em dois grupos epidemiológicos distintos: diarreia infantil (doença endêmica) e surtos (doença epidêmica).

Os rotavírus são os responsáveis pela maioria dos casos de diarreia aguda em crianças com menos de 5 anos de idade, causando entre 600.000 e 870.000 mortes ao ano. Os adenovírus entéricos apresentam incidências variáveis de infecções, de 1 a 8% nos países desenvolvidos e de 2 a 31% nos países em desenvolvimento, enquanto os astrovírus são responsáveis por 4 a 10% dos casos de gastroenterites agudas (Wilhelm et al., 2003).

Os norovírus são responsáveis pela maioria dos surtos de diarreia não bacteriana e também têm sido associados aos surtos causados por alimentos contaminados (Kilgore e Glass, 1997). Eles também são os principais agentes etiológicos de gastroenterites virais em adultos.

#### **1.4 Vírus presentes no meio ambiente**

Os métodos para detecção de vírus no esgoto e águas poluídas tiveram início na década de 40, quando Melnick tentou verificar a transmissão direta ou indireta de poliovírus por esgoto. Entre 1940-45 ele coletou amostras do rio *East* na cidade de Nova Iorque. Após purificar as amostras, ele inoculou cada amostra em um macaco. Apesar de não comprovar a transmissão, foi verificado que nos períodos de prevalência de poliovírus na população, eles estavam presentes em grande quantidade no esgoto, permanecendo infectivos por várias semanas. O surto de hepatite E ocorrido na cidade de Nova Delhi, Índia, em 1956 teve origem na contaminação de esgoto no Rio Jumna, local de

captação da água pela estação de tratamento levou a criação de um grupo de pesquisa de virologia ambiental em Houston (EUA), e outro de poluição viral e bacteriana em água e efluentes. Esse período é considerado como o início do campo de virologia ambiental (Rao e Melnick, 1986).

O desenvolvimento das técnicas de cultura celular possibilitou uma expansão na área de virologia. Estudos comprovaram que, comparados às bactérias termotolerantes, os enterovírus permanecem infectivos por um maior tempo no meio ambiente, são mais resistentes ao cloro e possuem uma dose infectiva 4 a 6 vezes menor que o número de bactérias necessário para iniciar uma infecção. A utilização dos enterovírus humanos específicos como poliovírus como indicadores foi proposta ainda na década de 70. Contudo ele não é adequado tanto nos países onde houve erradicação da doença, já limita sua presença no esgoto, quanto nos países onde ocorre a vacinação de um poliovírus atenuado (Azadpour-Keeley et al., 2003; Rao e Melnick, 1986).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares a partir da década de 80 foi possível uma melhor detecção de patógenos virais não apenas nas fezes mas também circulantes no meio ambiente, já que muitos estão em concentrações abaixo dos limites de detecção das outras técnicas. Assim, inúmeros estudos foram realizados para detecção de vírus entéricos no meio ambiente demonstrando que a concentração deles no esgoto não cai drasticamente devido a presença de bactérias ou mesmo após o tratamento de esgoto (Azadpour-Keeley et al., 2003).

Há quase 150 tipos de vírus entéricos humanos conhecidos que entram no corpo humano pela via oral, multiplicam no trato gastrointestinal e são excretados em grande número nas fezes dos indivíduos infectados (portadores sintomáticos ou não), atingindo números em torno de  $10^8$  a  $10^{11}$  partículas por grama de fezes. A presença de vírus no esgoto está diretamente relacionada aos vírus que são excretados pela população no momento. Uma vez liberados e atingindo o meio ambiente os vírus podem contaminar sistemas de fornecimento de água, águas recreacionais, grãos, frutos do mar e águas subterrâneas. Assim, a epidemiologia das infecções virais é influenciada pelo nível de higiene e saneamento ambiental (Rao e Melnick, 1986; Reynolds e Pepper, 2000).

A sobrevivência e infectividade dos vírus dependerão de uma série de fatores ambientais e do hospedeiro como temperatura, radiação solar, adsorção, metais pesados, quelantes orgânicos, além das atividades de bactérias, algas e protozoários. A adsorção de vírus a sedimentos parece prolongar grandemente a infectividade dos vírus (Azadpour-Keeley et al., 2003; Reynolds e Pepper, 2000) .

Na cidade de São Paulo, desde a década de 60, estudos têm detectado a presença de vírus entéricos nas águas de córrego e esgoto. Christovão et al. (1967) detectaram vírus da poliomielite tipo I, III e vírus de coxsackie em águas de irrigação de hortas do município. Na década de 70, Stewien (1979) detectou a presença e quantificou os Enterovírus presentes em esgoto colhidos de dois subdistritos da cidade, tendo-os encontrado em números que variaram de 0 a 1365 UFP/L. Oito anos depois, estudo similar desenvolvido por Marques (1987) quantificou 20 a 4.490 UFP/L. Com o aprimoramento das técnicas de detecção, a partir da década de 80 outros vírus puderam ser detectados.

Mehnert e Stewien (1993) empregando a técnica de filtração por membrana eletropositiva e os métodos de imunofluorescência indireta e imunoperoxidase direta realizaram o primeiro estudo no país sobre presença e quantificação de rotavírus em esgoto e córregos poluídos. Os rotavírus foram detectados em 20,6% das amostras de esgoto e 34,5% das amostras de córrego, com uma média geométrica de 2,2 UFF/L em esgoto e, 2,9 UFF/L em córregos. Nos mesmos locais, em estudo subsequente, Queiroz (1999) detectou rotavírus em 44,4% das amostras de esgoto e 46,4% das amostras de água de córrego, ao longo de doze meses.

Utilizando a técnica de filtração por membrana positiva e a PCR, Santos et al. (2004) detectaram adenovírus humanos em 69,4% das amostras de esgoto e 76,1% das amostras de córrego, sendo que 89,85% das amostras positivas para adenovírus continham adenovírus entéricos (HAdV-F).

Sassaroli (2002) analisou as mesmas amostras de Santos et al. (2004), mas para detecção do vírus da Hepatite A, e o detectou em 44,9% das amostras de esgoto e 63% das amostras de córrego analisadas. A caracterização genotípica do VHA demonstrou que o genótipo IB foi observado em 67,6% das amostras enquanto o genótipo IA/IB foi observado em 26,5% das amostras.

Entre os vírus transmitidos pela rota fecal-oral se destacam os adenovírus, vírus da hepatite A e norovírus, responsáveis por doenças como gastroenterites e diarreias virais, hepatites, meningites, entre outras (Sano et al., 2003).

Os norovírus (NoVs) e os adenovírus (HAdVs) estão entre os principais agentes etiológicos dos casos de gastroenterite e diarreia aguda em crianças e são transmitidos, mesmo em um baixo número, pela via fecal-oral. A veiculação é mundialmente associada à origem hídrica pela ingestão de água e de alimentos contaminados. A gastroenterite viral é causa de óbito de 5 a 10 milhões de pessoas por ano no mundo devido à diarreia intensa, associada ou não a febre e vômitos, que pode levar crianças a uma grave desidratação (Baron et al., 1982; Kappus et al., 1982; Uhnoo et al., 1984; Waldman et al., 1987; Bern et al., 1992; Medeiros et al., 2001; Hudson et al., 2004).

#### 1.4.1 Adenovírus

O adenovírus humano, HAdV, é um dos candidatos a indicador viral no meio ambiente dada a sua ampla detecção em esgoto, rios, águas costeiras, piscinas, água doce e até na água potável destinada ao consumo humano (Enriquez et al., 1995; Pina et al., 1998; Jiang, 2006; Bofill-Mass et al., 2006).

Os HAdVs pertencem ao gênero *Mastadenovirus*, à família *Adenoviridae* e são vírus DNA líticos de 70 a 90 nm. Seu material genético é composto por DNA de filamento duplo associado a proteínas. Estruturalmente possuem uma simetria icosaédrica, com 252 capsômeros subdivididos em 240 hexons e 12 pentons. A fibra é projetada a partir dos 5 hexons que circundam a base de cada penton (Shenk, 1996). A Figura 1 mostra um esquema do vírus e uma micrografia de adenovírus em microscopia eletrônica.

Há 51 sorotipos de adenovírus conhecidos que são divididos em 6 espécies (A a F) baseado na homologia de DNA e propriedades de hemoaglutinação e potencial oncogênico em roedores (Shenk, 1996; Benkô, 1999).

Os adenovírus causam infecções persistentes caracterizadas pela excreção fecal, prolongada e intermitente. Eles normalmente infectam e replicam em vários locais do trato respiratório, na cavidade ocular e no trato

gastrointestinal, mas podem afetar outros órgãos como pâncreas, miocárdio e o sistema nervoso central, que pode estar envolvido na meningoencefalite.

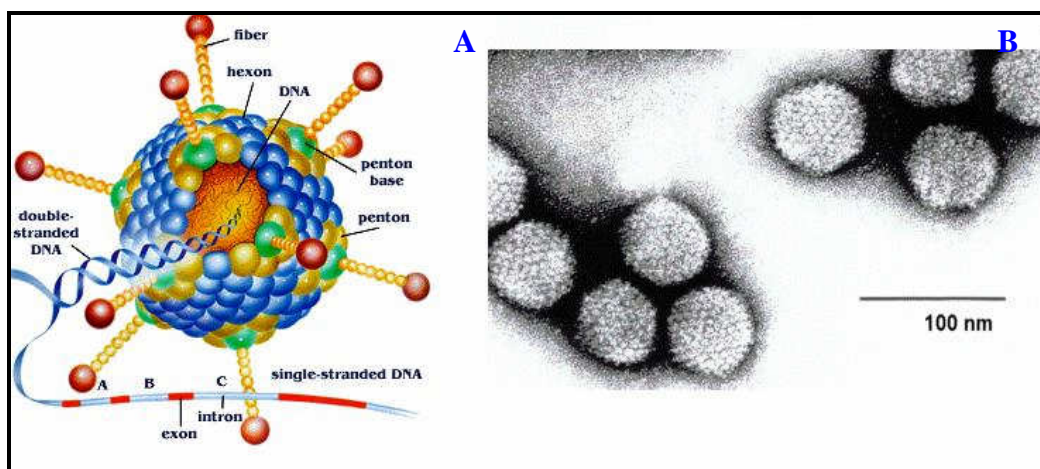


Figura 1. Esquema de uma partícula de adenovírus (A) e micrografia eletrônica mostrando os vírus formando os agrupamentos (B).

Fonte: <http://www.flupatrol.com/wp-content/uploads/2007/05/big-adenovirus-v3.gif>; [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdata/html/key/Images/em\\_adeno.gif](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdata/html/key/Images/em_adeno.gif).

Muitas infecções são subclínicas e resultam na formação de anticorpos. Os vírus podem replicar por meses após a infecção inicial no trato gastrointestinal e respiratório. Entre as infecções causadas há doenças do trato respiratório, cistite hemorrágica aguda, ceratoconjuntivite, miocardite, além de infecções em indivíduos imunodeprimidos (Horwitz, 1996; Kojaoghlanian et al., 2003). A Tabela 2 apresenta os sorotipos, relacionando com as espécies e as infecções causadas.

Tabela 2: Classificação dos adenovírus e infecções causadas pelas espécies

Espécie	Sorotipos	Infecções
A	12, 18, 31	Infecções respiratórias e gastroenterites em crianças menores de 1 ano
B	3, 17, 14, 16, 21; 11, 34 e 35	Infecções respiratórias, intestinais e do trato urinário
C	1, 2, 5 e 6	Trato respiratório superior (adenóides e tonsilas)
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-51	Infecções assintomáticas e ceratoconjuntivite epidêmica
E	4	Surtos epidêmicos de infecções respiratórias em recrutas militares
F	40, 41	Gastroenterite aguda infantil

Fonte: Azar et al. (1988); De Jong (1983); Flewett et al. (1975); Horwitz (1996); Moraes et al. (1987); Van der veen (1963); Wadell (1984).

