

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ALINE DAIANE SCHLINDWEIN

PESQUISA DE VÍRUS ENTÉRICOS HUMANOS EM AMOSTRAS DE
LODO DA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO (SISTEMA
INSULAR) DE FLORIANÓPOLIS, SC: PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
DE TÉCNICAS MOLECULARES E DE CULTURA CELULAR NA
DETECÇÃO E VIABILIDADE VIRAL

FLORIANÓPOLIS

2009

ALINE DAIANE SCHLINDWEIN

**PESQUISA DE VÍRUS ENTÉRICOS HUMANOS EM AMOSTRAS DE
LODO DA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO (SISTEMA
INSULAR) DE FLORIANÓPOLIS, SC: PADRONIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES E DE CULTURA
CELULAR NA DETECÇÃO E VIABILIDADE VIRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Regina Monte Barardi

FLORIANÓPOLIS

2009

Schlindwein, Aline Daiane

Pesquisa de vírus entéricos humanos em amostras de lodo da Estação de Tratamento de Esgoto (Sistema Insular) de Florianópolis, SC: padronização e avaliação de técnicas moleculares e de cultura celular na detecção e viabilidade viral./ Aline Daiane Schlindwein. Florianópolis, 2009. 145 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2009.

1. lodo de esgoto; 2. vírus entéricos; 3. técnicas moleculares; 4. técnicas moleculares associadas à cultura celular.

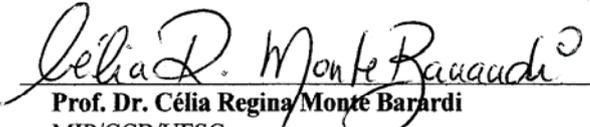
“Pesquisa de vírus entéricos humanos em amostras de Iodo da Estação de Tratamento de Esgoto (sistema Insular) de Florianópolis, SC: padronização e avaliação de técnicas moleculares e de cultura celular na detecção e viabilidade viral”

POR

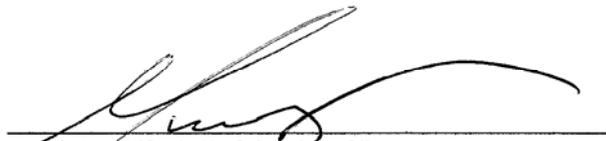
ALINE DAIANE SCHLINDWEIN

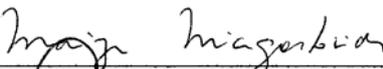
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

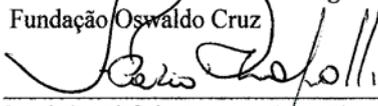
Orientador:

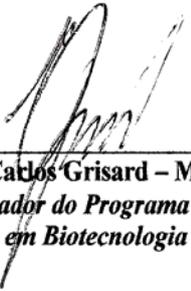

Prof. Dr. Célia Regina Monte Barardi
MIP/CCB/UFSC

Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Márcio Luís Busi da Silva
Tecnoamb Tecnologias Ambientais Ltda


Prof. Dr. Marize Pereira Miagostovich
Fundação Oswaldo Cruz


Prof. Dr. Flávio Rubens Lapolli
ESA/CTC/UFSC


Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard – MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, Fevereiro de 2009.

DEDICATÓRIA

Ao meu Amor, Welton, pelas alegrias, pelo
companheirismo em todos os momentos, pela
paciência, por acreditar em mim e por estar sempre
ao meu lado.

Aos meus pais Romario e Lucia pelo amor eterno em
todos os momentos, apoio incondicional, amizade e
conselhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter iluminado meu caminho, me dar vida e força para continuar superando os obstáculos e continuar buscando pelos meus objetivos. Agradeço por minha vida ser tão maravilhosa e cheia de tantas bênçãos.

Aos meus pais, Romario Schlindwein e Lucia Brixius Schlindwein, sempre confiantes, corujas e grandes incentivadores da minha pesquisa. A satisfação de vocês me mantém viva, o amor de vocês me sustenta; vocês são meu porto seguro. Agradeço a Deus por tê-los como pais todos os dias. Esta dissertação reflete as inúmeras horas de atenção a mim dedicada por todos esses anos. Obrigada pela educação que me deram, pela compreensão, pelas críticas e pelo amor incondicional.

Ao meu amor, esposo e companheiro, Welton Pedro D'Ávila Nunes, pelo incentivo nos momentos mais difíceis, pela compreensão e por participar ativamente de todos os momentos da minha vida, sempre com muito amor.

À Professora Célia Regina Monte Barardi pela oportunidade de realizar este trabalho, pela valiosa orientação, pelo aprendizado e principalmente grande amizade e confiança nestes anos de convívio. Além de excelente profissional, mostrou-se uma mãe ao longo dessa jornada.

À Professora Cláudia Maria Oliveira Simões pelo carinho, pela atenção e amizade em todos os momentos.

À Companhia Catarinense de Águas e Saneamento, principalmente ao Engenheiro químico José Luciano Soares, por gentilmente nos ter cedido o lodo de esgoto da Estação de Tratamento de Esgoto (Sistema Insular) de Florianópolis, SC.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Adriana, Caroline, Christian, Cristiane, Débora, Francielle, Francielly, Izabela, Jadel, Jéssica, Luciane, Marina, Thiago, Vanessa, pelo companheirismo, paciência, ensinamentos, pelos momentos de alegria e amizade.

Ao pessoal dos laboratórios de Imunologia Aplicada e de Protozoologia, pelas amizades e reagentes emprestados.

Aos professores do Programa de Mestrado em Biotecnologia por contribuir com o meu crescimento profissional.

A toda minha família, pelo carinho e compreensão em todos os momentos da minha vida.

À CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que passaram pela minha vida e que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

À vida, por ser tão maravilhosa, cheia de tantas alegrias, tantos momentos especiais, tantas oportunidades, tantas amizades, tantas risadas, tantas noites de trabalhos, tantos finais de semana, tantos acertos e erros, tantos exemplos, tantas flores, tantos sonhos e tantas realidades.

Aline Daiane Schlindwein

Este trabalho foi realizado no LVA, coordenado pelas Professoras Dr^a. Célia Regina Monte Barardi (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas-CCB) e Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões (Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Farmacêuticas-CCS), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Recebeu apoio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, através da concessão de uma bolsa de mestrado pela CAPES / MEC.

RESUMO

A alta incidência de patógenos virais no lodo de esgoto é devido a sua adsorção preferencial aos sólidos do lodo. Dependendo do método de tratamento utilizado para a esterilização do esgoto doméstico, entre 50% e 99,9% dos vírus podem ser inativados. O lodo tratado pode ser útil para fins agrícolas porque pode melhorar as propriedades físicas do solo e aumentar o teor de matéria orgânica. Entretanto, as desvantagens de sua utilização são a possível transferência de microorganismos patogênicos para o solo. O potencial de partículas virais infecciosas remanescentes após o tratamento do lodo não pode ser descartado. Assim, métodos confiáveis são necessários para determinar o nível de contaminação viral em resíduos de lodo espalhados no solo para finalidades agrícolas. O objetivo deste estudo foi padronizar e avaliar uma metodologia simplificada para a detecção de vírus entéricos humanos em lodo de esgoto. Para a etapa de padronização, o lodo coletado foi esterilizado em autoclave e semeado com diluições seriadas de base 10 de Adenovírus (AdV5) ou Rotavírus (RV). As amostras foram posteriormente processadas por um método de adsorção-eluição-precipitação utilizando floculação orgânica e precipitação com polietileno glicol. Durante a etapa de eluição-precipitação, AdV5 foi utilizado como modelo e diferentes parâmetros foram avaliados, incluindo a quantidade de eluente viral e o período de incubação utilizado para a concentração viral. Dois diferentes métodos para a extração dos ácidos nucleicos foram utilizados: isotiocianato de guanidina-sílica e fenol-clorofórmio. O método padronizado (utilizando fenol-clorofórmio como método de extração dos ácidos nucleicos) foi o mais sensível e foi capaz de detectar até $6,3 \times 10^{-1}$ (amostra semeada antes da eluição viral) e $1,26 \times 10^{-1}$ (amostra semeada após o processo de clarificação) PFU de AdV5 e $2,4 \times 10^{-1}$ (amostra semeada antes da eluição) e $2,16 \times 10^1$ (amostra semeada após a clarificação) FFU de RV. Este método foi posteriormente aplicado à detecção de AdV, vírus da Hepatite A (HAV), poliovírus (PV) e RV em amostras de lodo de esgoto coletadas durante 12 meses numa Estação de tratamento de esgoto de Florianópolis (ETE/CASAN/Florianópolis, Brasil). PCR, nested PCR, RT PCR, RT nested PCR e quantificação por PCR/RT-PCR em tempo real foram usados para a detecção e quantificação do genoma viral. PCR integrado a cultura celular (ICC-PCR) e a Imunofluorescência indireta (IFI) foram utilizados para os ensaios de viabilidade e quantificação viral. Das 12 amostras de campo analisadas tanto para a presença do genoma viral (PCR/nested PCR ou RT-PCR/RT nested PCR) e viabilidade viral, foram obtidos os seguintes resultados: AdV: 100% das amostras positivas para genoma e viáveis (todas cepas não entéricas como determinado pela análise PCR-RFLP); HAV: 25% positivas para genoma e 16,7% viáveis; PV: 66,7% positivas para genoma e 91,7% viáveis; RV: 33,3% positivas para genoma e 25% viáveis. A quantificação por PCR/RT-PCR em tempo real foi utilizada para quantificar cópias de genoma de AdV e HAV em amostras de campo positivas. AdV e HAV variaram de $4,6 \times 10^4$ a $1,2 \times 10^6$ e de $3,1 \times 10^2$ a $5,4 \times 10^2$ cópias de genoma/ml, respectivamente, em amostras de lodo de esgoto. IFI foi utilizada para quantificar as partículas de AdV nas amostras de campo e os resultados variaram de 70 a 300 FFU/ml. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a contaminação viral é um problema mesmo em amostras de esgoto tratadas e que o tratamento usual aplicado para o tratamento do lodo de esgoto não é capaz de eliminar a contaminação viral.

Palavras chaves: lodo de esgoto, vírus entéricos, técnicas moleculares, técnicas moleculares associadas à cultura celular.