Aproximadamente metade das crianças menores de 5 anos de idade infectadas com adenovírus tipo HAdV-1, HAdV-2, HAdV-3 ou HAdV-5 excretam vírus nas fezes por longos períodos (Allard et al., 1992). Após uma infecção a imunidade é conferida ao sorotipo específico e, por isso, os adultos são mais suscetíveis às infecções que são menos comuns na infância (Horwitz, 1996).

Cinek et al. (2006) realizaram estudo na Noruega sobre a presença de enterovírus e adenovírus em fezes de crianças com propensão genética à diabetes tipo 1. Das 1255 amostras de fezes analisadas, os adenovírus foram detectados em 138 (11,0%) amostras, mas a presença dos vírus não foi associada a diarreia e vômito, mas a febre e gripe.

Diversas espécies de adenovírus são excretadas nas fezes, porém apenas os sorotipos da espécie F, HAdV-40 e HAdV-41, são responsáveis pelos casos de gastroenterites virais causadas por adenovírus (Horwitz, 1996). Os adenovírus entéricos podem ser isolados de fezes de crianças infectadas com aproximadamente  $10^{11}$  partículas virais/g de fezes (De Jong, 1983; Uhnoo et al., 1984; Allard et al., 1990). Em estudo realizado com 416 crianças de até 15 anos com gastroenterite aguda, Uhnoo et al. (1984) detectaram adenovírus entéricos em 13,5% dos casos. O sintoma predominante das infecções foi a diarreia, com uma duração média de 8,6 dias (HAdV-40) a 12,2 dias (HAdV-41) e um terço das crianças infectadas com HAdV-41 tiveram sintomas prolongados, ou seja, por mais de 14 dias.

Os adenovírus entéricos ocupam o terceiro lugar em termos de importância no estabelecimento de diarreia de origem não bacteriana no Brasil com uma incidência variável nas fezes de crianças com gastroenterite (Hársi et al., 1995; Pereira Filho et al., 2007).

Em estudo realizado na cidade de São Paulo, Hársi et al. (1995) detectaram adenovírus entéricos em 4,5% das amostras analisadas.

Soares et al. (2002) analisando amostras de fezes de crianças com diarreia provenientes de Rio de Janeiro, Niterói, Londrina e Juiz de Fora, detectaram adenovírus em 4,9% das amostras analisadas, sendo os adenovírus entéricos detectados em 7,2% das amostras.

Pereira Filho et al. (2007) realizaram um estudo sobre detecção de adenovírus associados a gastroenterites agudas em crianças com até 5 anos nas cidades do Rio de Janeiro e Salvador. O estudo examinou 3.060 amostras



de fezes e 61 (2%) amostras foram positivas para adenovírus. Apesar da baixa positividade, entre os adenovírus, a espécie F foi a mais prevalente (65%). Além da ocorrência de adenovírus da espécie A, C, D, houve também coinfeção entre as espécies F/D, F/A, F/C e B/D.

Cox et al. (2005) realizaram um estudo na cidade de Sidney, Austrália sobre detecção de adenovírus humanos nas fezes de outros animais, domésticos e silvestres. Os resultados comprovaram que as fezes humanas são as únicas fontes conhecidas de adenovírus humanos. Assim, a detecção de adenovírus no meio ambiente é devido a contaminação com esgotos humanos não tratado ou tratado inadequadamente.

Os adenovírus humanos têm sido detectados em altas concentrações no esgoto doméstico, apresentando uma ausência ou baixa sazonalidade.

Em Atenas, Grécia, Krikelis et al. (1985) detectaram a presença de adenovírus em 100% das amostras colhidas ao longo de 15 meses.

Estudos realizados na cidade de Barcelona, Espanha, detectaram adenovírus humanos em 93% (Puig et al., 1994) e 100% das amostras (Girones et al., 1995).

Na cidade de São Paulo, Santos et al. (2004) detectaram adenovírus humanos em 69,4% das amostras de esgoto; destas, 89,85% continham adenovírus entéricos.

O emprego da técnica de PCR possibilitou uma maior detecção de adenovírus humanos no meio ambiente, quando comparado aos resultados obtidos utilizando cultura celular, principalmente nos casos da presença de adenovírus entéricos, que são fastidiosos.

A detecção de adenovírus em águas de rio, mar, em esgoto, esgoto tratado e frutos do mar por Pina et al. (1998) utilizando a técnica de PCR, levou à proposição da utilização dos adenovírus como indicador molecular da presença de vírus humanos no meio ambiente e frutos do mar.

O desenvolvimento da técnica de PCR em tempo real (Heid et al., 1996) possibilitou a detecção e quantificação de partículas virais. A aplicação desse método em amostras ambientais por He e Jiang (2005) e Bofill-Mass et al. (2006) possibilitou a detecção e quantificação de adenovírus em amostras de esgoto bruto e efluente tratado no sul da Califórnia e na cidade de Barcelona. Em ambos os casos, os resultados obtidos demonstram a estabilidade dos

adenovírus no meio ambiente e às técnicas de tratamento empregadas nas estações de tratamento.

Além da detecção por PCR em tempo real, He e Jiang (2005) também compararam aplicaram as amostras em cultura celular e os resultados obtidos com ambas as técnicas foram diferentes. Como as técnicas moleculares não distinguem os vírus infectivos dos não infectivos, os resultados podem ser superestimados. Por outro lado, as limitações dos ensaios de cultura de célula acabam por subestimar a presença dos patógenos virais presentes. Assim, são necessários estudos que façam uma relação entre infectividade viral e quantidade genômica.

A detecção ampla dos adenovírus no meio ambiente também está relacionada a sua estabilidade a ação de agentes físicos e químicos, possibilitando uma permanência prolongada.

Enriquez et al. (1995) realizaram um estudo comparando a infectividade dos adenovírus, poliovírus e vírus da hepatite A presentes em efluentes de estação de tratamento de esgoto, águas continentais e água do mar. Após os tratamentos primário e secundário, a quantidade de adenovírus infectivos foi um pouco maior que os outros vírus. Nos outros ambientes, a permanência de adenovírus foi bastante superior. Essa maior resistência, comparando aos outros vírus estudados pode ser devido a natureza do adenovírus, que é um vírus de DNA dupla fita. Assim, se danificado, esses vírus poderiam ser reparados pelos mecanismos de reparo de DNA existentes no hospedeiro, que, junto com os dímeros de pirimidina, podem reparar uma ampla variedade de danos ao DNA. Dessa forma, caso uma fita for danificada pelos fatores ambientais, a outra ainda pode servir como molde para replicação da progênie. A menor sobrevivência de vírus infectivos nas amostras de esgoto, comparada as amostras de águas continentais e do mar, pode ser devido a danos nas proteínas dos capsídeos, impossibilitando os vírus a entrarem nas células.

#### 1.4.2 Norovírus

É um vírus de RNA fita simples positiva, não envelopado, com um diâmetro aproximado de 26 a 35nm, com estrutura icosaédrica de padrão regular e genoma de 7900 nucleotídeos. Protegido por um capsídeo protéico composto por uma proteína maior VP1 e pequenas cópias de uma proteína

estrutural secundária básica (VP2). A extremidade 5' do genoma tem um cap, uma proteína ligada ao genoma (VPg) e na extremidade 3' tem uma poliamina tornando este vírus altamente infeccioso (Xi et al., 1990; Roper et al., 1990; Prasad et al., 1999; Glass et al., 2000; Hudson et al., 2004). A Figura 2 mostra um esquema e uma foto de microscopia eletrônica de norovírus.

Com base na organização do genoma, os NoVs foram classificados dentro da Família *Caliciviridae*. As comparações das seqüências na região do genomas que codifica a RNA polimerase dependente de RNA mostraram uma subdivisão dos vírus dentro do grupo, em cinco grandes grupos genéticos I (GI), II (GII), III (GIII), IV (GIV) e V (GV). A maioria dos norovírus humanos está incluída nos grupos GI e GII. No grupo GI estão incluídos vírus Norwalk (NV), Southampton (SOV) e Desert Shield (DSV), e no GII estão incluídos: Lordsdale (LV), México (MX), Toronto (TV), Hawaii (HV), Snow Mountain Agent (SMA), White River (WRV), Grimsby (GRV), Gwnedd (GV) (Atmar e Estes, 2001; David e Szucs, 2003). Por não ser um vírus cultivável, é necessária a análise da seqüência de nucleotídeos para a classificação final dos vírus (Castilho et al., 2006).

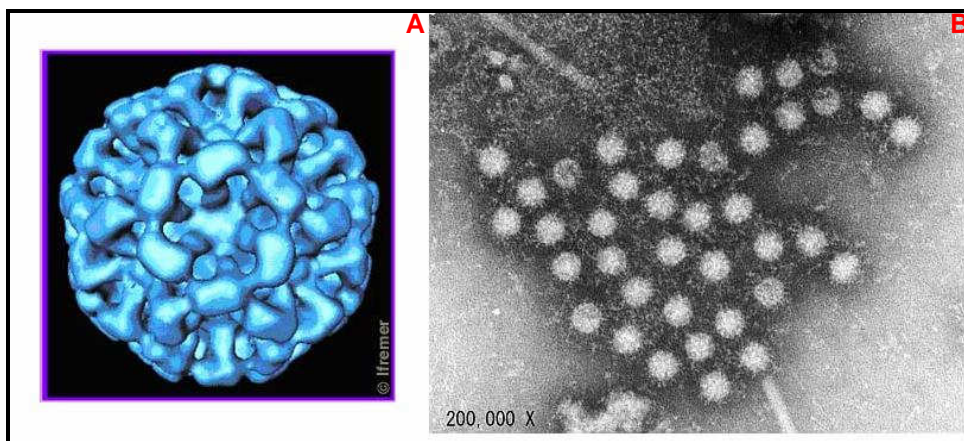


Figura 2. Esquema de uma partícula de norovírus (A) e micrografia eletrônica (B).  
Fontes: <http://www.pyroenergen.com/articles/images/norwalk-virus.jpg> e <http://www.ifremer.fr/microbio/labo-microbiologie/photos/norovirus.jpg>.

Principal agente responsável por surtos de gastroenterites virais agudas e diarreia esporádica em comunidades no mundo, é um vírus altamente debilitante que causa surtos repentinos de gastroenterite. Altamente infeccioso e estável, é mais resistente às técnicas de desinfecção que a maioria das bactérias e outros agentes virais, tais como níveis de cloro inferiores a 10 ppm,

congelamento e aquecimento a 60°C. Também podem persistir no meio ambiente, sendo proposto que podem circular no ambiente em pequeno número em uma população até que um indivíduo infectado contamine uma fonte comum de água ou alimento, resultando em um surto explosivo (Dolin et al., 1972; Fankhauser et al., 1998; Roper et al., 1990; Graham et al., 1994; Glass et al., 2000; Lopman et al., 2002; Rockx et al., 2002; Mead et al., 2003; Marshall et al., 2003; Hudson et al., 2004).

No Brasil, Castilho et al. (2006) realizaram uma análise genealógica em amostras fecais colhidas de crianças com gastroenterite no estado de São Paulo onde ficou demonstrado que diferentes cepas circulam no país, incluindo misturas de genótipos, descrição feita pela primeira vez em amostras de fezes de crianças em casos esporádicos.

Estudos foram realizados em alguns países para detecção de Norovírus no esgoto, águas continentais, esgoto tratado e frutos do mar.

Lodder et al. (1999) realizaram um monitoramento no esgoto durante um surto de Norovírus nas cidades holandesas de Reeuwijk, Apeldoorn e Enkhuizen. O seqüenciamento dos produtos da RT-PCR mostraram similaridade entre as fezes dos pacientes e os vírus detectados no esgoto. Em outro estudo, realizado em Apeldoorn em esgoto e rios, os norovírus também foram detectados, sendo mais prevalente a estirpe Lordsdale (Lodder e Husman, 2005).