ABSTRACT

The high incidence of pathogenic viruses in sewage sludge is due to their preferential adsorption to sludge solids. Depending on the treatment method used for sterilization of domestic sewage, between 50% to 99.9% of the viruses can be inactivated. Treated sludge can be useful for agricultural purposes because it can improve soil physical properties and increase soil organic matter content. Therefore, the disadvantages of its use are the possible transfer of pathogenic microorganisms to the soil. The potential of remaining infectious virus particles after sludge treatment cannot be discarded. Thus, reliable methods are needed to determine the level of viral contamination in waste sludge spread on agricultural land. The aim of this study was to standardize and evaluate a simplified methodology for detection of human enteric viruses in sewage sludge. For the standardization step, sludge collected were sterilized by autoclaving, and seeded with serial 10-fold dilutions of Adenovirus (AdV5) or Rotavirus (RV). Samples were subsequently processed by an adsorption-elution-precipitation method using organic flocculation and polyethylene glycol precipitation. During the elution-precipitation step, AdV5 was used as model and different parameters were evaluated, including amount of virus eluant and period of incubation used for viral concentration. Two different methods for viral nucleic acids extraction were performed: silica/guanidine isothiocyanate and phenol-chloroform. The standardized method (using phenol-chloroform as nucleic acid extraction method) was the most sensitive and was able to detect up to 6.3×10^{-1} (seeded sample before virus elution) and 1.26×10^{-1} (seeded sample after final clarification) PFU of AdV5 and 2.4×10^1 (seeded sample before elution) and 2.16×10^1 (seeded sample after clarification) FFU of RV. This method was subsequently applied to the detection of AdV, hepatitis A virus (HAV), polioviruses (PV) and RV in sewage sludge samples collected during twelve months at the local sewage plant treatment (ETE/CASAN/Florianópolis city, Brazil). PCR, nested PCR, RT PCR, RT nested PCR and QPCR/QRT-PCR were used for viral genome detection and quantification. Integrated cell culture-PCR (ICC-PCR) and indirect immunofluorescence (IFI) were used for viral viability assays and quantification. From 12 field samples analysed both for viral genome presence (PCR/nested PCR or RT-PCR/RT nested PCR) and viral viability (ICC/PCR), the following results were obtained: AdV: 100% samples genome positive and viable (all non-enteric strains as determined by PCR-RFLP analysis); HAV: 25% genome positive and 16.7% viable; PV: 66.7% genome positive and 91.7% viable; RV: 33.3% genome positive and 25% viable. The QPCR/QRT-PCR was used to quantify genome copies of AdV and HAV in the genome positive field samples. AdV and HAV ranged from 4.6×10^4 to 1.2×10^6 and from 3.1×10^2 to 5.4×10^2 genome copies/ml respectively in the sewage sludge samples. IFI was used to quantify AdV particles in the field samples and the results ranged from 70 to 300 FFU/ml. The results obtained in the present work, had shown that virus contamination is a problem even in treated sewage samples and that the regular treatment applied for sewage treatment is not able to eliminate viral contamination.

Key words: sewage sludge, enteric viruses, molecular techniques, cell culture associated molecular techniques.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da morfologia e estrutura do adenovírus.....	31
Figura 2. Representação esquemática da partícula viral do rotavírus.....	41
Figura 3. Diagrama esquemático descrevendo a estratégia de detecção de vírus entéricos em amostras de lodo de esgoto.....	56
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o limite de sensibilidade da PCR ou RT-PCR para AdV5 e RV artificialmente semeados em amostras de lodo de esgoto autoclavadas.....	80
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o limite de sensibilidade da RT-nested PCR ou RT-PCR para HAV e PV2 artificialmente semeados em amostras de lodo de esgoto autoclavadas.....	81
Figura 6. Citotoxicidade das amostras de lodo de esgoto previamente autoclavadas em células permissivas a infecção pelos vírus de interesse.....	83
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1% mostrando a detecção de vírus entéricos em amostras de campo de lodo de esgoto por nested PCR/RT-PCR/RT-nested PCR.....	85
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 1% mostrando a detecção de vírus entéricos em amostras de campo de lodo de esgoto por ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR.....	87
Figura 9. Porcentagem de positividade das amostras para os vírus analisados de acordo com o mês e com a metodologia de detecção adotada.....	89
Figura 10. Resultado da quantificação de AdV viáveis presentes em amostras de campo através da IFI.....	90
Figura 11. Células A549 infectadas com amostras de campo positivas para AdV e detectadas pelo anticorpo monoclonal MAB 8052.....	91
Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% mostrando a caracterização dos AdV através do método PCR-RFLP.....	92
Figura 13. Quantificação dos AdV presentes em amostras de campo por PCR em tempo real.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diluições das suspensões virais padrão (RV, HAV e PV2) em amostras de lodo de esgoto autoclavado após a etapa de clarificação e suas respectivas concentrações.....	66
Tabela 2. Diluições da suspensão viral padrão (AdV5) em amostras de lodo de esgoto após a etapa de clarificação e suas respectivas concentrações.....	67
Tabela 3. Diluições das amostras de lodo de esgoto previamente inoculadas com RV, HAV e PV2 antes do processo de eluição viral e suas respectivas concentrações.....	68
Tabela 4. Diluições das amostras de lodo de esgoto previamente inoculadas com AdV5 antes do processo de eluição viral e suas respectivas concentrações.....	69
Tabela 5. Titulação viral pelos métodos de contagem de placas de lise e IFI	76
Tabela 6. Resultados dos ensaios de padronização do processo de eluição (utilizando 15 ml de extrato de carne e 5,0 ml de lodo) e concentração viral do lodo semeado experimentalmente com AdV5.....	77
Tabela 7. Resultados dos ensaios de padronização do processo de eluição (utilizando 35 ml de extrato de carne e 5,0 ml de lodo) e concentração viral do lodo semeado experimentalmente com AdV5.....	77
Tabela 8. Limites de detecção das partículas virais de AdV5, HAV, PV2 e RV nas amostras de lodo de esgoto com dois diferentes métodos de extração de ácidos nucleicos: método orgânico e método isotiocianato de guanidina-sílica.....	82
Tabela 9. Porcentagem de positividade para cada um dos vírus analisados em amostras de lodo de esgoto (amostras de campo) de acordo com a metodologia de detecção empregada.	88
Tabela 10. Número de cópias de genoma/ml de AdV e HAV presentes em amostras de campo.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdV2	Adenovírus tipo 2
AdV5	Adenovírus tipo 5
AdV	Adenovírus
A549	Células de carcinoma de orofaringe humana
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
CASAN	Companhia Catarinense de Águas e Saneamento
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CCS	Centro de Ciências Farmacêuticas
cDNA	DNA complementar
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Ct	Valor do ponto inicial do ciclo
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECP	Efeito citopático
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Agência norte-americana de Proteção Ambiental
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
ETE's	Estações de Tratamento de Esgoto
EUA	Estados Unidos da América
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FFU	Unidades formadoras de focos
FRHK-4	Células embrionárias de rim de macaco <i>Rhesus</i>
GuSCN	Isotiocianato de guanidina
h	hora(s)
HAV	Vírus da Hepatite A
HEV	Vírus da Hepatite E
HEP-2	Células de carcinoma de orofaringe humana
ICC-PCR	PCR integrado a cultura celular
IFI	Imunofluorescência indireta
LVA	Laboratório de Virologia Aplicada

m ³	metro(s) cúbico(s)
MA104	Células epiteliais de rim de macaco verde africano
MEM	Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's
min	minutos
NSP	Proteína não-estrutural (do inglês <i>Non-Structural Protein</i>)
ORF	quadro aberto de leitura (do inglês <i>Open reading frame</i>)
OPV	Vacina oral de poliovírus vivo atenuado
p	peso
pb	pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PEG	Polietileno glicol
PFU	Unidades formadoras de placa
PV	Poliovírus
PV2	Poliovírus sorotipo 2 vacinal
RFLP	do inglês <i>restriction fragment length polymorphism</i>
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	Reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa
RV	Rotavírus
s	segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SP	São Paulo
t	toneladas
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
USP	Universidade de São Paulo
UV	Radiação ultravioleta
v	volume
Vacina Sabin	Vacina atenuada para PV
VAPP	poliomielite paralítica associada à vacina
VDPVs	Poliovírus derivados de vacina

VERO	Fibroblastos de rins do macaco verde da África (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
VP	proteína viral (do inglês <i>Viral protein</i>)
VPG	Proteína codificadora viral
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 SANEAMENTO BÁSICO E SAÚDE	19
2.2 ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO	21
2.3 PROCESSO DE TRATAMENTO DE ESGOTO DENOMINADO LODOS ATIVADOS MODALIDADE AERAÇÃO PROLONGADA	21
2.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O LODO DE ESGOTO	23
2.4.1 Definição	23
2.4.2 Tipos de lodo	23
2.4.3 Composição do lodo	24
2.4.4 Disposição final e utilidades	24
2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O LODO COMO DISSEMINADOR DE PATÓGENOS	27
2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS VÍRUS ENTÉRICOS	28
2.6.1 Adenovírus	30
2.6.2 Vírus da Hepatite A	33
2.6.3 Enterovírus	36
2.6.4 Rotavírus	39
2.7 METODOLOGIAS DISPONÍVEIS PARA DETECÇÃO DE VÍRUS EM LODO DE ESGOTO	42
3 OBJETIVOS	48
3.1 GERAL	48
3.2 ESPECÍFICOS	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 MATERIAIS BIOLÓGICOS	50
4.1.1 Células	50
4.1.2 Vírus	50
4.1.3 Amostras de lodo de esgoto	51
4.2 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS	51
4.3 PREPARO DAS SUSPENSÕES VIRAIS PADRÃO	52
4.4 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO VIRAL	52
4.4.1 Método de contagem de placas de lise para titulação de AdV5 e PV2	53
4.4.2 Método de IFI para titulação de AdV2, HAV e RV	54
4.5 SEMEADURA DAS AMOSTRAS DE LODO COM VÍRUS	55
4.6 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO PELO MÉTODO DE ELUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL	56