Em Wyoming (EUA), Parshioniar et al. (2003) puderam relacionar um surto de norovírus à água subterrânea contaminada com esgoto.

Ueki et al. (2005) realizaram um estudo no Japão envolvendo pacientes com gastroenterites, esgoto, efluente tratado, rio e frutos do mar. Em todos os ambientes foram detectados Norovírus, inclusive no efluente tratado, o que indica que talvez o sistema de tratamento convencional pode não ser suficiente para remover os vírus.

Van den Berg et al. (2005) detectaram várias cepas de norovírus em amostras de esgoto bruto e tratado na Europa.

Tendo em vista que a dose infectante de norovírus é de apenas 10 unidades detectáveis por PCR (UDP) (Lindesmith et al., 2003) é importante a realização de estudos que visem a degradação desses vírus nos tratamentos de água e esgoto existentes, como o trabalho realizado por Kato et al. (2005)

que desenvolveram um sistema com desinfecção por UV e fotocatalíticos, chamado de sistema TiO<sub>2</sub>/UV, o qual foi capaz de decompor as partículas de norovírus presentes.

#### 1.4.3 Vírus da Hepatite A

O vírus da Hepatite A (VHA) foi identificado pela primeira vez em 1973. Pertence à família *Picornaviridae*, gênero *Hepatovirus*. É um vírus esférico, não envelopado, com um diâmetro de 27 a 32 nm, composto de proteína viral e RNA. O genoma consiste de RNA fita simples positiva de aproximadamente 7,5 kb contendo, com a extremidade 5' representando uma região não codificadora, ligada covalentemente à proteína viral VPg. Uma única poliproteína é expressa por uma ORF que se estende pela maior parte do RNA genômico, que é posteriormente clivada para formar proteínas do capsídeo viral e algumas proteínas não estruturais. A extremidade 3' possui uma cauda poli-A com 40 a 80 nucleotídeos. O genoma do VHA é infeccioso por si, já que o RNA de fita simples positiva atua como molécula mensageira para a tradução de polipeptídeos virais e como molde para replicação do genoma viral. A replicação do genoma ocorre no citoplasma do hepatócito infectado por um mecanismo envolvendo uma RNA polimerase dependente do RNA (WHO, 2000; Hollinger e Ticehurst, 1996). Na Figura 3 é possível observar a microscopia eletrônica desses vírus.

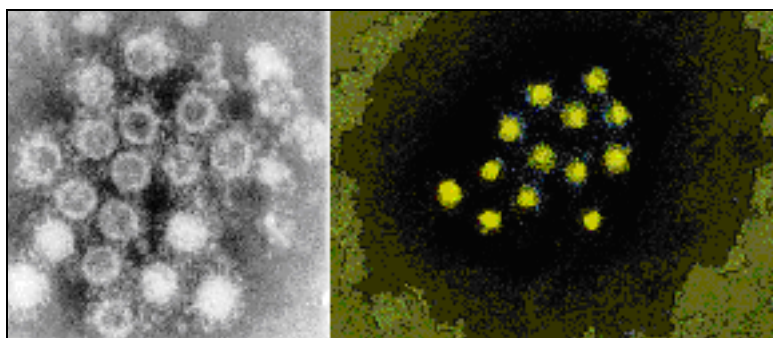


Figura 3. Fotomicrografias eletrônicas do vírus da hepatite A. Fontes: <http://www.wales.nhs.uk/sites3/gallery/719/hepatitisa.jpg> e <http://www.vacinas.org.br>.

A primeira adaptação do VHA em cultura de célula ocorreu em 1979 (Provost e Hilleman) mas as células infectadas contêm baixo título de vírus. Atualmente as técnicas de biologia molecular como a RT-PCR têm sido as

mais aplicadas na detecção desses vírus, seja em amostras clínicas ou ambientais (Cuthbert, 2001; Sassaroli, 2002; Pintó et al., 2007).

O vírus da Hepatite A tem grande importância devido ao alto número de surtos no mundo. A incidência mundial estimada é que ela seja superior a 1,4 milhões de casos ao ano, com uma maior incidência em jovens e adultos com mais de 50 anos. Sua infecção ocorre pela via fecal-oral, pela ingestão de material contaminado. No caso de áreas com falta de saneamento e higiene, as infecções ocorrem na infância. Com a melhoria das condições de saneamento, a transmissão muda para grupos etários mais velhos, aumentando a incidência de casos sintomáticos. A contaminação com o vírus ocorre tipicamente pela ingestão de água ou alimentos contaminados. A excreção do vírus nas fezes do paciente ocorre em concentrações relativamente altas 2 a 3 semanas antes do estabelecimento de sintomas clínicos e 8 dias após estabelecimento da icterícia. Em cerca de 4% dos pacientes, ela causa hepatite fulminante e morte. (White e Fenner, 1994; Hollinger e Ticehurst, 1996; Tanaka, 2000; WHO, 2000).

No Brasil, estudos em diferentes cidades brasileiras observou a prevalência de marcadores anti-VHA em crianças de baixo poder econômico nas cidades de Paracambi, Rio de Janeiro, Porto Alegre e Campinas (Ferreira et al., 1998; Pinho et al., 1998; Villar, 2002). Em estudo realizado nas regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste, Clemens et al. (2000) observaram uma maior prevalência de anticorpos anti-VHA na região Norte.

Como os adenovírus e os norovírus, o vírus da Hepatite A também foi detectado em amostras de esgoto bruto e tratado (Divizia et al., 1998; Pintó et al., 2007; Sassaroli, 2002).

A detecção de RNA fita simples no meio ambiente sugere uma excreção constante, pois o RNA se degrada rapidamente após liberação do capsídeo (Limsawat e Ohgaki, 1997). Dessa forma, apesar da reação da PCR não permitir a distinção entre partículas virais infectivas e não infectivas, no caso de vírus RNA fita simples como o VHA, um resultado positivo indica a presença recente de vírus potencialmente viáveis.

No meio ambiente, o VHA é resistente a tratamentos com ácidos (resiste ao pH 1 por 2 horas em temperatura ambiente), éter 20%, clorofórmio, diclorodifluorometano, triclorotrifluorometano, ácido percloroacético ( 300 mg/L

por 15 min a 20°C) e não é inativado por detergentes (permanece ativo a 37°C por 30 min com SDS a 1%). A inativação do VHA é possível a uma temperatura superior a 85°C; pode também ser inativado por autoclavagem (121°C/ 20 min), radiação ultravioleta, formalina (8% por 1 min a 25°C), permanganato de potássio (30 mg/L por 5 min), cloro (cloro livre residual com concentração de 2 a 2,5 mg/L por 15 min) e compostos contendo cloro (3 a 10 mg/L de hipoclorito de sódio a 20°C por 5 a 15 min) (WHO, 2000).

### **1.5 Técnicas para detecção e quantificação de partículas virais**

Os dois métodos mais comuns para detecção e quantificação de vírus em cultura celular são o efeito citopático (ECP) e a técnica de ensaio em placas.

Os efeitos citopáticos são mudanças observadas na estrutura das células inoculadas com os vírus resultantes da replicação celular. Entre as mudanças há arredondamento das células, aumento no volume do citoplasma celular alterando o tamanho da célula, ou detecção de espaços na monocamada causados por lise celular. Os ECPs são distintos conforme o vírus inoculado, como a formação de agregamentos semelhantes a cachos de uvas (adenovírus) ou arredondamento das células (enterovírus). Há dois métodos para estabelecer o título viral por ECP, a diluição serial *endpoint* ou TCID<sub>50</sub>, onde são adicionadas diluições seriadas da suspensão viral nas células e o ECP é observado ao longo do tempo. O título, ou *endpoint* é a maior diluição de vírus capaz de produzir ECP em 50% das cavidades. O segundo método é chamado de número mais provável, NMP, onde há observação do ECP em monocamadas com diferentes diluições da suspensão viral e utilização de tabelas de NMP para determinar o número de vírus (Metcalf et al., 1995; Josephson et al., 2000).

Os ensaios de placa são empregados para detecção de vírus que formam áreas de lise celular, ou placas, em monocamada celular que recebeu um meio nutriente solidificado. Cada placa tem origem em uma única partícula viral infecciosa e o título do vírus pode ser estabelecido contando o número de placas ou unidades formadoras de placa (UFP) (Metcalf et al., 1995; Josephson et al., 2000).

Nem todas as partículas virais presentes em uma amostra podem ser detectadas pela cultura celular porque nem todas estão infecciosas. Além disso, pode haver ausência de receptores celulares ou o tempo de incubação das células pode não ser suficiente para os vírus se ligarem aos receptores virais nas células hospedeiras. Em amostras ambientais a detecção de vírus por cultura celular muitas vezes é dificultada pela presença de bactérias, fungos ou substâncias tóxicas, sendo importante o uso de antibióticos, antifúngicos e tratamento das amostras com substâncias como Vertrel ou clorofórmio (Metcalf et al., 1995; Josephson et al., 2000).

Além disso há vírus que não produzem alterações na células ou lise celular mesmo em altas concentrações. Por fim há ainda os vírus que ainda não são cultiváveis, caso atual dos norovírus. Nesses casos outras técnicas devem ser utilizadas para detecção de vírus como imunoenaios ou a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do ácido nucléico viral (Metcalf et al., 1995; Josephson et al., 2000).

A técnica de PCR foi desenvolvida na década de 80 revolucionando as metodologias de biologia molecular ao amplificar pequenas quantidades do material genético alvo. A PCR é uma reação enzimática relativamente simples onde uma enzima DNA polimerase é utilizada para copiar a seqüência alvo de DNA repetidamente por 25 a 40 ciclos. O produto da PCR é visualizada em um gel de agarose corado com brometo de etídeo. O tamanho do fragmento é estimado comparando com um marcador de peso molecular e a utilização de um DNA padrão de tamanho conhecido (controle positivo) permite concluir se o fragmento obtido é realmente o esperado. A especificidade da reação é obtida com as seqüências de oligonucleotídeos utilizadas, baseadas em seqüências conservadas e universal a todas espécies conhecidas do organismo alvo. A técnica de PCR foi desenvolvida para detecção do DNA. No caso de vírus de RNA há utilização de uma enzima de transcriptase reversa e o método é conhecido como RT-PCR. A primeira etapa da RT-PCR é fazer uma cópia de DNA complementar da seqüência de RNA de interesse, o cDNA. A técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) é baseada na restrição enzimática dos produtos amplificados nas reações de PCR. As endonucleases utilizadas cortam o fragmento de DNA em fragmentos menores em seqüências



específicas que possibilitam, por exemplo, a distinção de espécies de adenovírus.

Apesar dos avanços propiciados pela técnica de PCR, a utilização do gel de agarose apresenta algumas desvantagens na visualização dos produtos amplificados como baixa precisão devida a baixa sensibilidade e resolução, não ser automatizado e os resultados são apenas baseados no tamanho do fragmento e não expressos em números.

A técnica de PCR em tempo real permite não apenas a detecção, mas também a quantificação de partículas virais ao amplificar as seqüências virais utilizando tampões com moléculas fluorogênicas que permite a identificação através da emissão de luz e cor. É um método mais rápido e mais sensível que a técnica de PCR e a leitura em tempo real haverá coleta de dados a cada ciclo de amplificação e para a análise de resultados será usada a fase geométrica da PCR, onde a eficiência de amplificação dos fragmentos e a reprodutibilidade dos resultados são muito altas. A quantificação pode ser absoluta ou relativa. A quantificação absoluta ocorre quando são obtidos valores numéricos com alguma unidade, como número de cópias ou nanogramas de DNA, enquanto na relativa são comparados os Cts de cada amostra e os resultados representam ordens de grandeza. A quantificação absoluta necessita de amostras padrões previamente quantificadas por método independente como espectrofotômetros. Há várias moléculas fluorescentes utilizadas, como SYBR™ Green e TaqMan™. As moléculas de SYBR™ Green emitem grande quantidade de sinal fluorescente ao intercalar com DNA dupla-fita, enquanto no sistema TaqMan™ a emissão fluorescente depende de uma sonda que anela especificamente entre dois oligonucleotídeos. O software do termociclador processa as calibrações do equipamento, coleta e analisa os dados fluorescentes e disponibiliza os dados em gráficos (Heid, 1996; Mackay et al., 2002; Applied Biosystems, 2007).

As técnicas da PCR e PCR em tempo real têm como limitação a não diferenciação entre partículas virais infecciosas e não infecciosas, o que tem levado ao emprego das técnicas em conjunto com técnicas de cultura celular.

## 1.6 Tratamento de esgoto

Há relatos de coleta de dejetos humanos no Império Romano, quando os resíduos eram coletados e descartados no corpo d'água mais próximo. Com o passar dos séculos o aumento da população levou à degradação dos corpos d'água, afetando a vida aquática pela queda do nível de oxigênio. A preocupação sobre o controle dos dejetos teve início a partir de 1855, ano em que John Snow provou que um surto de cólera foi causado pela contaminação de esgoto na água captada pelo Rio Tâmis (Toze, 1997). O tratamento de esgoto foi iniciado entre o final do século XIX e início do século XX. Na época os processos foram desenvolvidos para tratar a matéria orgânica antes da disposição em corpos d'água. Os sistemas de tratamento implantados na Europa e nos Estados Unidos visavam primeiramente a diminuição da carga orgânica no efluente tratado e nunca foram projetados para atingirem uma alta remoção de patógenos liberados nas fezes. Apenas recentemente, com o aumento na demanda de água, com limitação no fornecimento e a necessidade em reutilizar esse esgoto, o tratamento também começou a incluir a redução de patógenos e substâncias tóxicas (Feachem et al., 1983; Gerba, 2000).

A coleta e tratamento de esgoto consiste em um sistema de tubulação de esgoto e uma estação de tratamento de efluentes (ETE) seguido de descarte do efluente tratado nos corpos d'água. O tratamento compreende as seguintes etapas: tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário (ou avançado) (Biton, 1997; FUNASA, 2004; Gerba 2000; Rao e Melnick, 1986).

O tratamento primário é feito por processos físicos. Ao entrar na estação, o esgoto passa por grades mecanizadas para retenção de fragmentos e materiais grandes que poderiam causar o entupimento de equipamentos da estação. A seguir ele passa por grades médias, que separam materiais sólidos menores como fraldas e garrafas, e por caixas de areia para retenção de areias e partículas com diâmetro relativo maiores que 200 mm. O fluxo de esgoto é então bombeado para um tanque de sedimentação primário onde o esgoto flui vagarosamente permitindo que os sólidos em suspensão de maior densidade sedimentem gradualmente no fundo, formando o lodo primário bruto. Nessa fase não há remoção de patógenos, a não ser os adsorvidos ao material particulado que sedimentou (Gerba, 2000).

O tratamento secundário remove sólidos e matéria orgânica não sedimentável e, eventualmente alguns nutrientes como nitrogênio e fósforo. É a etapa de remoção biológica dos poluentes. O tratamento secundário tem por objetivo a degradação biológica de compostos carbonáceos e utiliza processos unitários biológicos (lodo ativado, filtros de pedras e lagoas de oxidação) e químicos (desinfecção). Com a degradação biológica, ocorre naturalmente a decomposição de carboidratos, óleos e graxas e proteínas a compostos mais simples, como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , dependendo do tipo de processo predominante. As bactérias que efetuam o tratamento, por outro lado, se reproduzem e têm sua massa total aumentada em função da quantidade de matéria degradada (Gerba, 2000; Universidade da água, 2008).

Entre os tratamentos secundários, um dos mais utilizados é o sistema de lodos ativados. O efluente proveniente do decantador primário é bombeado para um tanque de aeração onde o esgoto é agitado com o ar injetado e uma massa líquida de microrganismos (lodo ativado) que se alimentam da matéria orgânica contida no efluente. O oxigênio injetado promove o crescimento dos microrganismos e a decomposição da matéria orgânica (Gerba, 2000; Universidade da água, 2008). A seguir 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). A concentração de patógenos é reduzida pela ação de microrganismos antagônicos ou pela adsorção ou incorporação ao lodo secundário. Uma baixa sedimentação pode ocorrer devido a mudanças bruscas de temperatura e pH, ausência de nutrientes e presença de metais tóxicos e compostos orgânicos. Há também problemas quando há um excesso de microrganismos filamentosos. Normalmente esses microrganismos predominam quando o teor de oxigênio dissolvido é baixo, há uma baixa oferta de matéria orgânica aos microrganismos presentes no tanque de aeração, baixa quantidade de nutrientes e altos níveis de sulfeto (Bitton, 1997; Gerba, 2000).

A não ser que sejam realizadas alterações no processo de lodos ativados, o efluente do tratamento secundário ainda possui nitrogênio e fósforo em quantidade, concentração e formas que podem provocar problemas no corpo receptor, dependendo de suas condições específicas, dando origem ao

fenômeno conhecido como eutrofização, que é sentido pela intensa proliferação de algas (Gerba, 2000).

O tratamento terciário tem por objetivo a redução das concentrações de compostos orgânicos, turbidez, nitrogênio, fósforo, metais e patógenos. É uma proteção adicional aos organismos que vivem nos corpos d'água que recebem esse efluente tratado e pode ser empregado para irrigação (de grãos ou campos de golfe), recreação (em lagos ou estuários) ou para fins potáveis (Bitton, 1997; Gerba, 2000).

A remoção de patógenos virais nos tratamentos de esgoto convencionais é devido mais a adsorção deles ao material particulado, permanecendo concentrado no lodo do que a uma efetiva remoção (Gerba e Smith, 2005). Entre os tratamentos convencionais, o de lodos ativados é o mais eficaz. Apesar de estudos terem sido realizados tanto em escala real quanto piloto, não se sabe ao certo o que realmente ocorre ao longo do tempo, devido tanto à qualidade do esgoto que entra na estação quanto na dinâmica dos processos que ocorrem na estação. O tratamento terciário empregando osmose reversa ou ultrafiltração apresentam uma maior eficiência (Gerba, 2000). A detecção de patógenos virais em efluente tratado realizado em diversos locais do mundo é um indicador de que as técnicas empregadas atualmente não são tão eficientes (Baggi et al., 2001; Enriquez et al., 1995; van Berg et al., 2005; Ueki et al., 2005).

Para Feachem et al. (1983), as características de remoção das tecnologias devem ser relacionadas às concentrações de patógenos específicos que estão entrando no sistema, à intenção da prática do reúso, às maneiras mais adequadas sobre disposição final e aos riscos de saúde associados a esse material. Diferentes patógenos ocorrem em concentrações diversas e são afetados de maneira diferente por um dado tratamento.

A radiação ultravioleta (UV) tem sido vista como uma alternativa à desinfecção química de água potável e efluente tratado por produzir menos subprodutos tóxicos. A UV atua na inativação dos microrganismos por ser absorvida pelos ácidos nucleicos destes, causando fotoprodutos como dímeros de timina na mesma fita de ácido nucleico. Se o dano causado ao DNA não é reparado, a replicação é bloqueada levando à inativação dos microrganismos (Ko et al., 2005).

Em 1996, Meng e Gerba realizaram ensaios laboratoriais para comparação das taxas de inativação dos adenovírus entéricos HAdV-40 e HAdV-41 com poliovírus tipo 1, colifagos MS-2 e PRD-1. Os resultados demonstraram que o HAdV-40 tem uma maior resistência a esse tipo de tratamento, sendo necessário a aplicação de  $124 \text{ mW s/cm}^3$  para inativar 99,99% de HAdV-40, enquanto para polio-1, o menos resistente, a aplicação de dose necessária para a mesma taxa de inativação é de apenas  $21,7 \text{ mW s/cm}^3$ . Para HAdV-41 a dose é de  $111,8 \text{ mW s/cm}^3$ .

Ao comparar a taxa de inativação de enterovírus e adenovírus da espécie 2, HAdV-2 por UV, Gerba et al (2002) também observaram uma maior resistência do HAdV-2 ( $160 \text{ mW s/cm}^3$ ), comparada às taxas de  $33 \text{ mW s/cm}^3$  (echovirus 1);  $28 \text{ mW s/cm}^3$  (echovirus 2) e de  $31 \text{ mW s/cm}^3$  (poliovírus 1)

A dificuldade em cultivar os adenovírus entéricos e a demora em se obter um efeito citopático nos ensaios levou ao desenvolvimento de um método analítico utilizando cultura de células e detecção de RNA mensageiro (RNAm) para verificar a infectividade de HAdV-41 (Ko et al., 2003). Ao utilizar essa técnica para verificar a inativação de HAdV-41 pela UV, Ko et al. (2005) verificaram que o HAdV-41 tem uma resistência à UV maior que os resultados obtidos no estudo realizado por Meng e Gerba (1996), sendo semelhantes aos encontrados para HAdV-40.

Todos os estudos acima descritos foram realizados utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio com baixa pressão, caracterizada por radiação produzida a  $253,7 \text{ nm}$ . Ao realizar estudos utilizando uma radiação UV policromática, comparando à monocromáticas de baixa pressão, Linden et al (2007) obtiveram uma melhora na inativação de adenovírus.

No Brasil não há disponibilidade de informações sobre os tratamento de esgotos realizados pelas estações de tratamento nas diversas regiões do país. Os dados fornecidos pelo governo federal se limitam a caracterização das empresas prestadores dos serviços (municipal, estadual, privada ou mista) e a indicação da porcentagem da população com serviços de coleta e tratamento de esgoto (IBGE, 2004).

## 1.7 Lodo de esgoto

Durante as diferentes etapas de tratamento do esgoto ocorrerá a geração de um resíduo de consistência semi-sólida denominado lodo, com características que variam conforme os resíduos que o originaram, os tipos e níveis de tratamento a que o efluente foi submetido. O lodo de esgoto contém todos os poluentes originários das atividades, hábitos alimentares e nível de saúde da população atendida pela rede coletora de esgoto, retratando exatamente as características da comunidade, e pode variar com o tempo e a capacidade de remoção da estação de tratamento (Bitton, 1997; Bitton, 1997b; FUNASA, 2004; Matson et al., 1987; Pillai, 2007; Pinto, 2003; Rendón et al., 2002; Saae, 2006; Von Sperling e Gonçalves, 2003).

O aumento no número de estações de tratamento de esgotos nos últimos anos levou a um aumento na produção de lodo, mas não há dados consistentes quanto à produção e disposição final de lodo no Brasil. As estimativas existentes são baseadas na população beneficiada com serviços de coleta e tratamento de esgoto, e o valor seria entre 90.000 a 350.000 t/dia de lodo líquido, ou 9.000 a 13.000t/dia de lodo desagüado a ser disposto (Bios, 2001).

De maneira geral, durante o tratamento de esgotos há formação dos seguintes subprodutos sólidos: material granulado, areia, espuma, lodo primário, lodo secundário e lodo químico, conforme o tipo de tratamento empregado. As principais etapas do tratamento de lodo incluem: adensamento para remoção de umidade, estabilização para remoção de matéria orgânica, condicionamento do lodo para desidratação, desagüamento para remoção da umidade, higienização para remoção de patógenos e disposição final. A higienização é uma etapa necessária para disposição agrícola do lodo, mas não se for enviada para aterro (Von Sperling e Andreoli, 2003).