4.6.1	<i>Ensaios para padronização do processo de eluição e concentração viral</i>	57
4.7	CLARIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO CONCENTRADAS	58
4.8	EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS A PARTIR DA SUSPENSÃO VIRAL E DAS AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO CONCENTRADAS	58
4.8.1	<i>Extração dos ácidos nucleicos pelo método Fenol-clorofórmio-isoamílico</i>	59
4.8.2	<i>Extração dos ácidos nucleicos utilizando o reagente Trizol®</i>	60
4.8.3	<i>Extração dos ácidos nucleicos pelo método do Isotiocianato de guanidina-sílica</i>	60
4.9	DETERMINAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE ADV ATRAVÉS DA PCR OU PELO NESTED PCR	61
4.10	DETERMINAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO HAV, PV E RV ATRAVÉS DA RT-PCR OU PELA RT-NESTED PCR ..	62
4.11	VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	64
4.12	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE DETECÇÃO VIRAL PELA REAÇÃO DE PCR/NESTED PCR OU RT-PCR/RT-NESTED PCR	64
4.12.1	<i>Amostras de lodo de esgoto experimentalmente inoculadas após a etapa de clarificação (controles positivos)</i>	65
4.12.2	<i>Amostras de lodo de esgoto experimentalmente inoculadas antes do processo de eluição viral</i>	67
4.13	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO PREVIAMENTE AUTOCLAVADAS ..	69
4.14	VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE DAS PARTÍCULAS VIRAIS RECUPERADAS ATRAVÉS DO ENSAIO DE ICC-PCR/ICC-NESTED PCR OU ICC-RT-PCR/ICC-RT-NESTED PCR EM AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO	71
4.15	ENSAIO DE IFI PARA QUANTIFICAÇÃO DE ADV	71
4.16	CARACTERIZAÇÃO DOS ADV UTILIZANDO MÉTODO PCR-RFLP	72
4.17	PCR EM TEMPO REAL PARA QUANTIFICAÇÃO DE ADV VIÁVEIS	72
4.18	RT-PCR EM TEMPO REAL PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HAV VIÁVEIS	73
4.19	DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS PRESENTES EM AMOSTRA DE LODO DE ESGOTO (ESTUDO DE CAMPO).....	74
4.20	CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO VIRAL	75
4.21	ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
5	RESULTADOS	76
5.1	TITULAÇÃO VIRAL	76
5.2	PADRONIZAÇÃO DO PROCESSO DE ELUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL	76
5.3	PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE CLARIFICAÇÃO	78
5.4	LIMITE DE SENSIBILIDADE DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS POR PCR/NESTED PCR OU RT-PCR/RT-NESTED PCR	78
5.5	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO UTILIZANDO OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO SELECIONADOS NA DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS EM AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO ARTIFICIALMENTE SEMEADAS	81
5.6	CITOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO	82
5.7	DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO (AMOSTRAS DE CAMPO) ..	84
5.7.1	<i>PCR/nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR</i>	84
5.7.2	<i>ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR</i>	86
5.7.3	<i>Comparação da detecção de vírus entéricos presentes em amostras de lodo de esgoto (amostras de campo) por nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR e ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR</i>	88

5.7.4 IFI para quantificação de AdV.....	90
5.7.5 Caracterização dos AdV utilizando o método PCR-RFLP.....	91
5.7.6 (RT)-PCR em tempo real para quantificação de AdV e HAV.....	92
6 DISCUSSÃO	94
7 CONCLUSÕES.....	106
8 PERSPECTIVAS.....	108
9 REFERÊNCIAS	109
ANEXO A-AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE AMOSTRAS NA CASAN, ETE INSULAR.....	143

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a produção de lodo de esgoto tem aumentado consideravelmente devido à construção de novas estações de tratamento de esgotos e ao aumento do número de conexões na rede, levando as autoridades a se preocuparem com as alternativas possíveis de disposição (VAN VOORNEBURG; VAN VEEN, 1993). O Brasil, que é um país em desenvolvimento e que está fomentando a proteção dos recursos hídricos através do tratamento dos esgotos, vem se deparando com o problema da disposição do lodo gerado por estes tratamentos (DAMASCENO; CAMPOS, 1998).

Uma das alternativas para a destinação adequada do lodo seria o seu uso na agricultura como fertilizante, pois os lodos, em geral, são ricos em matéria orgânica, nitrogênio, fósforo e micronutrientes. A fração orgânica do lodo confere melhor estruturação aos agregados do solo, tornando-o mais resistente à erosão. Do ponto de vista microbiológico, o lodo pode reequilibrar os microorganismos do solo e tornar as plantas mais resistentes aos fitopatógenos, o que pode reduzir o consumo de pesticidas (SILVA et al., 2004). Ao mesmo tempo, resolveria de forma ambientalmente adequada e economicamente viável, o problema da disposição final deste resíduo (CHAGAS, 2000).

No entanto, tal aplicação pode ser limitada por fatores tais como a presença de organismos patogênicos, compostos orgânicos tóxicos, contaminação das águas superficiais por nitrato e transmissão de metais pesados à cadeia alimentar. Desses fatores, a transferência de metais e organismos patogênicos do solo para as culturas e, daí para os animais e seres humanos, parece ser o maior efeito prejudicial à saúde (DAMASCENO; CAMPOS, 1998).

Dentre os organismos patogênicos, os vírus entéricos humanos se destacam, pois são capazes de persistir no ambiente por períodos de tempo prolongados (TRABELSI et al., 1995; NICAND; TEYSSOU; BUISSON, 1998; LECLERC; SCHWARTZBROD; DEI-CAS, 2002; TREE; ADAMS; LEES, 2003; SKRABER et al., 2004). Dentre estes se destacam os adenovírus (AdV), calicivírus, enterovírus e hepatovírus, sendo que são usualmente transmitidos através da via fecal-oral e replicam-se no trato gastrointestinal do hospedeiro (FONG; LIPP, 2005). A dose infectante desses agentes é extremamente baixa variando de uma a dez unidades infecciosas (PUIG et al., 1994; LECLERC; SCHWARTZBROD; DEI-CAS, 2002; ASHBOLT, 2004).

Portanto o uso seguro do lodo na agricultura supõe a utilização de uma tecnologia que elimine ou diminua significativamente a presença destes microorganismos, aliada ao controle

de qualidade do lodo higienizado e a adequação do tipo de uso agrícola às características microbiológicas do lodo (SANEPAR, 1997).

A presença de partículas virais no lodo e a possibilidade da manutenção de sua viabilidade torna extremamente importante a realização de estudos que visem a detecção, quantificação e distribuição temporal das mesmas (ABBASZADEGAN; STEWART; LECHEVALLIER, 1999). No Brasil, existem poucos estudos sobre a presença de vírus entéricos humanos em águas de consumo e esgotos. Por essa razão, o presente estudo teve como principal objetivo padronizar uma metodologia capaz de detectar vírus entéricos no lodo da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)-Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN), Sistema Insular, como forma de contribuir para o monitoramento da presença de microorganismos patogênicos. Além disso, foi realizada uma análise de campo por 12 meses (junho de 2007 a maio de 2008) visando avaliar a qualidade virológica do esgoto tratado da ETE-CASAN, Sistema Insular.

Salienta-se que a detecção de vírus no meio ambiente é diretamente dependente das metodologias disponíveis para sua eluição, concentração e detecção. Uma metodologia rápida e eficaz, com capacidade de retirar as partículas virais adsorvidas aos flocos do lodo, se faz necessária. Uma vez liberados destes flocos, é possível submetê-los às técnicas clássicas e moleculares visando a detecção, quantificação e verificação da infectividade das partículas virais eluídas. Esta técnica constitui uma ferramenta essencial em futuras avaliações sobre o risco em se utilizar esse material como coadjuvante na agricultura, tanto aos manipuladores quanto à população.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Saneamento básico e saúde

A situação brasileira com relação à cobertura dos serviços de saneamento básico ainda é bastante deficiente e está distante de atingir um índice satisfatório. Dados disponíveis no censo de 2000 realizado no Brasil revelam que ocorreu o crescimento no serviço de abastecimento de água em todas as regiões do país, porém de forma desigual. O esgotamento sanitário ainda é o serviço que apresenta menor taxa de crescimento, passando de 47,3% de municípios brasileiros atendidos por rede de esgoto em 1989 para 52,2% em 2000 (IBGE, 2002). Desse percentual de municípios brasileiros atendidos por rede de esgoto, 32% têm somente serviço de coleta e os restantes 20,2% coletam e tratam seus esgotos. No país são produzidos e coletados diariamente aproximadamente 14,57 milhões de metros cúbicos (m³) de esgoto, sendo que apenas 5,13 milhões de m³ são tratados, os restantes 9,44 milhões de m³ são lançados diariamente no meio ambiente. Assim, apenas 35,2% do esgoto gerado pelo país passa por estações de tratamento antes de ser liberado no meio ambiente (ANDREOLI; BONNET, 1998; ANDREOLI; FERNANDES, 1999; LARA, 1999; IBGE, 2002).

Em resposta a esta triste realidade, na Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento, realizada em junho de 1992 no Rio de Janeiro, conservar e proteger a saúde ambiental tornou-se o centro das preocupações de um novo modelo de desenvolvimento planejado (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1994).

Em paralelo, na Agenda 21 – principal instrumento aprovado pela Conferência Mundial do Meio Ambiente/Rio 92 – ficou reconhecida a importância de promover o “manejo ambiental saudável dos resíduos sólidos e questões relacionadas com o esgoto”. Os problemas estabelecidos incluem a minimização de resíduos, a maximização do reuso e da reciclagem, a disposição e o tratamento ambiental adequados para resíduos e a ampliação da cobertura dos serviços que se ocupam do tratamento adequado dos resíduos (LARA, 1999).

Para alcançar estes objetivos, conta-se com o contínuo avanço da biotecnologia, que vem contribuindo para a melhoria da qualidade de vida de várias formas e, dentre elas, pode-se destacar o aumento da produção e da segurança do consumo de alimentos; o uso de práticas de agricultura biológica e de maiores conhecimentos ecogenéticos; a obtenção de novas matérias-primas; o uso de métodos sustentáveis de manejo florestal; o aperfeiçoamento de

técnicas de tratamento de água para o abastecimento público e, principalmente, o tratamento adequado dos dejetos perigosos (humanos, industriais ou agropecuários) (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1994).

De maneira geral, a produção de esgotos está intimamente ligada ao consumo de água, e aproximadamente 60% a 80% do consumo de água é convertido em esgoto (SANTOS; KRESPKY, 1998).

Esgoto é o termo usado para caracterizar os dejetos provenientes dos diversos usos das águas, como por exemplo, uso doméstico (efluentes de vasos sanitários, cozinhas, chuveiros, etc.), industrial (oriundos dos processos específicos de cada segmento da produção industrial), comercial (restaurantes, hotéis, aeroportos, etc.), de estabelecimentos públicos (serviços de saúde, escolas, e repartições públicas), infiltração de água na rede de esgotos, agrícola, etc. (UEHARA; VIDAL, 1989; SANTOS; KRESPKY, 1998).

Como resultado do uso de água pelo homem, em função de seus hábitos de higiene e de suas necessidades fisiológicas, é formado o esgoto doméstico que, por sua vez, é composto pelas águas de banho, urina, fezes, restos de comida, detergentes e águas de lavagens. De modo geral, pode-se dizer que, sem contar com a significativa contribuição de despejos industriais, os esgotos sanitários são constituídos de aproximadamente 99,9% de água e 0,1% de sólidos (peso seco). Deve-se lembrar que os esgotos sanitários contêm ainda inúmeros microorganismos vivos, tais como: vírus, bactérias, helmintos e protozoários que, na sua maioria, são liberados com os dejetos humanos (UEHARA; VIDAL, 1989; SANTOS; KRESPKY, 1998). Alguns desses organismos desempenham um papel importante no tratamento das águas residuárias; outros, porém, são denominados de organismos patogênicos, veiculadores de doenças (UEHARA; VIDAL, 1989).