Durante o tratamento de esgoto, diversas substâncias indesejáveis acabam se concentrando no lodo. Entre essas substâncias há metais pesados, poluentes orgânicos e microrganismos patogênicos. A presença dessas substâncias dependerá das características do esgoto bruto e do sistema de tratamento, e a presença de contaminantes químicos está diretamente ligada ao recebimento de efluentes industriais na rede coletora (da Silva et al., 2003).

Entre os metais pesados que podem estar presentes no lodo há cádmio, chumbo, mercúrio, níquel, zinco, cromo, arsênico, alumínio e boro. A presença dessas substâncias normalmente está relacionada ao descarte de indústrias de galvanoplastia, indústrias químicas e metálicas (da Silva et al., 2003).

Há vários poluentes orgânicos perigosos que podem estar presentes no lodo, como cianeto, fenol, cloreto de metileno, tolueno, etil benzeno, tricloroetileno, tetracoloetileno, clorofórmio, xileno, cresóis, acetato de etila, ftalato de bis-2-til-hexila, metil sobutil acetona entre muitos outros (da Silva et al., 2003).

Entre os microrganismos patogênicos há helmintos, bactérias, protozoários, vírus e fungos. Apesar dos processos de estabilização do lodo como digestão aeróbia e anaeróbia terem a capacidade de remoção e inativação de alguns microrganismos, principalmente bactérias, outros microrganismos não são, necessitando de uma etapa complementar para sua inativação. Como não é possível a inativação de todos os organismos presentes, a higienização do lodo procura reduzir a patogenicidade do lodo a níveis que não causem risco à população, principalmente se esse lodo será disposto no solo. Entre os mecanismos de higienização tem-se tratamento térmico, tratamento químico com elevação do pH para pelo menos 12 por 72 horas, radiação utilizando raios beta e gama e a compostagem, secagem em leitos de areia, compostagem, além de tratamentos chamados de não convencionais como irradiação, pasteurização, digestão aeróbia termófila e tratamento térmico (Ward, 1987; Schwartzbrod, 1995; Pires, 2001). Schwartzbrod (1995) afirma que o método de tratamento de lodo que eliminará totalmente os vírus é o tratamento térmico.

A CETESB, em sua Norma 4230 (1999) aceita como processos de desinfecção de lodo: digestão aeróbia (a ar ou oxigênio); secagem em leitos de areia ou bacias pavimentadas ou não (mínimo 3 meses), digestão anaeróbia por 15 dias a 33-55°C ou 60 dias a 20°C; estabilização com cal em quantidade até elevação de pH a 12 após 2 horas de contato; compostagem com temperatura mínima da biomassa de 40°C, durante pelo menos 5 dias e desde que conservando, ao longo de 4 horas sucessivas nesses 5 dias, uma temperatura superior a 55°C.

Entre as técnicas de tratamento, a compostagem vem recebendo uma crescente atenção desde a década de 70 como alternativa economicamente viável e ambientalmente segura para estabilização e disposição final dos lodos provenientes de estações de efluentes para posterior uso como condicionador de solos (Castillo et al., 2001). O tratamento do lodo é baseado na desidratação seguida por mistura com um agente de massa como galhos de árvores. Esse material é submetido a aeração ou agitação periódica (Schwartzbrod, 1995).

A temperatura é um dos fatores mais críticos na compostagem e as elevadas temperaturas atingidas durante o processo são fundamentais para a alta taxa de decomposição, para destruição de coliformes e inativação de vírus. O sucesso da compostagem também depende da construção da leira e do nível de oxigênio. A heterogeneidade do material muitas vezes dificulta a verificação da inativação dos vírus durante a compostagem (Schwartzbrod, 1995; Herman e Maier, 2000).

Haug (1993) em estudo realizado durante um ano sobre ocorrência de bactérias entéricas, vírus e ovos de *Ascaris* em leiras de compostagem, detectaram que os vírus poderiam permanecer viáveis por 25 dias de compostagem se a massa não atingir as temperaturas ideais. Metcalf et al. (1995) afirmam que os processos de tratamento de lodo, incluindo compostagem reduzem, mas não eliminam os vírus entéricos, que permanecem viáveis por um período superior a 30 dias de digestão a 50°C, período que pode ser superior no caso do vírus da hepatite A (VHA) por ser termoresistente.

#### 1.7.1 Reciclagem agrícola do lodo

A destinação final do lodo é essencial ao sucesso de um sistema de saneamento, mas ainda é comum encontrar projetos de ETEs que omitam o tema gestão de resíduos, adotando alternativas inadequadas de disposição final. Apesar de representar de 1 a 2% do volume do esgoto tratado, o seu gerenciamento tem um custo entre 20% a 60% do total gasto com a operação de uma ETE. A destinação final de lodo é uma operação complexa, já que muitas vezes ultrapassa os limites das ETEs (Von Sperling e Andreoli, 2003).



A escassez de áreas aptas à construção de aterros sanitários, os custos e a poluição atmosférica associados aos incineradores levou a propostas de disposição em solo agrícola do lodo, devido aos aspectos positivos do ponto de vista agrônômico. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) publicou a Resolução 359/2006, define procedimentos, padrões e requisitos para o uso agrícola do lodo de esgoto doméstico procedente de ETEs (CONAMA, 2006).

A disposição agrícola de lodo é baseada principalmente nos aspectos positivos do ponto de vista agrônômico: presença de nutrientes úteis à agricultura (N, P, K, Zn, Cu, Mn, Mo) e melhora da estrutura do solo ocasionada pela matéria orgânica (Bitton, 1997c). No Brasil, diversos trabalhos têm enfatizado o lado positivo desta opção (Andreoli et al., 1999; Andreoli et al., 2000; Costa et al., 2001; Silva, 2001; Valim et al., 1999).

Não obstante os aspectos positivos, conforme a saúde da população, as características do esgoto (esgoto residencial ou industrial) e do sistema de tratamento, o lodo pode apresentar contaminantes que podem atingir as águas subterrâneas, solo e grãos. O lodo pode assim se tornar uma fonte de contaminação ao meio ambiente e aos seres humanos quando introduzido como fertilizante na agricultura sem nenhum tratamento. Entre os contaminantes há metais pesados, poluentes orgânicos variados e patógenos, como helmintos, protozoários, bactérias, fungos e vírus.

Assim, é necessário realizar uma caracterização cuidadosa das características do solo, do lodo e das espécies a serem cultivadas antes da aplicação do lodo. A composição química do lodo de esgoto é importante ao desenvolver as recomendações para as taxas de aplicação de lodo na área a ser cultivada, reduzindo os riscos de contaminação da água subterrânea e na emissão de odores, etc. Do contrário, a aplicação do lodo pode ser um impacto tóxico em potencial, especialmente quando o lodo contém altas concentrações de elementos tóxicos. Como a biodisponibilidade dos metais pesados originários do lodo aumenta com o uso a longo prazo, é importante realizar análises de biodisponibilidade ao longo do tempo. A utilização de matéria orgânica para misturar ao lodo e a utilização da cal podem minimizar os impactos negativos em potencial (Singh e Agrawal, 2007).

Straub et al (1995) ao realizarem estudos em solo de uma fazenda que teve irrigação com lodo digerido anaerobicamente durante 7 anos, detectaram

partículas virais em 21 das 24 amostras através da PCR e demonstraram um transporte significativo de vírus tanto horizontal quanto verticalmente.

A manutenção da infectividade das partículas virais no solo depende principalmente do tipo de solo, nível de umidade e temperatura.

Os vírus entéricos presentes no solo como resultado da pulverização ou irrigação migram para estratos mais profundos do solo, podendo atingir a água subterrânea como resultado do sucessivo fenômeno de adsorção-desorção, dependentes dos tipos de vírus presentes, as características do solo e precipitação. Os fatores que mais controlam o transporte de vírus no solo são: tipo de solo, sorotipo do vírus, comprimento iônico da solução do solo, pH, compostos orgânicos solúveis presentes nos efluentes e taxa hidráulica de escoamento (Schwartzbrod, 1995; Azadpour-Keeley, 2003).

#### 1.7.2 Detecção de vírus no lodo

Os vírus podem estar presentes no lodo tratado, infectivos ou não. Assim, o lodo proveniente das ETEs pode ser uma fonte de contaminação ao meio ambiente e aos seres humanos quando é introduzido como fertilizante na agricultura sem nenhum tratamento, razão pela qual é de extrema importância a realização de estudos que visem a detecção, quantificação e distribuição de vírus que circulam no meio ambiente (Abbaszadegan et al., 1999). Apesar da detecção de outros vírus entéricos além dos enterovírus em amostras ambientais, a maioria dos estudos em lodo de esgoto ainda é realizada visando a detecção de enterovírus.

Os procedimentos para detecção de vírus no lodo devem permitir a recuperação de vírus de diferentes tipos de lodo, posto que o tipo de lodo pode influenciar na recuperação do vírus; produzir uma amostra final pequena o suficiente para permitir um ensaio econômico de toda a amostra; produzir uma amostra final livre de contaminantes bacterianos e fúngicos e que não seja tóxica às culturas celulares (Farrah, 1987).

Desde a década de 70, diversas metodologias foram desenvolvidas para extração e detecção de vírus presente no lodo, a maioria visando a detecção de enterovírus. De maneira geral, as etapas básicas e presentes em todas as técnicas envolvem eluição das partículas virais do lodo, clarificação por centrifugação com retirada do sobrenadante.

Antes da eluição das partículas virais, algumas metodologias indicam a precipitação das partículas com  $\text{AlCl}_3$  e ajuste da solução para um pH 3,5 (Berman, Berg e Safferman, 1981; Hurst e Goyke, 1986; Soares et al., 1994; USEPA, 1992); ou Glicina 1 M pH 2,0 (Scheuermen et al., 1996).

Para a eluição das partículas virais são utilizados eluentes com volume 2 a 9 vezes maior que o do lodo original. Os tipos de solução indicadas como eluente é bastante variável: solução de extrato de carne em diferentes pH e concentrações (Ahmed e Sorensen, 1995; Albert e Schwartzbrod, 1991; Scheuerman et al., 1991; Schwartzbrod e Mathieu, 1986; Soares et al., 1994; USEPA, 1992); solução de borato com extrato de carne a 3% (Albert e Schwartzbrod, 1991); Glicina (Chung et al., 1996); solução contendo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{CaCl}_2$  (Tartera e Jofre, 1987) e água destilada (Glass et al., 1978).

A mistura entre o lodo e o eluente pode ser feita por agitação mecânica ou magnética, sonicação ou pela combinação deles. O período de contato entre eluente e lodo é bastante variável, de 3 minutos (Schwartzbrod e Mathieu, 1986) a 2 horas (Jofre et al., 1989). Entre as metodologias, 3 indicam a sonicação da solução (Ahmed e Sorensen, 1995; Glass et al., 1978; Schwartzbrod e Mathieu, 1986).

Esse estágio é seguido por uma clarificação para eliminação dos sólidos, normalmente realizado por centrifugação com velocidade e tempo variáveis. Basicamente cada metodologia estabeleceu uma velocidade e tempo diferente; para citar alguns: 1350 x g por 15 minutos (Hurst e Goyke, 1986), 1500 x g por 15 minutos (Albert e Schwartzbrod, 1991) ou 20 minutos (Alouini e Sobsey, 1995) 2500 x g por 15 minutos (Soares et al., 1994, Sano et al., 2003), 5000 x g por 1 hora (Tartera e Jofre, 1987; Ahmed e Sorensen, 1995), 14000 x g por 10 minutos (Scheuerman, 1991).

Após a clarificação o sobrenadante é neutralizado. Algumas metodologias ainda indicam outros passos como filtração do sobrenadante (Schwarzbrod, 1995) ou concentração por floculação orgânica (Glass et al., 1978, Berman et al., 1981, Hurst e Goyke, 1986).