Os impactos à saúde atribuídos à falta de saneamento são significativos e são causados pela exposição à 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 ao 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; ELIMELECH, 2007).

Quase 60% dos casos de mortalidade infantil está relacionado a doenças infecciosas, a maioria relacionada à água, saneamento e higiene (UNESCO, 2003).

Portanto, há necessidade de se tratar os esgotos sanitários antes que esses sejam lançados em qualquer corpo hídrico. O tratamento e disposição de lodo devem ser geridos para minimizar problemas ambientais como odor e lançamento no ambiente de contaminantes e patógenos (HALLEY; MILLER, 1991). Entre as principais opções de disposição de lodo no ambiente encontram-se: 1) disposição no solo (uso agrícola, florestas, áreas de recuperação); 2) disposição em aterro; 3) disposição no mar; 4) incineração (MATTHEWS, 1992).

2.2 Estações de tratamento de esgoto

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE's) são as únicas responsáveis pelo tratamento do esgoto sanitário e podem adotar diversos processos de tratamento do esgoto sanitário e de tratamento das águas residuárias. No Estado de Santa Catarina, as ETE's da CASAN utilizam, entre outros processos, filtro biológico, lagoas de estabilização e lodos ativados (CASAN, 2005).

O processo denominado de lodos ativados foi o processo escolhido pela CASAN para o tratamento do esgoto sanitário da área central de Florianópolis, denominado Sistema Insular sendo este o objeto do presente estudo.

2.3 Processo de tratamento de esgoto denominado lodos ativados modalidade aeração prolongada

Consiste em um processo biológico onde o esgoto afluente, na presença de oxigênio dissolvido, agitação mecânica e pelo crescimento e atuação de microorganismos específicos, forma flocos denominados lodo ativado ou lodo biológico. Essa fase do tratamento objetiva a remoção de matéria orgânica biodegradável presente nos esgotos. Após essa etapa, a fase sólida é separada da fase líquida em outra unidade operacional denominada decantador. O lodo ativado separado retorna para o processo sendo o excesso retirado para tratamento específico ou destino final (CASAN, 2005).

Esse sistema é muito utilizado, mundialmente, para o tratamento de despejos domésticos e industriais (SPERLING, 1997), sendo indicado para locais onde se dispõe de pouca área para a implantação de sistemas de tratamento.

A adoção deste processo apresenta boa eficiência no tratamento e flexibilidade de operação; por outro lado, o alto custo operacional, a exigência de um controle laboratorial diário, o alto consumo de energia e a possibilidade de surgirem problemas ambientais com ruídos e formação de aerossóis (que podem carrear microorganismos patogênicos ou não) são algumas das desvantagens deste sistema (CASAN, 2005). O sistema de tratamento, lodo ativado do tipo aeração prolongada, tem duas fases distintas: a fase de pré-tratamento (composta do gradeamento e da desarenação) e a fase denominada de tratamento secundário, que é composta das unidades denominadas de seletor biológico, tanques de aeração, decantador secundário, adensadores de lodo, sistema de desidratação, prensa desaguadora e pode ainda contar com a unidade de desnitrificação (SPERLING, 1997; CASAN, 2005).

As etapas biológicas deste sistema de tratamento de esgoto ocorrem nas unidades: seletor biológico, câmara de desnitrificação e tanque de aeração (reator). O seletor biológico tem como função, através de um misturador submersível, misturar suavemente o esgoto bruto afluente com lodo ativado proveniente do processo de tratamento de aeração prolongada, evitando assim o desenvolvimento de microorganismos indesejáveis ao tratamento e melhorando a sedimentabilidade do lodo. Do seletor biológico a mistura passa pela câmara de desnitrificação que, através de misturadores submersíveis, tem a função de reduzir o nitrato sob a ação de microorganismos específicos. É no reator que ocorrem as reações bioquímicas para a remoção da matéria orgânica carbonácea e a nitrificação do nitrogênio orgânico total remanescente do afluente bruto (CASAN, 2005). As bactérias (biomassa ativa) utilizam o substrato presente no esgoto bruto para se desenvolverem e o fornecimento de oxigênio é feito por aeradores mecânicos. As bactérias envolvidas neste processo formam uma matriz gelatinosa, o que lhes confere a propriedade de flocular, ou seja, aglutinam-se entre si e também com outros microorganismos. O floco formado possui dimensões maiores, facilitando o processo de remoção de patógenos (SPERLING, 1997).

Já no decantador secundário se processa a sedimentação dos sólidos (biomassa). Parte da biomassa sedimentada no fundo do decantador retorna ao reator (recirculação), com a finalidade de aumentar a concentração de bactérias garantindo, assim, a elevada eficiência deste tipo de processo de tratamento de esgoto. A outra parte (excesso de lodo) é retirada do sistema e encaminhada para o adensador. A função deste é reduzir a quantidade de água contida no lodo sedimentado nos decantadores. Posteriormente, o lodo passa por um sistema de desidratação. Na ETE– Sistema Insular, esse sistema é composto de tanque de armazenamento de lodo adensado de formato circular com removedor mecânico, sistema de

recalque para transferência de lodo adensado, sistema de pré-condicionamento químico de lodo adensado, com suspensão de cal e de solução de polieletrólito. Por fim, chega à prensa desaguadora que opera com duas unidades e a “torta” produzida tem teor de sólidos na faixa de 18 à 20%. Esta “torta” de lodo é encaminhada até o local de estocagem através de correia transportadora para posterior disposição em aterro sanitário (CASAN, 2005).

No processo denominado lodo ativado, a redução de vírus entéricos ocorre principalmente por adsorção viral aos sólidos ou por inativação viral. A distribuição de partículas virais entre as fases líquida e sólida da mistura depende da distância destas em relação aos sólidos suspensos e da capacidade adsortiva (ARRAJ et al., 2005).

2.4 Considerações gerais sobre o lodo de esgoto

2.4.1 Definição

Lodo é todo o resíduo que concentra substâncias orgânicas (40 a 80%) e inorgânicas, bem como microorganismos existentes nos efluentes, originado do tratamento resultante das atividades diárias do homem, quer seja em suas residências, na indústria ou, ainda, em atividades agrícolas (MEDEIROS et al., 1999; GONÇALVES, 1999a). Sendo assim, lodo é o termo que se aplica para os sólidos gerados durante o processo de tratamento de esgotos antes do tratamento adequado para a disposição final. O termo biossólidos é aplicado aos produtos orgânicos gerados no processo de tratamento de esgoto, que podem ser reutilizados de modo benéfico, após o tratamento adequado por higienização (MIKI; ANDRIGUETI; SOBRINHO, 2001). Assim, quando devidamente higienizado, estabilizado e seco, o lodo de esgoto recebe o nome de biossólido (MEDEIROS et al., 1999; MELO; MARQUES; MELO, 2001; MIKI; ANDRIGUETI; SOBRINHO, 2001).

2.4.2 Tipos de lodo

Existem basicamente três tipos de lodo orgânico: bruto, ativado e digerido. O lodo

bruto é aquele produzido por decantadores primários das ETE's, por sedimentação ou flotação, e possui uma coloração acinzentada, sendo pegajoso, de odor ofensivo e facilmente fermentável (FERREIRA; ANDREOLI; JÜRGENSEN, 1999; MEDEIROS et al., 1999). O lodo que é produzido por ETE's que utilizam o processo biológico de tratamento, denominado de lodo ativado, tem aparência floculenta, cor marrom e o odor é pouco ofensivo quando fresco (MEDEIROS et al., 1999). O lodo de coloração marrom-escuro, obtido por biodigestores anaeróbios ou aeróbios, através de um processo de estabilização biológica, é chamado de lodo digerido. Quando bem digeridos, tanto o lodo anaeróbio quanto o aeróbio, não possuem odor (FERREIRA; ANDREOLI; JÜRGENSEN, 1999; MEDEIROS et al., 1999).

2.4.3 Composição do lodo

As características de um lodo de esgoto dependem do tipo de esgoto e do processo e grau de tratamento do mesmo (TSUTIYA, 2001a).

No lodo encontram-se nutrientes, matéria orgânica (40% a 80%), nitrogênio (2% a 6%), fósforo (1% a 3,7%), potássio (< 1%), cálcio, magnésio, ferro, metais pesados (cobre, zinco, mercúrio, cádmio, cromo, níquel e chumbo), microorganismos patogênicos (coliformes fecais, bactérias, vírus, fungos e parasitas) (GONÇALVES, 1999b) e água (TSUTIYA, 2001a).

Os microorganismos ficam absorvidos às partículas sólidas e tendem a precipitar na fase de decantação, durante o processo de tratamento de esgoto, concentrando-se no lodo de esgoto (TSUTIYA, 2001a). A densidade dos patógenos que podem estar presentes no lodo de esgoto, de uma determinada localidade, é bastante variável e depende das condições sócio-econômicas da população, das condições sanitárias, da região geográfica, da presença de animais, da presença de indústrias agro-alimentares, da natureza do efluente, e por fim, do tipo de tratamento ao qual o lodo foi submetido (MEDEIROS et al., 1999).

2.4.4 Disposição final e utilidades

O objetivo dos sistemas de tratamento de esgoto é concentrar as impurezas e o

material potencialmente poluído dos esgotos em um subproduto (ILHENFELD; PEGORINI; ANDREOLI, 1999). Em qualquer tipo de tratamento utilizado para o esgoto sanitário, haverá a geração do referido subproduto, denominado de lodo de esgoto.

O aumento no número de estações de tratamento de efluentes domésticos leva 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 toneladas (t) /dia de lodo líquido, ou 9.000 a 13.000 t/dia de lodo desagüado a ser disposto (ANDREOLI et al., 2001). A destinação final do lodo é uma operação complexa e, apesar de representar de 1-2% do volume do esgoto tratado, o gerenciamento do lodo tem um custo entre 20-60% do total gasto com a operação de uma ETE (ANDREOLI et al., 2001).

Durante anos, os projetos das ETE's, praticamente ignoravam o destino adequado do lodo de esgoto a ser removido (ANDREOLI; FERNANDES, 1999). No entanto, com o aumento da consciência ambiental, o destino do lodo passou a representar um problema a ser resolvido, tendo em vista, principalmente, a segurança sanitária e ambiental (GONÇALVES, 1999b).

Caso o esgoto e o lodo não sejam tratados adequadamente e se, de algum modo, alcançarem os rios, podem contaminá-los, estendendo seus efeitos nocivos à pastagens, plantações e indivíduos. Portanto conclui-se que, quanto maior for a proporção de lodo tratado, menores serão os riscos da população em contaminar-se com patógenos sejam eles vírus, bactérias ou parasitas (SOCCOL; PAULINO; CASTRO, 1999). Infelizmente, não é raro o lodo ser armazenado em condições precárias, ou ser distribuído para agricultores sem controle algum de sua qualidade, ou ainda ser lançado nos cursos de água (ANDREOLI; FERNANDES, 1999).

A reciclagem agrícola é uma das formas de disposição final do lodo de esgoto que pode ser considerada mais adequada em termos técnicos, econômicos e ambientais, desde que convenientemente aplicada (ANDREOLI, 1999; TSUTIYA, 1999), uma vez que apresenta o menor custo para a reciclagem de matéria orgânica e nutrientes (MATTHEWS, 1998).

Desde a mais remota antiguidade, os bio-sólidos são utilizados na agricultura, principalmente entre os povos do oriente, como na China, onde a reciclagem dos excrementos humanos era rotineira. No mundo ocidental, entretanto, barreiras culturais dificultam essa prática. É de extrema importância para o sucesso da reciclagem agrícola do lodo de esgoto, que esta seja bem aceita por parte dos produtores/agricultores, pois para muitos, os esgotos e

as ETE's são ainda consideradas como fontes de poluição e não como prováveis fontes de energia para uma agricultura auto-sustentável (VANZO, 2001). Para uma maior valorização agrícola deste produto, é fundamental o monitoramento dos patógenos nos solos fertilizados e nos produtos produzidos (BONNET; LARA; DOMASZAK, 1998), principalmente para as condições brasileiras, onde não há conhecimento acumulado sobre a persistência de patógenos nos solos, após sua aplicação (BONNET; LARA; DOMASZAK, 1998).

A reciclagem agrícola tem se constituído em uma das formas mais utilizadas em diversos países desenvolvidos (Bélgica, 29%; Dinamarca, 54%; França, 58%; Alemanha, 27%; Itália, 33%; Espanha, 50% e Reino Unido, 44%) como condicionador e fertilizante do solo, sendo que nos Estados Unidos da América (EUA) o uso do lodo como fertilizante data de 1927 (NEIVA, 1999).

Infelizmente, no Brasil, a disposição dos lodos gerados pela ETE's visa principalmente a sua retirada da área de tratamento por caminhões (SOBRINHO, 2001) que os transportam, geralmente, para aterros sanitários sem maiores critérios de segurança. No entanto, embora a disposição do lodo de esgoto em aterros sanitários seja uma opção aceitável tecnicamente, esta apresenta o inconveniente de concorrer com os resíduos sólidos urbanos, custo de manutenção elevado e grande risco ambiental. Além disso, a utilização dos aterros de forma contínua e em grande quantidade diminui rapidamente a sua vida útil, tornando essa forma de disposição insustentável ao longo do tempo (ROCHA; GONÇALVES; MOURA, 2004; GUEDES, 2005).

Com base na situação brasileira, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) publicou a Resolução 375/2006 (CONAMA, 2006), que define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em ETE's sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Porém, o uso agrícola ainda é restrito e oficialmente, esta prática ocorre, em escala experimental, nos Estados de São Paulo, Paraná e Distrito Federal (VANZO; MACEDO; TSUTIYA, 2001).

Para as condições ambientais brasileiras, a reciclagem agrícola do lodo apresenta vários aspectos positivos, pois os climas tropical e subtropical expõem o solo a um intenso intemperismo e rápida mineralização da matéria orgânica, sendo uma alternativa bastante promissora. O uso do lodo na agricultura fornece ao solo matéria orgânica, macro e micronutrientes, atuando como condicionador do solo e contribuindo para uma agricultura auto-sustentável (GONÇALVES, 1999b; LARA, 1999).

Como fator positivo do uso do lodo, resta ainda acrescentar que a quantidade e a

variedade de nutrientes da matéria orgânica presente no lodo aumentam a fertilidade do solo, melhorando suas características físico-químicas. A mistura do lodo ao solo permite aumentar a capacidade de armazenamento de nutrientes do mesmo e facilita a infiltração de água, sem, no entanto, propiciar a ocorrência de erosão; este risco, na verdade, fica bastante diminuído (GONÇALVES, 1999b).

As propriedades dos biossólidos são semelhantes às de outros produtos orgânicos, geralmente usados na agricultura (esterços suíno, bovino e avícola); portanto, em termos de resultados agrônômicos, os biossólidos poderiam ser aplicados à maioria das culturas. Porém, algumas culturas se prestam mais do que outras para o uso de biossólidos. Desta forma, por precaução, é vetado o uso de biossólidos (mesmo que higienizados) para a horticultura e demais produtos consumidos crus, que tenham contato direto com os mesmos. As gramíneas (milho, trigo, cana-de-açúcar e sorgo), pelas suas características, são as culturas mais recomendadas e as que dão melhores respostas ao uso de biossólidos (TSUTIYA, 2001b).

Pesquisas apresentam bons resultados do uso do lodo nas culturas de milho e repolho, na produção do tamboril (*Enterolobium contortissiliquum* Vell Morong) e no plantio do cafeeiro (*Coffea canephora*) (COSTA et al., 1999).

Biologicamente, as ETE's poderiam transformar-se em indústrias de biofertilizantes e os seus lodos, quando tratados adequadamente, em bioprodutos que, ao serem aplicados no solo, devolveriam os minerais e a matéria orgânica que um dia foram retirados (VANZO, 2001).

2.5 Considerações sobre o lodo como disseminador de patógenos

A transmissão de doenças humanas pelo lodo não tratado pode ocorrer de forma direta e/ou indireta (SOCCOL; PAULINO; CASTRO, 1998; GONÇALVES; LIMA; PASSAMANI, 1999; MEDEIROS et al.,1999) ou ainda, de forma vetorizada (GONÇALVES; LIMA; PASSAMANI, 1999).

A contaminação direta pode ocorrer pelo manejo de áreas onde o lodo foi aplicado, pelo contato com vegetais crus cultivados em solo adubado com lodo e pela inalação de microorganismos patogênicos através da aerossolização de partículas do lodo no solo (GONÇALVES; LIMA; PASSAMANI, 1999; MEDEIROS et al.,1999).

A transmissão indireta pode acontecer por consumo de vegetais, carne, leite e animais

que tenham sido contaminados por patógenos presentes no lodo, pela ingestão de água contaminada, pela proximidade das áreas de aplicação do lodo e pelo contato com agentes vetores (roedores e insetos), que tenham estado nas áreas que receberam lodo (GONÇALVES; LIMA; PASSAMANI, 1999; MEDEIROS et al., 1999).

Os microorganismos encontrados no lodo podem ser saprófitas (que participam nos processos de tratamento biológico dos esgotos), comensais, simbiontes e parasitas. Apenas alguns deles são patogênicos, ou seja, capazes de causar doenças no homem e em animais (MEDEIROS et al., 1999; TSUTIYA, 2001a).

Para que o desenvolvimento da doença ocorra, vários fatores devem ser considerados como dose infectante, patogenicidade (capacidade do agente infeccioso em causar doenças e danos ao hospedeiro), fatores ambientais e susceptibilidade do hospedeiro. O tempo entre a infecção e o aparecimento dos sintomas clínicos é denominado de tempo de incubação sendo este variável conforme o microorganismo.

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 (BITTON, 1997).

A concentração de microorganismos liberadas por grama de fezes varia conforme o microorganismo 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^{11} partículas virais (RUSIN et al., 2000).

2.6 Considerações sobre os vírus entéricos

Os vírus entéricos se encontram distribuídos em todas as partes do mundo e são causadores de muitas doenças que afetam o ser humano tais como gastroenterites, infecções respiratórias, conjuntivites, hepatites e doenças que tem alta taxa de mortalidade como meningite asséptica, encefalite, e paralisia em indivíduos imunocomprometidos (KOCWA-HALUCH, 2001). Além disso, alguns vírus entéricos tem sido ligados a doenças crônicas como miocardite e diabetes insulino-dependente (KOCWA-HALUCH, 2001; GRIFFIN et al., 2003). Estes vírus são transmitidos pela via fecal-oral. Posteriormente à ingestão pelo homem, os vírus entéricos replicam-se no trato gastrintestinal e são excretados nas fezes em grandes quantidades (10^6 a 10^{11} partículas virais por grama) pelos indivíduos infectados e podem,

quase sempre, ser detectados em efluentes de esgotos domésticos (ROTBART, 1991; MUIR et al., 1998; PINA et al., 1998; ARNAL et al., 1999; RUSIN et al., 2000; SOULE et al., 2000).

No meio ambiente, estes vírus são capazes de se agregar rapidamente às partículas sólidas protegendo-se, desta forma, dos fatores inativantes, o que favorece sua viabilidade. Estes vírus possuem resistências variáveis aos agentes físico-químicos de inativação podendo permanecer viáveis ou potencialmente infectantes durante meses na água, resistindo a condições ambientais adversas e a processos de tratamento de água e esgoto aplicados no controle bacteriano (TRABELSI et al., 1995; NICAND; TEYSSOU; BUISSON, 1998; LECLERC; SCHWARTZBROD; DEI-CAS, 2002; TREE; ADAMS; LEES, 2003; SKRABER et al., 2004).

Os vírus entéricos mais prevalentes que são transmitidos ao homem são principalmente os responsáveis pelas hepatites A (vírus da Hepatite A (HAV)) e E (vírus da Hepatite E (HEV)), calicivírus do gênero norovírus (Small Round Structured Viruses), enterovírus, rotavírus (RV), astrovírus e AdV (LE GUYADER et al., 2000; LEES, 2000; SCIPIONI; DAUBE; THIRY, 2000). Além disso, estes vírus são muito mais resistentes que as bactérias ao processo comum de tratamento de esgotos, incluindo a cloração (GABUTTI et al., 2000). A dose infectante desses agentes é extremamente baixa variando de uma a dez unidades infecciosas (PUIG et al., 1994; LECLERC; SCHWARTZBROD; DEI-CAS, 2002; ASHBOLT, 2004). Por estes motivos, o grupo dos vírus entéricos é o mais significativo, confiável e eficiente modelo a ser usado para o monitoramento ambiental segundo a Agência norte-americana de Proteção Ambiental (EPA) (PUIG et al., 1994; BOSCH; PINTO; ABAD, 1995).