Dois estudos (Mignotte et al., 1999; Monpoeho et al., 2001) avaliaram várias das metodologias descritas e concluíram que a mais adequada para eluição de vírus é também uma das mais simples, a desenvolvida por Ahmed e

Sorensen (1995), que utiliza a solução de extrato de carne a 10% em pH 9,0 como eluente. A solução com o lodo é agitada por 15 minutos e submetida a sonicação. Após centrifugação a 10000 x g por 45 minutos a 4°C, o sobrenadante é neutralizado e constitui o extrato.

Apesar da detecção de outros vírus entéricos que não enterovírus em amostras ambientais, a maioria dos estudos em lodo de esgoto ainda é realizada visando a detecção de enterovírus. Entre os trabalhos publicados recentemente, apenas a equipe de pesquisa do Dr. Aaron Margolin tem realizado estudos com o adenovírus humano tipo 5, rotavírus e o vírus da hepatite A (Bean et al., 2007; Hansen et al., 2007).

Assim, é importante realizar ensaios para avaliação de uma metodologia que permita a recuperação de outros vírus além dos enterovírus. Entre os vírus uma metodologia deve ser capaz de recuperar adenovírus, devido a sua estabilidade no meio ambiente, vírus da hepatite A cuja partícula é infecciosa por si, além de rotavírus e norovírus, importantes à Saúde Pública pelas infecções que causam.

Entre as fases no processamento da amostra de lodo, a mais crítica é a eluição das partículas virais do lodo.

Apesar da eluição de partículas virais em amostras ambientais como esgoto (Mehnert, 1993; Santos et al., 2002; Sassaroli et al., 2002; Queiroz, 1999) e em amostras de lodo (Ahmed e Sorensen, 1995 entre outros) na maior parte das vezes ocorrer em pH 9,0, não necessariamente esse pH alcalino é o mais adequado para o lodo sólido. Diversas metodologias que apresentam uma boa recuperação de partículas virais do lodo, quando líquido, ao serem aplicadas na recuperação de partículas virais do lodo sólido têm essa recuperação bastante reduzida. Isso foi demonstrado nos ensaios de comparação de metodologias desenvolvidos por Mignotte et al. (1999) e Monpoeho et al. (2001). Berg e Sullivan (1988) demonstraram um resultado muito importante sobre a eluição de vírus de lodo sólido, em que a eluição de enterovírus realizada em pH 7,0 foi superior ou semelhante à eluição realizada em pH 9,0.

Os estudos sobre transporte de vírus no solo indicam que um dos fatores mais importantes é a adsorção dos vírus ao material particulado (Azadpour-Kelley et al., 2003; Dowd, 1998; Gerba, 1994; Woessner et al.,

2001). Gerba (1984) realizou uma ampla e complexa revisão sobre os aspectos teóricos e aplicados da adsorção de vírus às superfícies. Devido ao seu tamanho, os vírus são de natureza coloidal, assim as teorias que descrevem o comportamento coloidal podem ser aplicados nos estudos dos vírus. O comportamento dependerá dos vírus estudado, tendo sido sugerido que as diferenças de carga na superfície do virion têm um papel importante na adsorção de vírus aos sólidos.

A maioria dos vírus possuem em sua superfície proteínas que contêm aminoácidos com grupos básicos e ácidos fracos, que com a ionização fornecem uma carga elétrica ao capsídeo. Cada grupo no polipeptídeo possui uma constante de dissociação característica e a variação nas constantes asseguram uma variação nas cargas conforme o pH. Em um dado pH, definido como ponto isoelétrico, ( $pI$ ), a ionização do virion é neutra, com diferentes cargas positiva e negativa ao longo da superfície. O  $pI$  fornece uma identificação da carga geral do vírus sob dado pH. Os vírus assim, estão carregados positivamente abaixo de seu  $pI$  e carregados negativamente acima dele. Com o conhecimento do  $pI$  do vírus e do lodo seria possível estabelecer o pH mais adequado para eluição das partículas virais do lodo.

Dowd et al. (1998) realizaram estudos sobre adsorção e transporte de vírus em solos arenosos e o  $pI$  foi um fator determinante no controle da adsorção viral em aquíferos. Estudos com colóides verificaram que a desadsorção normalmente ocorre 2 unidades de pH acima do  $pI$  (Stumm e Morgan, 1996). Contudo, são poucos os vírus com um  $pI$  estabelecido. Entre os vírus com  $pI$  conhecidos estão reovírus 3, rinovírus 2, polio 1 e 2, echovírus 1, vírus coxsackie A 21, vaccinia, influenza e varíola e alguns bacteriófagos. Entre eles, o com menor  $pI$  é reovírus 3 (3,9). A maioria dos enterovírus possui um  $pI$  entre 5 e 6 (Gerba, 1984). Esta pode ser uma das razões dos resultados obtidos por Berg e Sullivan (1988): se são necessárias duas unidades de pH para eluir os vírus, o pH ideal de eluição dos enterovírus seria entre 7 e 8. Como os  $pI$  de muitos vírus não são conhecidos, esses dados indicam a necessidade na realização de testes de eluição viral no lodo utilizando diferentes pH.

Apesar do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) ter publicado, em 2006, a Resolução 359 que define procedimentos, padrões e

requisitos para o uso agrícola do lodo de esgoto doméstico procedente de ETEs (CONAMA, 2006), ainda não foram realizados estudos sistemáticos no Brasil sobre a presença de patógenos virais nesse material.

A adoção de uma metodologia simplificada e rápida, que possibilite a recuperação de vírus entéricos humanos de amostras de lodos de esgoto com diferentes características, provenientes de diferentes locais do país, empregando de técnicas clássicas e moleculares, é ferramenta essencial em futuras avaliações sobre o risco em se utilizar esse material como coadjuvante na agricultura.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ A metodologia proposta foi capaz de recuperar vírus entéricos humanos de lodo de esgoto;
- ✓ Adenovírus foram detectados, com caracterização dos adenovírus da espécie F, no esgoto e no lodo. Vírus da hepatite A foram detectados nas amostras de esgoto e lodo, porém não foi possível a quantificação das partículas. Vírus infecciosos foram detectados no esgoto de ambas as ETEs e no lodo da ETE Tatu;
- ✓ Na impossibilidade de se realizarem ensaios em cultura celular, a detecção do vírus da hepatite A por RT-PCR pode ser utilizada como um indicador da presença de vírus infecciosos;
- ✓ A detecção de norovírus não foi possível, recomendando-se a análise das amostras recém-colhidas.
- ✓ O tratamento do lodo adotado pela ETE ABC, baseado na alcalinização do pH se mostrou eficiente na redução do índice de positividade de vírus presentes no lodo;
- ✓ O tratamento do lodo é recomendado para redução de patógenos virais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad FX, Pintó RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:3704-10.

Abbaszadegan M, Stewart P, LeChevallier M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:444-9.

Águas de Limeira. Informações sobre as estações de tratamento de esgotos da empresa. Disponível em: <http://www.aguasd limeira.com.br> [2007, nov 12].

Ahmed AU, Sorensen DL. Kinetics of pathogen destruction during storage of dewatered biosolids. *Wat Environ Res.* 1995;67:143-50.

Albert M, Schwartzbrod L. Recovery of Enterovirus from primary sludge using three elution concentration procedures. *Wat Sci Tech.* 1991; 24: 225-8.

Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. Polymerase Chain Reaction for detection of adenoviruses in stool samples. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:2659-67.

Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenovirus in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step Polymerase Chain Reaction. *J Med Virol.* 1992;37:149-57.

Alouini S, Sobsey MD. Evaluation of an extraction-precipitation method for recovering hepatitis A virus and poliovirus from hardshell clams (*Mercenaria mercenaria*). *Wat Sci Tech.* 1995; 5-6: 465-69.

American Type Culture Collection™ - ATCC. FRhK-4. <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CRL-1688>. [2008, jan 4].

American Type Culture Collection™ -ATCC. HEK-293. <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CRL-1573>. [2008b, jan 4].

American Type Culture Collection™-ATCC. HEp-2. <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CCL-23>. [2008c, jan 4]



Andreoli CV, Pegorini ES, Chaves IC, Fowler RB, Ferreira AC, Fernandes F. Proposta de licenciamento ambiental e controle da reciclagem agrícola de lodo de esgoto. In: Anais do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1999, Rio de Janeiro. Anais VI-030. Rio de Janeiro 1999; Abes. p. 2596-605.

Andreoli CV, Pegorini ES, Castro LAR. Estudo preliminar da viabilidade de uso do lodo de esgoto para fins agrícolas no município de foz do Iguaçu. In: Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental; 2000; Porto Alegre. Rio de Janeiro: Abes. p. III-073.

Andreoli CV, Von Sperling M, Fernandes F. Prefácio. In: Andreoli CV, Von Sperling M, Fernandes F, editores. Lodo de esgotos: tratamento e disposição final. Belo Horizonte: UFMG; 2003.

Applied Biosystems. Expressão gênica empregando PCR quantitativo. São Paulo: ABI expert training center; 2007. 70p.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. Clin Microbiol Rev. 2001;14:15-37.

Ausar SF, Foubert TR, Hudson MH, Vedvick, TS, Middaugh CR. Conformational stability and disassembly of norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. J Biol Chem. 2006; 281:19478-88.

Azadpour-Keeley A, Faulkner BR, Chen J. Movement and longevity of viruses in the subsurface. EPA/540/S-03/500. Cincinnati: USEPA; April 2003. 24p.

Azar R, Varsano N, Mileguir F, Mendelson F. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in Israel: identification of two genome types, Ad7k and Ad7d2. J Med Virol. 1998;54:291-9.

Baggi F, Demarta A, Peduzzi R. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. Res Microbiol. 2001;152:743-51.

Baron RC, Murphy FD, Greenberg HB, Davis CD, Bregman DJ, Gary GW, Hughes JM, Schonberger LB. Norwalk gastrointestinal illness: an outbreak associated with swimming in a recreational lake and secondary person-to-person transmission. Am J Epidemiol. 1982;115:163-72.

Bean, CL, Hansen JJ, Margolin AB, Balkin H, Batzer G, Widmer G. Class B Alkaline Stabilization to Achieve Pathogen Inactivation. *Int J Environ Res Public Health*. 2007;4:53-60.

Benkô M., Harrach B, Russell WC. *Adenoviridae*. In: Buchen-Osmond C, editor. ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. ICTVdB Management, Columbia University, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Oracle, AZ, USA. 1999.

Berg G, Sullivan G. Optimum pH levels for eluting enteroviruses from sludge solids with beef extract. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54:1880-81.

Berman D, Rohr ME, Safferman RS. A method for recovering viruses from sludge. *J Virol Methods*. 1981;3:283-91.

Bern C, Martines J, Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrheal disease: a ten-year update. *Bull WHO*. 1992;70:705-14.

Bios. Caderno especial. O saneamento em números. *Revista Bios*. Rio de Janeiro: ABES. 2001;v:17-36. jan/mar.

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

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

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

Bitton D. Public Health aspects of wastewater and biosolids disposal on land. In: \_\_\_\_\_. *Wastewater microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley-Liss; 1997c. Chapter 20:

Bofill-Mass S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. Quantification and stability of human

adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:7894-96.

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

Brasil. Lei °11445 (Jan 05, 2007). *Diário Oficial da União* nº167. (Jan 08, 2007).

Brasil. Secretaria de Imprensa e Porta-Voz da Presidência da República. Programa de Aceleração do Crescimento 2007-2010. Material preparado para a imprensa. 2007b. 55p.

Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinje J, Rácz ML. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3947-53.

Centro de Estudos de Venenos de Animais Peçonhentos. Vírus da hepatite A. <http://www.vacinas.org.br> [2007 dez 12]

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - Sabesp. Informações sobre as estações de tratamento de esgotos da empresa. Disponível em <http://www.sabesp.com.br>. [2007 Nov 12].