Os vírus entéricos podem ser divididos em dois grupos de acordo com a replicação em culturas celulares. O primeiro grupo inclui os enterovírus como poliovírus (PV), coxsackievírus e echovírus, que têm boa replicação e caracterização em culturas de células de primatas e que, normalmente, não causam doenças gastrointestinais. O segundo grupo inclui RV, astrovírus, AdV 40/41, calicivírus (norovírus e saporovírus), HAV e HEV, os quais são agentes causais de gastroenterites ou hepatites e são considerados fastidiosos (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001).

2.6.1 Adenovírus

Os AdV pertencem à família Adenoviridae e são subdivididos em dois gêneros: *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus*. No primeiro são encontrados vírus que acometem mamíferos e marsupiais e, no segundo, os responsáveis por algumas doenças de aves (FLINT et al., 2000). O gênero *Mastadenovirus* compreende 51 diferentes sorotipos, que são classificados em seis subgêneros (A a F) (MURPHY et al., 1995; DE JONG et al., 1999; LEES, 2000; ALLARD; ALBINSSON; WADELL, 2001; AVELLÓN et al., 2001; HORWITZ, 2001; GU et al., 2003).

A partícula viral tem simetria icosaédrica não envelopada com um diâmetro de 80 nm (LEES, 2000), constituído por 252 capsômeros. Destes, 240 são *hexons* e 12 são *pentons*. Cada *penton* possui uma base circundada por 5 *hexons* e a partir desta base, projeta-se a fibra (Figura 1). Na extremidade de cada fibra, existe uma protuberância que possui propriedade imunogênica tendo ainda como função a adsorção do vírus à célula hospedeira (NORRBY, 1969). O material genético é composto por ácido desoxirribonucléico (DNA) de dupla fita não segmentado (FLINT et al., 2000; LEES, 2000).

Estes vírus apresentam uma grande variabilidade genética, o que possibilitou a sua classificação em espécies e sorotipos (LEES, 2000). Os determinantes antigênicos, importantes para a caracterização sorológica, estão localizados no *hexon* e na fibra. Na superfície interna do *hexon* situa-se o determinante alfa, que é o antígeno gênero-específico comum a todos os membros do mesmo gênero. O determinante *epsilon* do *hexon* e o *gamma* da fibra caracterizam os sorotipos (FLINT et al., 2000).

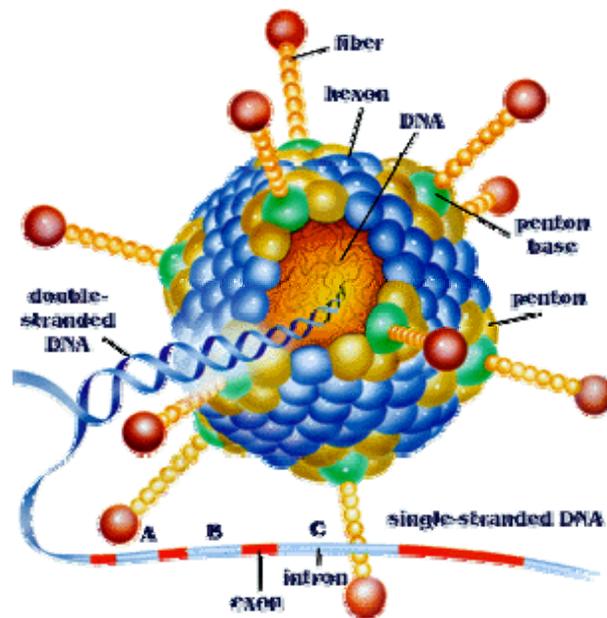


Figura 1. Representação esquemática da morfologia e estrutura do adenovírus. Fonte: Roberts e Sharp (1993).

Os AdV humanos causam uma variedade de doenças infecciosas sintomáticas, como doenças respiratórias (faringite, doença respiratória aguda e pneumonia), oculares (conjuntivites), trato gastrointestinal (gastroenterites), sistema nervoso central (meningoencefalite) e genitais (uretrite e cervicite) (KAPIKIAN; WYATT, 1992; CRABTREE et al., 1997). Os principais modos de infecção se dão pela via respiratória (pessoa-pessoa e ar através da inalação de aerossóis) e pela via fecal-oral (pessoa-pessoa, ingestão de água e alimentos contaminados) (FIELDS et al., 1996; KIDD et al., 1996; ALLARD; ALBINSSON; WADELL, 2001; AVELLÓN et al., 2001). As infecções por AdV ocorrem durante o ano com pequena ou nenhuma variação sazonal de liberação destes vírus para o meio ambiente (CHAPRON et al., 2000).

Os membros do subgênero A, sorotipos 12, 18 e 31, causam infecções respiratórias e gastroenterites em crianças menores de um ano de idade (WADEL, 1984). Estes sorotipos são isolados quase exclusivamente do trato gastrointestinal (SCHMITZ; WIGAND; HEINRICH, 1983). O subgênero B está dividido em dois grupos pela análise de restrição do DNA: na classe B:1 encontram-se os sorotipos 3, 7, 14, 16 e 21, que são associados predominantemente às infecções respiratórias; na classe B:2, encontram-se os sorotipos 11, 34 e 35, sendo bastante próximos geneticamente e causam infecções renais e do trato urinário (WADEL, 1984).

Os AdV humanos 3, 7 e 21 (subgênero B) são reconhecidos por estar entre os mais patogênicos dos 51 sorotipos de AdV humanos conhecidos em severidade e extensão de doenças clínicas (HIERHOLZER, 1995). Juntos eles contabilizam 30% de todos os AdV isolados reportados pela Organização Mundial de Saúde (WHO) (SCHMITZ; WIGAND; HEINRICH, 1983). Embora mais comumente associados com doenças respiratórias amenas e conjuntivites, eles podem causar infecções do trato respiratório baixo severas e fatais, principalmente em bebês e crianças (CHANY et al., 1958; WADELL, 1984; LARRANAGA et al., 2000) e ocasionalmente em adultos (BURTON et al., 1972).

Os sorotipos 1, 2, 5 e 6 pertencem ao subgênero C, são considerados endêmicos, infectam as adenóides e tonsilas, podendo ser isolados de fezes de indivíduos assintomáticos por longos períodos (ALLARD; ALBINSSON; WADELL, 2001). Os AdV pertencentes aos subgêneros B e C têm mostrado uma grande variabilidade genética pela análise de restrição do DNA (ALLARD et al., 1990; ELNIFRO et al., 2000). AdV do tipo 2 (AdV2) e do tipo 5 (AdV5) (subgênero C) são agentes etiológicos de episódios epidêmicos e esporádicos, afetando o trato respiratório superior e inferior, particularmente em crianças (FOY, 1997; VIDELA et al., 1998). O subgênero D apresenta a maior variabilidade genética entre os AdV humanos, sendo a maioria dos sorotipos isolados de indivíduos com infecções assintomáticas. Alguns sorotipos do subgênero D, como 8, 10 e 19 estão associados à queratoconjuntivite epidêmica. O subgênero E possui um único membro, o sorotipo 4, que pode causar infecção respiratória e ocular, mas um genótipo variante do 4 tem sido associado com conjuntivites (WADELL, 1984).

Os AdV entéricos 40 e 41 (subgênero F) diferem dos outros sorotipos por apresentarem duas fibras distintas e por serem de cultivo fastidioso (UHNÖO et al., 1984; WADELL et al., 1994; PINTÓ et al., 1995; SHENK, 1996; HORWITZ, 1996; MEDEIROS et al., 2001; SOARES et al., 2002).

Além dos sorotipos entéricos 40 e 41, alguns sorotipos pertencentes aos subgrupos A, B e C também têm sido apontados como agentes etiológicos de gastroenterites em crianças (ADRIAN; WIGAND, 1989; BROWN, 1990). Além disso, se sabe que quase todos os sorotipos podem se replicar no trato intestinal sem exibir gastroenterite sendo subsequentemente excretados nas fezes (HORWITZ, 2001), podendo contaminar esgotos, rios, mares e moluscos (GIRONES et al., 1995; PINA et al., 1998; LEES, 2000).

Em comparação com as infecções causadas por RV, os AdV entéricos geralmente causam diarreia menos severa, porém por um período mais prolongado, podendo persistir por

semanas. Estudos sorológicos indicam que 50% das crianças e jovens apresentam imunidade à infecção por este vírus (LEES, 2000).

Os AdV são mais estáveis em vários ambientes e resistentes à ação de agentes químicos como cloro, e físicos como a radiação ultravioleta (UV) (REYNOLDS et al., 2001; GERBA; RAMOS; NWACHUKU, 2003; GERBA; NWACHUKU; RILEY, 2003; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003a; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003b), bem como a condições diversas de pH. Essas características possibilitam sua permanência no meio ambiente por longos períodos. Alguns deles apresentam certa resistência aos estágios primário e secundário do tratamento de águas de esgoto, o que aumenta ainda mais o risco da população ser contaminada por esses vírus (ENRIQUEZ; HURST; GERBA, 1995; REYNOLDS et al., 2001).

A escolha deste agente viral para o estudo no presente trabalho de dissertação foi baseada no risco que ele apresenta à saúde pública, quando presente no meio ambiente, e a sua grande estabilidade e resistência a condições adversas (GERBA; ROSE, 1990; PUIG et al., 1994; PINA et al., 1998). Além disso, muitos pesquisadores têm sugerido a utilização dos AdV como um indicador de contaminação viral humana no meio ambiente, visto que esses vírus são detectados, também, quando há a presença de enterovírus e/ou HAV (PUIG et al., 1994; PINA et al., 1998; CHO et al., 2000; HERNROTH et al., 2002; MUNIAIN-MUJICA et al., 2002).

2.6.2 Vírus da Hepatite A

O HAV é um membro da família Picornaviridae (MINOR, 1991; CROMEANS; NAINAN; MARGOLIS, 1997; CUTHBERT, 2001). No entanto, ele foi primeiramente descrito com um membro do gênero *Enterovirus* (sorotipo 72) por compartilhar com os outros vírus deste gênero algumas propriedades físico-químicas e características morfológicas e genômicas gerais, assim como transmissão pela via fecal-oral.

Atualmente, é classificado em um gênero separado, o dos *Hepatovirus* (MINOR, 1991; CUTHBERT, 2001), devido a várias características: ele é atípico quanto à seqüência do seu ácido nucléico, ou seja, possui baixa porcentagem de homologia com o genoma dos enterovírus; possui termoestabilidade a 60°C; seu sítio de replicação é o fígado; sua multiplicação em cultura celular é lenta e o isolamento primário em culturas celulares é

difícil, lento e fastidioso, pois os vírus selvagens não apresentam efeito citopático (ECP) e tendem a estabelecer uma infecção persistente (BEARD et al., 1999; SCIPIONI; DAUBE; THIRY, 2000).

O vírus possui um genoma bastante conservado, sendo que as diferentes cepas de HAV do mundo inteiro correspondem a um único sorotipo e são classificadas em diferentes genotipos, de acordo com análises de seqüências (ROBERTSON et al., 1992; APAIRE-MARCHAIS et al., 1995; COSTA-MATTIOLI et al., 2003). Atualmente, esta classificação compreende quatro genotipos humanos (I, II, III e VII) e três símios (IV, V e VI), além de evidências de recombinação em populações naturais do vírus (COSTA-MATTIOLI et al., 2003).

O HAV tem forma icosaédrica e não é envelopado (WINOKUR; STAPLETON, 1992; CUTHBERT, 2001). O genoma viral é constituído por um ácido ribonucléico (RNA) de fita simples (CUTHBERT, 2001) de polaridade positiva. A cadeia de RNA consiste de três regiões: uma região não codificadora na extremidade 5' de 734 a 740 nucleotídeos, uma parte intermediária, codificadora (quadro aberto de leitura- ORF), com 2.225 a 2.227 nucleotídeos e uma parte não codificadora na extremidade 3' com 40 a 80 nucleotídeos (BROWN et al., 1991; BROWN; ZAJAC; LEMON, 1994; HOLLINGER; TICEHURST, 1996; PEREIRA; GONÇALVES, 2003). A região não codificadora situada na extremidade 5' é conservada no HAV (mais de 92% de nucleotídeos idênticos). A região codificadora responde por onze proteínas, cuja expressão é feita através de uma única poliproteína (BEARD et al., 1999).

A parte intermediária codifica uma poliproteína que, por meio de clivagem, por proteólise, se transforma na proteína viral madura. Esta região é denominada P1, e possui as proteínas do capsídeo viral VP1, VP2 e VP3 (GAUSS-MULLER; LOTTSPEICH; DEINHARDT, 1986; PROBST; JECHT; GAUSS-MULLER, 1999). A quarta proteína do capsídeo viral (VP4), essencial para a formação da partícula viral (PROBST; JECHT; GAUSS-MULLER, 1999), não está presente nas partículas virais maduras (CUTHBERT, 2001; NAINAN et al., 2006). As proteínas não estruturais encontradas nas regiões P2 e P3 são responsáveis pela síntese de RNA e maturação da partícula viral (CUTHBERT, 2001).

A hepatite A tem distribuição universal, sendo endêmica em muitas regiões, mas a prevalência da infecção varia muito com o grau de higiene e com as facilidades sanitárias disponíveis para as populações. A transmissão deste vírus ocorre por via fecal-oral, principalmente através da ingestão de água e alimentos contaminados (CUTHBERT, 2001). Após a replicação no trato gastrintestinal ou no fígado, esses vírus são excretados em altas

quantidades nas fezes (10^6 a 10^{10} partículas virais por grama) e podem ser dispersos no ambiente por esgoto não tratado (MUNIAIN-MUJIKÁ et al., 2002).

Quando se analisa a prevalência de sorologia positiva para o anti-HAV total em diferentes regiões do mundo quatro padrões de endemicidade podem ser observados: a) em países pobres, com baixo índice de facilidades sanitárias, a infecção tem incidência muito alta, ocorrendo precocemente e, mais de 90% das crianças tem sorologia positiva para o HAV no fim da primeira década de vida; nessas regiões a hepatite aguda é menos freqüente nos nativos e as epidemias mostram-se raras; b) em países com melhores condições sanitárias a incidência é intermediária e a curva de distribuição vai se tornando sigmóide, com prevalência mais baixa nas duas primeiras décadas de vida e com pico de prevalência de sorologia positiva na adolescência; nessas regiões a hepatite aguda é mais freqüente, representando risco para os susceptíveis não vacinados e surtos epidêmicos podem ocorrer devido à contaminação acidental de alimentos e da água; c) em regiões desenvolvidas a incidência da doença é baixa, com o pico de prevalência de sorologia positiva para o HAV em adultos jovens, sempre em níveis mais baixos do que nas regiões de prevalência intermediária; a incidência da doença é baixa e epidemias podem ocorrer por contaminação acidental de água e alimentos; d) em regiões desenvolvidas, com pouca migração, a incidência pode ser muito baixa e o pico de prevalência de pacientes com sorologia positiva para o HAV ocorre tardiamente, em adultos; nessas áreas a doença é muito pouco freqüente geralmente adquirida por pessoas que viajaram para áreas de maior endemicidade e os surtos epidêmicos são raros (FEINSTONE; GUST, 2000; CUTHBERT, 2001).

O HAV é o principal causador de hepatites agudas no mundo inteiro, podendo conduzir à doença severa e até mesmo à morte, ou ocasionar epidemias. A doença clínica ocorre e uma taxa de mortalidade de 1 a 2% é estimada entre adultos e adolescentes não imunes, nos países industrializados (CUTHBERT, 2001; KHUROO, 2003).

Uma revisão da literatura publicada sobre a prevalência de anti-HAV total em algumas cidades brasileiras mostra um padrão heterogêneo: alta prevalência nas regiões Norte e Centro-Oeste (GAYOTTO; QUARENTEI; CABRAL, 1984; QUEIRÓZ et al., 1995a; QUEIRÓZ et al., 1995b; CLEMENS et al., 2000; DE PAULA et al., 2001; ASSIS et al., 2002), com padrão semelhante aos observados em regiões subdesenvolvidas e prevalência decrescente da região Sudeste para a região Sul (ABUZWAIDA et al., 1978; PANNUTI et al., 1985; OLIVEIRA et al., 1991; FERREIRA; PEREIRA LIMA; BARROS, 1996; FOCACCIA et al., 1998; PINHO et al., 1998; SABACK et al., 2001; TRINTA et al., 2001), onde a

prevalência na primeira década, mesmo nas populações de mais baixa renda é menor do que a observada na região Norte.

O Brasil exibe um padrão muito heterogêneo de endemicidade da infecção pelo HAV, variando de acordo com a região geográfica e com os grupos socioeconômicos (VILLAR et al., 2006). No passado, o Brasil era considerado como uma área com alta endemicidade onde quase todas as pessoas tinham sido infectadas no começo da infância (VITRAL et al., 1998).

O HAV tem alto grau de estabilidade físico-química, sendo estável em pH 1 durante 5 horas (h) à temperatura ambiente e durante 90 minutos (min) à 38°C (SCHOLZ; HEINRICY; FLEHMIG, 1989). O vírus pode sobreviver por 671 dias a 4°C e por 25 dias a 25°C (MELNICK, 1995), é relativamente resistente ao calor (60°C por uma h), ao tratamento com éter e a detergentes. Outra característica importante deste vírus é que o mesmo permanece infectante após o congelamento (SEYMOUR; APPLETON, 2001). A inativação do HAV é possível a uma temperatura superior a 85°C por 1 min (NAINAN et al., 2006), pode também ser inativado por autoclavação (121°C/20 min), UV, 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).

A cepa selvagem do HAV é também fastidiosa sendo que seu cultivo *in vitro* é bastante dificultado (NUANUALSUWAN; CLIVER, 2002). Mesmo assim sua presença no meio ambiente pode ser demonstrada por técnicas moleculares que envolvam amplificação gênica (YOTSUYANAGI et al., 1996).

2.6.3 Enterovírus

Devido à sua alta prevalência e a facilidade de isolamento em cultura celular, os enterovírus têm uma longa história de uso como marcadores de poluição ambiental. Muitos trabalhos relatam o isolamento destes vírus em esgotos, águas poluídas e em moluscos bivalves (JAYKUS; DE LEON; SOBSEY, 1994; HONG et al., 2000; LE GUYADER et al., 2000; LEES, 2000).

O gênero *Enterovirus*, pertencente à família Picornaviridae, é constituído por: PV humanos tipos 1 a 3, coxsackievírus humanos A1 a A22 e A24, coxsackievírus humanos B1 a

B6, echovírus humanos 1 a 7, 9, 11 a 27 e 29 a 33, enterovírus humanos 68 a 71 e alguns enterovírus não humanos (MODLIN, 1995; MELNICK, 1996). Os enterovírus são partículas virais com RNA de fita simples, capsídeo icosaédrico com um diâmetro de 20 a 30 nm (FONG; LIPP, 2005).

Os enterovírus são estáveis em uma faixa de pH entre 3 e 9, sensíveis ao cloro e inativados por UV (MELNICK, 1996), 72°C por 15 segundos (s) e por tratamento com diluição 1:125 de água sanitária por 30 s (WEBER et al., 1999; MARGOLIS, 2000; STRAZYNSKI; KRAMER; BECKER, 2002). A maioria é citopatogênica e pode ser propagada em células primárias ou de linhagem contínua de uma variedade de tecidos de origem humana ou de macaco, tais como HeLa, WI-38 e Vero (MELNICK, 1996).

Cerca de 66 tipos sorológicos de enterovírus conhecidos podem infectar o homem. De maneira geral, são eliminados por longos períodos através das fezes (um mês ou mais) e, normalmente, causam infecções assintomáticas, embora também possam causar paralisias, meningites ou cardiomiopatias. São encontrados em todas as partes do mundo e estão amplamente distribuídos durante o ano inteiro, porém com uma maior frequência no verão e no outono em países de clima temperado (MELNICK, 1996; BORCHARDT et al., 2003).

Enfermidades causadas por enterovírus e veiculadas pela água não são facilmente reconhecidas, já que é baixo o índice de transmissão desses vírus pela água (MELNICK, 1996). No entanto, em diferentes países, estes patógenos têm sido evidenciados em surtos de gastroenterites associadas à ingestão de águas destinadas ao consumo humano contaminadas (HÄFLIGER; HÜBNER; LÜTHY, 1999; GOFTI-LAROCHE et al., 2001; FROST; KUNDE; CRAUN, 2002).

Nossa ênfase em relação ao gênero *Enterovirus* foi sobre o PV (ROMERO; ROTBART, 1993). São vírus não envelopados, com um capsídeo icosaédrico que circunda o material genômico constituído de uma fita simples de RNA cuja extremidade 5' apresenta-se ligada à proteína codificadora viral (VPG), e na extremidade 3' encontra-se uma cauda poliadenilada (MINOR, 1999; FRIEDRICH, 2000).

O PV é classificado sorologicamente em três sorotipos, designados por 1, 2 e 3 baseados na natureza antigênica do capsídeo (WHITE; FENNER, 1994; MINOR, 1999). O PV normalmente infecta seu hospedeiro atacando o sistema nervoso central e causando paralisia em suas vítimas (poliomielite) (FONG; LIPP, 2005).