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Aplicação de biossólidos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas: critérios para projeto e operação: norma P 4230. São Paulo: CETESB; 1999.

Christensen ML. Human viral gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev.* 1989;2:51-89.

Christovão DA, Candeias JAN, Iaria ST. Condições sanitárias das águas de irrigação de hortas do município de S. Paulo. II. Isolamento de vírus entéricos. *Rev Saúde Pública.* 1967;1:12-17.

Chung H, Jaykus LA, Sobsey MD. Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62: 3772-8.

Cinek O, Witsø E, Jeansson S, Rasmussen T, Drevinek P, Wetlesen T, Vavrinec J, Grinde B, Rønningen KS. Longitudinal observation of enterovirus and adenovirus in stool samples from Norwegian infants with the highest genetic risk of type 1 diabetes. *J Clin Virol.* 2006;35:33-40.

Clemens SAC, Fonseca, JC, Azevedo T, Cavalcanti A, Silveira TR, Castilho MC, Clemens R. Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in four center in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33: 1-10.

Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 39 9 (Ago 29, 2006). Diário Oficial da União nº167, (Ago 30, 2006) p.141-6.

Costa AN, Costa AFS, Silva ALB, Andrade BFE, Gonçalves RF. Utilização agrícola do lodo de ETE anaeróbia como fonte de matéria orgânica e nutrientes no mamoeiro. In: Anais do 21 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental; João Pessoa, 2001. Rio de Janeiro: Abes. Anais; p. II-179.

Cox P, Griffith M, Angles M, Deere D, Ferguson C. Concentrations of pathogens and indicators in animal feces in the Sidney watershed. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 5929-34.

Cuthbert JA. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:38-58.

David MO, Szucs G. Calicivirus infections in children. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16:241-6.

Da Silva, SMCP, Fernandes F, Soccol VT, Morita DM. Principais contaminantes do lodo. In: Andreoli CV, Von Sperling M, Fernandes F, editores. Lodo de esgotos: tratamento e disposição final. Belo Horizonte: UFMG; 2003. p. 69-119.

De Jong JC, Wigand R, Kidd AH, Wadell G, Kapsenberg JG, Muzerie CJ, Wemembol AG, FirzlaffRG. Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. *J Med Virol.* 1983; 11: 215-31.

De Leon R, Shieh C, Baric RS, Sobsey MD. Detection of enterovirus and hepatitis A virus in environmental samples by gene probes and polymerase chain reaction. In: *Adv Wat Anal Treat*; 1990. p. 833-53. Proceedings of the Water Quality Technology Conference. Denver: American Water Works Association.

Divizia MV, Ruscio V, Degener AM, Pana A. Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization. *New Microbiol.* 1998; 21:161-7.

Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, Hornick R, Chanock RM. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1972;140:578-83.

Dowd SE, Pillai SD, Wang S, Corapcioglu MY. Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64: 405-10.

Dulbecco R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1952;38:747-52.

Enriquez CE, Hurst CJ, Gerba CP. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and waste water. *Wat Res.* 1995;29:2548-53.

Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of "Norwalklike viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 1998;178:1571-8.

Farrah SR. Methods for concentration and recovery of viruses from wastewater sludges. In: Rao VC, Melnick JL. *Human viruses in sediments, sludges and soils.* Florida: CRC Press, 1987. Chapter 7.

Feachem GR, Bradley DJ, Garelick H, Mara DD. Sanitation and disease. Health aspects of excreta and wastewater management. *World Bank studies in water supply and sanitation 3.* John Wiley & Sons: New York. 1983. 504p.

Ferreira CT, Pereira-Lima J, Barros FC. Hepatitis A antibodies in two socioeconomically distinct populations of Porto Alegre, Southern Brazil. *J Top Pediatr.* 1998;44:184-5.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Morris CA. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet.* 1975;1:4-5.

Fundação Nacional da Saúde. Esgotamento sanitário. In: *Manual de Saneamento.* Brasília: FUNASA; 2004. Cap. 3.

Gerba CP. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv Appl Microbiol.* 1984;30:133-68.

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

Gerba CP, Gramos DM, Nwachuku N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenoviruses 2 by UV light. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:5167-9.

Gerba CP, Smith Jr JE. Sources of Pathogenic Microorganisms and Their Fate during Land Application of Wastes. *J Environ Qual.* 2005;34:42–8.

Girones R, Puig M, Allard A, Lucena F, Wadell G, Jofre J. Detection of adenovirus and enterovirus by PCR amplification in polluted waters. *Wat Sci Tech.*1995;31:351-7.

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

Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Breese JN, Monroe SS. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis.* 2000;181 Suppl 2:S254–61.

Gleick PH. *Dirty Water: Estimated Deaths from Water-Related Diseases 2000–2020.* Pacific Institute: Oakland; 2002.

Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis.* 1994;170:34–43.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenoviruses type 5. *J Gen Virol.* 1997;36:59-74.

Gruber F, Falkner FG, Dorner F, Hämmerle. Quantitation of viral DNA by real-time PCR applying duplex amplification, internal standardization, and two-color fluorescen detection. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:2837-39.

Hansen JJ, Warden PS, Margolin AB. Inactivation of Adenovirus Type 5, Rotavirus WA and Male Specific Coliphage (MS2) in Biosolids by Lime Stabilization. *Int J Environ Res Public Health*. 2007;4:61-7.

Hársi CM, Rolim DP, Gomes SA, Gilio AE, Stewien KE, Baldacci ER, Candeias JA. Adenovirus genome types isolated from stools of children with gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol*. 1995;26:1783-6.

Haug RT. *The Practical Handbook of Compost Engineering*. Chelsea : Lewis; 1993.

He J, Jiang S. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by Real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:2250-5.

Health of Wales Information Service. Hepatitis A virus. <http://www.wales.nhs.uk/sites3/gallery/719/hepatitisa.jpg> [2007 dez 12]

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6:986-94.

Herman DC, Maier RM. Consequences of Biogeochemical cycles gone wild. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP, editors. *Environmental microbiology*. Academic Press: San Diego, 2000. p. 347-360.

Hollinger FB, Ticehurst, JR. Hepatitis A virus. In: Fields BN, Knip, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. Chapter 24.

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

Hudson AM, Atmar RL, Estes MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol*. 2004;12:279-87.

Hurst CJ, Goyke T. Improved method to recovery of enteric viruses from wastewater sludges. *Wat Res*. 1986;20:1321-24.

Hutton G, Haller L. Evaluation of the costs and benefits of water and sanitation improvements at the global level. WHO/SDE/WSH/04.04. Geneva: World Health Organization. 2004. 87p.

Ibay G. Adenoviruses. <http://www.flupatrol.com/wpcontent/uploads/2007/05/big-adenoviruses-v3.gif> [2007 dez 12]

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Atlas do Saneamento. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. 151p.

Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer. Norovirus. <http://www.ifremer.fr/microbio/labo-microbiologie/photos/norovirus.jpg> [2007 dez 12].

International Committee on Taxonomy of Viruses. Adenoviruses. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/em\\_adeno.gif](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/em_adeno.gif) [2007 dez 12]

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

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

Jiang S, Dezfulian H, Chu W. Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental water. *Can J Microbiol.* 2005;51:393-8.

Jofre J, Blasi M, Bosch A, Lucena F. Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* and other viruses in polluted marine sediments. *Wat Sci Tech.* 1989; 21:15-19.

Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Cultural methods. In : Maier RM, Pepper IL, Gerba CP, editors. *Environmental microbiology.* Academic Press: San Diego, 2000. p. 213-32.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *J Virol.* 1972;10:1075-81.



Kappus KD, Marks JS, Homan RC, Bryant JK, Baker C, Gary GW, Greenberg HB. An outbreak of Norwalk gastroenteritis associated with swimming in a pool and secondary person-to-person transmission. *Am J Epidemiol.* 1982;116:834-9.

Kato T, Tohma H, Miki O, Shibata T, Tamura M. Degradation of norovirus in sewage treatment water by photocatalytic ultraviolet disinfection. *Nippon Steel Technical report n°92.* 2005. p.41-44.

Katz BD, Margolin AB. Use of male specific bacteriophage as an indicator for the presence of hepatitis A virus in alkaline stabilized biosolids intended for land application. *Appl Environ Microbiol.* no prelo.

Kilgore PE, Glass, RI. Gastrointestinal syndromes. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical virology.* New York:Churchill Livingstone;1997. Chapter 4.

Ko G, Cromeans TL, Sobsey MD. UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. *Wat Res.* 2005;39:3643-3649.

Kocwa-Haluch R. Waterborne Enteroviruses as a Hazard for Human Health. *Pol J Environ Stud.* 2001;10:485-87.

Kojaoghlanian T, Flomemberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol.* 2003;13:155-71.

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

Lenete EH, Schmidt NJ. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Washington: American Public Health Association. 1979. p. 29-249.

Limsawat S, Ohgaki S. Fate of liberated viral RNA in wastewater determined by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:2932-33.

Linden KG, Thurston-Enriquez J, Schaerfer R, Malley Jr JP. Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. *Appl Environ Microbiol.* 2007;3:7571-74.

Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jian X, Lindblad L, Stewart P, Lependu J, Baric R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med.*2003;9:548-53.

Lodder WJ, Vinjé J, Heide RVD, Husman AMR, Leenen EJTM, Koopmans MPG. Molecular detection of norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:5624-7.

Lodder WJ, Husman AMR. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the netherlands. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:1453-61.

Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. Human caliciviruses in Europe. *J Clin Virol.* 2002;24:137–60.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Survey and summary: Real-Time PCR in virology. *Nucleic Acids Research.* 2002; 30:1292-305.

Madeley CR, Cosgrove BP. 28 nm particles in faeces in infant gastroenteritis. *Lancet.* 1975;2:451-2.

Marques, E. Levantamento do número e dos tipos de Enterovírus em diferentes águas de esgoto da capital de São Paulo [dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo;1987.

Marshall JA, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Cox BJ, Catton MG, Kelly H, Wright PJ. Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus-associated gastroenteritis. *J Med Virol.* 2003;69:568–78.

Matson JV, Lowry CL, Chan Y, Whitworth ME. Physical and chemical characteristics of sediments, sludges and soil. In: Rao VC, Melnick JL, editors. *Human viruses in sediments, sludges and soils.* Florida: CRC Press, 1987. Chapter 2.

McNulty MS. Rotaviruses. *J Gen Virol.* 1991; 40:1-18.

Mead PS, Slutsker L, Griffin PM, Tauxer RV. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:607–25.

Medeiros MIC, Neme SN, Silva P, Capuano DM, Errera MC, Fernandez SA, Valle GR, Avilla FA. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2001;43:21-4.

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

Mehnert DU, Stewien KE, Hársi CM, Queiroz APS, Candeias JMG. Detection of rotavirus in sewage and creek Water: Efficiency of the Concentration Method. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1997;92:97-100.

Meng QS, Gerba CP. Comparative inactivation of enteric adenoviruses, polioviruses and coliphages by ultraviolet irradiation. *Water Res.* 1996;30:2665-68.

Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – a trip of over 50 years. *Ann Rev Microbiol.* 1995;49:461-87.

Mignote B, Maul A, Schwartzbrod L. Comparative study of techniques used to recover viruses from residual urban sludge. *J Virol Methods.* 1999;78:71-80.

Monpoeho S, Maul A, Mignotte-Cadiergues B, Schwartzbrod L, Billaudel S, Ferré V. Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67: 2482-8.

Monpoeho S, Coste-Burel M, Costa-Mattioli M, Besse B, Chomel JJ, Billaudel S, Ferré V. Application of a real-time polymerase chain reaction with internal positive control for detection and quantification of enterovirus in cerebrospinal fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21:532-6.

Montgomery MA, Elimelech M. Water and sanitation in developing countries: Including health in the equation. *Environmental Science & Technology.* 2007;41:17-24.

Moraes MT, Leite JP, Siqueira MM, Portes AS, Krawcuzuck MM, Nascimento JP. Genomic characterization of adenovirus type 7 isolates in Brazil from acute respiratory disease patients during the period from 1980 to 1991. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1997; 39: 185-9.

Pallansch M, Roos R. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knip DM, Howley, PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. Chapter 25.

Parshioniar SU, Willian-True S, Fout GS, Robbins DE, Seys SA, Cassady JD, Harris R. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a norovirus. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:5263-68.

Pauli, V. Ocorrência e distribuição de genótipos G e P de rotavírus em efluente doméstico e córrego da cidade de São Paulo. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2003. 121p.

Pereira Filho E, Faria NRC, Fialho AM, Assis RS, Almeida MMS, Rocha M, Galvao M, Santos FB, Barreto ML, Leite JP. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J Med Microbiol*. 2007;56:313-19.

Perron-Henry DM, Hermann JE, Blacklow NR. Isolation and propagation of enteric adenoviruses in HEp-2 cells. *J Clin Microbiol*. 1998; 26:1445-47.

Pillai, S. D. Bioaerosols from land-applied biosolids: issues and needs. *Wat Environ Res*. 2007;79:270-8.

Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral Pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:3376-82.

Pinho JRR, Sumita LM, Moreira RC, Souza VAUF, Saraceni CP, Oba IT. Duality of patterns in hepatitis A epidemiology: a study involving two socioeconomically distinct populations in Campinas, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1998; 40: 105-6.

Pinto MT. Higienização dos lodos. In: Andreoli CV, Von Sperling M, Fernandes F, editores. Lodo de esgotos: tratamento e disposição final. Belo Horizonte: UFMG; 2003. p. 261-96.

Pintó RM, Alegre D, Domínguez, A, El-Senousy, WM, Sánchez G, Villena C, Costafreda MI, Aragonès L, Bosch A. Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiology and Infection*. 2007;135:270-3.

Pires MSG, Campos AF, Nascimento PM, Kajihara AE, Campos CA, Castagnato R. Aplicação de lodo líquido digerido no solo: montagem de protótipos. In: Anais do 21 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental; 2001; João Pessoa. Rio de Janeiro: Abes. p. II-101.

Pond, K.; Rueedi, J.; Pedley, S. Microrisk: pathogens in drinking water sources. Robens Centre for Public and Environmental Health. University of Surrey:U.K., 2004.

Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*. 1999;286:287-90.

Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1979;160:213-21.

Prüss, A., Kay, D., Fewtrell, L.; Bartram, J. Estimating the burden of disease from water, sanitation and hygiene at a global level. *Environ Health Perspect*. 2002; 110:537-42.

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.

Pyto Energen. Norwalk-virus. <http://www.pyroenergen.com/articles/images/norwalk-virus.jpg> [2007 dez 12]

Queiroz, APS. Detecção e genotipagem de rotavírus presentes em amostras de águas de esgoto e de córrego da cidade de São Paulo, através da reação de RT-PCR. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas de Universidade de São Paulo. 1999. 166p.

Queiroz APS, Santos FM, Sassaroli A, Hársi CM, Monezi TA, Mehnert DU. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:4614-4618, 2001.

Rao VC, Melnick JL editors. *Environmental virology*. Berkshire: Van Nostrand Reinhold Co. Ltd. 1986:Introduction

Réndon, C. M.; Cisneros, B. E. J.; Pérez, J. A. B. Evaluación microbiológica de un lodo residual de México: perspectivas de reuso. In: Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria Y Ambiental, 28. 2002. Cancún, México. *Aidis. Anais*.

Reynolds KA, Pepper IA. Microorganisms in the environment. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP, editors. *Environmental microbiology*. Academic Press: San Diego, 2000. p. 8-40.

Richards CP, Watson MA, Fankhauser RL, Monroe SS. Genogroup I and II Noroviruses detected in stool samples by Real-Time Reverse transcription-PCR using highly degenerate universal primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70:7179-84.

Rockx B, de Wit M, Vennema H, Vinje J, de Bruin E, van Duynhoven Y, Koopmans M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*. 2002;35:246–53.

Roper WL, Murphy FA, Mahy BW, Anderson LS, Glass RI. Viral agents of gastroenteritis: Public health importance and outbreak management. *MMWR*. 1990;39:1-24.

Rusin P, Enriquez CE, Johnson D, Gerba CP. Environmentally transmitted pathogens, In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP, editors. *Environmental microbiology*. Academic Press: San Diego, 2000. p. 447-85.

Sano D, Fukushi K, Yoshida Y, Omura T. Detection of enteric viruses in municipal sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. *Water Res*. 2003;37:3490-98.

Santos FM, Vieira MJ, Garrafa P, Monezi, TA, Pellizari VH, Hársi CM, Mehnert DU. Discrimination of adenovirus types circulating in urban sewage and surface

polluted waters in São Paulo city, Brazil. *Wat Sci Tech: Water Supply*. 2004;4:79-85.

Santos FM. Detecção e caracterização genotípica de adenovírus humanos presentes em amostras de água de esgoto e córrego da cidade de São Paulo, utilizando PCR-RFLP. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2002. 118p.

Sassaroli A. Sassaroli A. Vírus da Hepatite A: A presença e identificação dos genótipos circulantes nas águas de esgoto e de superfície da cidade de São Paulo, Brasil. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2002. 118p.

Scheuermen PR, Farrah SR, Bitton G. Laboratory studies of virus survival during aerobic and anaerobic digestion of sewage sludge. *Wat Res*. 1991; 25:241-45.

Scheuermen PR, Farrah SR, Bitton G. Development of a method for the recovery of enteroviruses from aerobically digested wastewater sludges. *Wat Res*. 1996;20:15-9.

Schwartzbrod L, Mathieu C. Virus recovery from wastewater treatment plant sludges. *Wat Res*. 1986;20:1011-3.

Schwartzbrod L. Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sludge in agriculture and aquaculture. *Bull Who/EOS/95*.19. Geneva: Who, 1995.

Shenk TE. *Adenoviridae*: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knip DM, Howley, PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. Chapter 67.

Serviço autônomo de água e esgoto. Sistemas de tratamento de esgoto. Aracruz. Junho de 2006. Apostila.

Silva NL. Utilização de lodo de lagoa de estabilização na cultura de sorgo granífero em casa de vegetação. In: *Anais do 21 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*;2001; João Pessoa. Rio de Janeiro: Abes. Anais. p. II-204.

Singh, R. P.; Agrawal, M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*. 2008;28:347-58.

Sistema nacional de informações sobre saneamento - Snis. Diagnóstico dos serviços de água e esgotos 2005. Brasília: Midades 2006. 222p. Disponível em: <http://snis.gov.br>. Acessado em agosto de 2007.

Soares AC, Straub TM, Pepper IL, Gerba CP. Effect of anaerobic digestion on the occurrence of enteroviruses and *Giardia* cysts in sewage sludge. *J Environ Sci Health A*. 1994; 29:1887-97.

Soares CC, Volotao EM, Albuquerque MC, da Silva FM, de Carvalho TR, Nozawa CM, Linhares RE, Santos N. Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. *J Clin Virol*. 2002. 23;171-7.

Sobsey MD, Shields PA, Hauchman FH, Hazard RL, Caton III W. Survival and transport of hepatitis A virus in soils, groundwater and wastewater. *Wat Sci Tech*. 1986;18:97-106.

Stewien KE. Análise virológica da água: estudo comparativo entre dois métodos para concentração de vírus de água de esgoto e determinação da razão entre os números de Enterovírus e de coliformes. [tese (livre-docência)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1979. 95p.

Straub TM, Pepper IL, Gerba CP. Comparison of PCR and cell culture for detection of enteroviruses in sludge-amended field soils and determination of their transport. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:2066-8.

Stumm W, Morgan JJ. The solid-solution interface. In: \_\_\_\_\_. *Aquatic chemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley & Sons: Hoboken. 1996. 516-613.

Tanaka J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine*. 2000;18 Suppl 2:S57-60.

Tartera C, Jofre J. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Appl Environ Microbiol*. 1987;53:1634-37.

Toze S. Microbial pathogens in the wastewater. Literatura review for urban water systems. C SIRO Land and Water. Australia. Technical report n°1/97. June 1997.



Ueki Y, Sano D, Watanabe T, Akiyama K, Omura T. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Wat Res.* 2005;39:4271-80.

Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, Johansson ME. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol* 1984;20:365-72.

Unesco. Facts and Figures, Water and Health. International Year of Freshwater. 2003. Disponível em: [www.wateryear2003.org](http://www.wateryear2003.org). Acessado em: novembro de 2007.

Unicef, Who, Unesco, Unfpa, Undp, Unaid, WFP and the World Bank. Facts for life. New York: Unicef 2002. p. 74-85. Disponível em: [http://www.unicef.org/publications/files/pub\\_ffl\\_en.pdf](http://www.unicef.org/publications/files/pub_ffl_en.pdf). Acessado em: janeiro de 2008.

United Nations. International Year of Sanitation 2008. Disponível em: <http://esa.un.org/iys/index.shtml>. Acessado em: fevereiro de 2008.

Universidade da Água. Estação de tratamento. Disponível em: <http://www.uniagua.org.br/website/default.asp?tp=3&pag=tratamento.htm>. Acessado em: Fevereiro de 2008.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Biosolids generation, use and disposal in the United States. EPA 530-R-99-009. Washington, DC: EPA. 1999.

Valim MCA, Pereira Júnior AB, Souza JL, Nogueira WA, Gonçalves RF. Compostagem de lodo de esgotos com resíduos agrícolas através da aeração forçada positiva. Anais do 19 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental; 1999; Florianópolis. Rio de Janeiro: Abes. p. I-065.

Van den Berg H, Lodder W, van der Poel Wim, Vennema H, Husman ANR. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res in Microbiol.* 2005;156: 532-40.

Van der veen J. The role of adenoviruses in respiratory diseases. *Am Rev Resp Dis.* 1963;88:167-180.

Villar LM, Da Costa MCE, de Paula, VS, Gaspar AMC. Hepatitis A outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:301-5.

Von Sperling M, Andreoli CV. Introdução. In: Andreoli CV, Von Sperling M, Fernandes F, editores. Lodo de esgotos: tratamento e disposição final. Belo Horizonte: UFMG; 2003. p. 13-6.

Von Sperling M, Gonçalves RF. Lodo de esgotos: características e produção. In: Andreoli CV, Von Sperling M, Fernandes F, editores. Lodo de esgotos: tratamento e disposição final. Belo Horizonte: UFMG; 2003. p. 17-67.

Wadell G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. Curr Top Microbiol Immunol. 1984;110:191-220.

Waldman EA, Barata RCB, Moraes JC, Guibu IA, Timenetsky MCST. Gastroenterites e infecções respiratórias agudas em crianças menores de 5 anos, em área da região Sudeste do Brasil. Ver Saúde Públ. 1997;31:62-70.

Ward BK, Irving LG. Virus survival on vegetables spray-irrigated with wastewater. Wat Res.1987;21:57-63.

White DO, Fenner FJ. Viral Syndromes In:\_\_\_ Medical Virology, California: Academic Press; 1994. p. 569.

Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. Clin Microbiol Infect. 2003; 9:247-262.

World Health Organization - WHO. Hepatitis A. Bull WHO/CDC/CSR/ EDC/2000.7. 2000. Geneva:WHO. 38p Disponível em: <http://www.who.int>. Acessado em Maio de 2007.

World Health Organization/UNICEF. Meeting the MDG Drinking Water and Sanitation Target: A Mid-Term Assessment of Progress. 2004. Geneva: WHO.

Woessner WW, Ball PN, DeBorde, D, Troy TL. Viral transport in a sand and gravel aquifer under field pumping conditions. Ground water. 2001;39:886-894.

Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*. 1990;250:1580-3.