A poliomielite é uma doença altamente infecciosa causada por qualquer um dos três tipos de PV: tipo 1, 2 ou tipo 3. A doença não tem tratamento específico, mas pode ser

prevenida através da vacinação (BONNET; DUTTA, 2008). PV é considerado um dos vírus de RNA mais rapidamente evoluído (MACADAM et al., 1991; GAVRILIN et al., 2000; MARTIN et al., 2000). Os mecanismos desta evolução rápida do PV são as mutações e os eventos recombinantes. A vacina oral de PV vivo atenuado (OPV) consiste de cepas de PV vivos atenuados (cepas vacinais Sabin) de três sorotipos de PV (DEDEPSIDIS et al., 2007). A utilização da vacina atenuada para PV (vacina Sabin) resulta em liberação fecal das cepas virais vacinais, que podem sobreviver ao processo de tratamento de esgoto (GERBA, 1981) e persistir no ambiente por vários meses (SATTAR, 1981). O OPV demonstra ser uma vacina muito efetiva na interrupção da transmissão do PV selvagem. Entretanto, devido a sua instabilidade genética e produção rápida de reversão durante a replicação viral em pessoas que receberam a vacina, ela apresenta duas desvantagens para seu uso (KEW et al., 2004). O mais comumente reconhecido efeito adverso associado à vacina é a poliomielite parálitica associada à vacina (VAPP) (ASSAAD; COCKBURN, 1982), provavelmente causada pela reversão da neurovirulência da cepa viral vacinal como resultado de um ponto de mutação ou recombinação com PV selvagem (LI et al., 1996), cujos sintomas clínicos são idênticos ao da poliomielite parálitica causada pelo PV selvagem (KEW et al., 2005).

Durante a multiplicação das cepas vacinais Sabin no intestino humano, mutações em sítios específicos do genoma estão associados com o fenótipo atenuado das cepas vacinais Sabin e recombinações entre as cepas podem resultar em perda do fenótipo atenuado das cepas OPV e aquisição de traços característicos do PV selvagem, com um aumento da neurovirulência e perda da sensibilidade a temperatura (CAMMACK et al., 1988; ABRAHAM et al., 1993; FURIONE et al., 1993). Desde que os programas foram lançados em 1988, a incidência de casos de poliomielite tem reduzido drasticamente (PALLANSCH; SANDHU, 2006). A taxa mundial de VAPP (acidentes pós vacinais) é de 1 caso por 750.000 vacinas primárias (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1997). Entretanto, o uso contínuo de OPV em áreas livres de poliomielite tem mantido o risco de VAPP como única fonte da doença parálitica (TANO et al., 2007).

Em meados de 2003, dois estados nigerianos suspenderam a OPV, o que provocou uma epidemia nacional e tem levado a novos casos em 20 países livres de poliomielite e milhares de crianças com paralisia (CHAN, 2008). PV permanece endêmico em quatro países: Nigéria, Afeganistão, Paquistão e Índia (ARITA, 2006), e isso pode resultar em uma estimativa de quatro milhões de crianças com poliomielite parálitica nos próximos 20 anos (THOMPSON; TEBBENS, 2007). Nos países da América Latina há informações clínicas

limitadas sobre o uso de OPV (BONNET; DUTTA, 2008).

Indivíduos competentes imunologicamente excretam o PV por curtos períodos após a vacinação com OPV. Este período de excreção raramente excede várias semanas (MINOR, 1992). Entretanto, pacientes imunodeficientes podem excretar poliovírus derivados de vacina (VDPVs) por vários meses e até vários anos (MARTÍN, 2006). Um indivíduo no Reino Unido é conhecido por excretar PV derivado vacina Sabin-2 por um tempo estimado de 18 anos e ainda excreta até o presente (MACLENNAN et al., 2004). As cepas vacinais Sabin se replicam no intestino de pessoas imunocompetentes por períodos limitados de tempo após a vacinação. Durante este período que se estende entre vários dias e três meses, o indivíduo vacinado pode excretar vírus em que mutações e rearranjos genéticos são selecionados muito rapidamente. Essas mudanças ocorrem de maneira seqüencial provavelmente como resposta a diferentes pressões seletivas no intestino (MINOR, 1992). A prevalência de excreção do PV por longos períodos em indivíduos com imunodeficiência não é conhecida, embora estudos envolvendo mais de 1.000 indivíduos em diferentes países que incluem imunodeficientes para células B, indivíduos com a infecção pelo HIV e crianças com síndromes respiratórias e gastrointestinais recorrentes, não encontraram indivíduos que excretam o vírus vacinal por longos períodos (HALSEY et al., 2004).

A habilidade para identificar PV selvagem e PV vacinal em amostras clínicas e ambientais é, portanto necessária para monitorar a efetividade das estratégias de vacinação do PV (PÖYRY; STENVIK; HOVI, 1988; BÖTTIGER; HERRSTRÖM, 1992; MIYAMURA et al., 1992; TAMBINI et al., 1993), para identificar e monitorar a deflagração do PV (HOVI et al., 1986; SLATER et al., 1990; OOSTVOGEL et al., 1994; VAN DER AVOORT et al., 1995; CONYN-VAN SPAENDONCK et al., 1996), para diagnosticar os casos de VAPP e para excluir outros enterovírus de uma doença tipo poliomielite (CHUMAKOV et al., 1979; MELNICK, 1984; DIETZ et al., 1995).

2.6.4 Rotavírus

O material genético do RV humano é composto por RNA de dupla fita que pertence à família Reoviridae (ARIAS et al., 2002; PARASHAR et al., 2003), compreendendo partículas com simetria icosaédrica, não-envelopados, o que os torna mais resistentes aos solventes lipídicos (FLEWET et al., 1974).

A partícula viral mede aproximadamente 100 nm de diâmetro (ARIAS et al., 2002). Apresentam capsídeo triplo formado por três camadas protéicas concêntricas, que foram designadas como capsídeo externo, intermediário e interno (*core*) (PRASAD; CHIU, 1994), no qual se encontra o genoma composto por 11 segmentos de RNA dupla-fita (NEWMAN et al., 1975).

Das proteínas codificadas por esses segmentos, seis são estruturais e seis são não-estruturais (ANGEL; FRANCO; GREENBERG, 2007). Cada um dos segmentos codifica uma proteína específica. Estudos com a estirpe símia SA11 de RV, identificaram uma sexta proteína não-estrutural, codificada pelo segmento 11 do genoma viral, sendo esse o único segmento de RV que codificaria mais de uma proteína (MATTION et al., 1991).

As proteínas estruturais são designadas VP (*Viral Protein*) seguidas por número seqüencial na ordem decrescente da massa molecular. No *core* estão presentes as proteínas VP1 (125KDa), VP2 (94KDa) e VP3 (88KDa); no capsídeo intermediário a VP6 (46KDa), e no capsídeo externo as proteínas VP4 (88KDa) e VP7 (38KDa) (ESTES; COHEN, 1989). As proteínas não-estruturais, encontradas nas partículas virais maduras, recebem a denominação NSP (*Non-Structural Protein*).

No *core* viral, as proteínas VP1 (*Pol*) e VP3 (*Cap*) estão diretamente associadas ao genoma. A proteína VP2 constitui a capa, sendo a mais abundante do *core* viral com 120 moléculas por *vírion* (ESTES, 2001). A proteína VP1 possui atividade de RNA polimerase RNA-dependente e a proteína VP3 tem atividade de guanililtransferase e metiltransferase (ANGEL; FRANCO; GREENBERG, 2007), estando envolvida na adição da estrutura 5'-*cap* presente nos RNAs mensageiros. O capsídeo intermediário é formado por 780 moléculas da proteína estrutural VP6, organizadas em 260 unidades triméricas. O capsídeo externo é composto por duas proteínas, VP4 e VP7, que são responsáveis pelas interações iniciais do vírus com a célula hospedeira. A superfície externa do vírus apresenta 780 cópias da glicoproteína VP7, em arranjos trímeros e 120 cópias da proteína VP4, que formam 60 estruturas diméricas semelhantes a espículas. A proteína VP4 é uma proteína susceptível à clivagem por proteases intestinais que promovem sua adsorção aos vilos intestinais (no intestino delgado a proteína VP4 é clivada pela tripsina em VP5 e VP8 e esta clivagem possibilita a adsorção e penetração viral na célula) (ESTES, 2001; ANGEL; FRANCO; GREENBERG, 2007) (Figura 2).

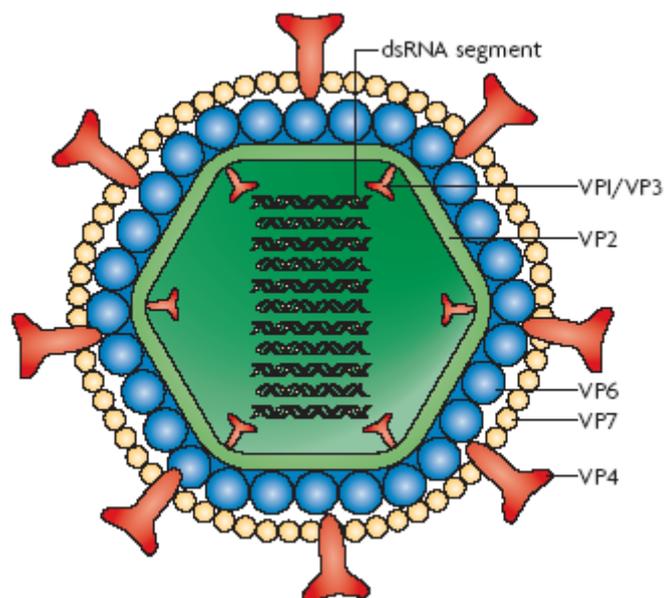


Figura 2. Representação esquemática da partícula viral do rotavírus. Fonte: Angel, Franco e Greenberg (2007).

São reconhecidos sete sorogrupos de RV nomeados de A a G (ESTES; COHEN, 1989; GLASS et al., 1996; SANTOS; HOSHINO, 2005), sendo os últimos quatro encontrados apenas em animais (ESTES, 2007). RV do grupo A são os maiores responsáveis por diarreias graves em crianças no mundo todo (GLASS et al., 1996).

A identificação dos sorotipos/genótipos dos RV é determinada através da análise das proteínas estruturais VP7 e VP4, respectivamente. A classificação dos sorotipos é designada pela especificidade de anticorpos neutralizantes para ambas as proteínas. O sorotipo VP7 é denominado sorotipo G, pois a VP7 é uma glicoproteína, já o sorotipo VP4 é denominado P, por esta ser uma proteína susceptível à clivagem por proteases. Quatorze sorotipos G foram determinados por ensaios de neutralização e dez destes tem sido recuperados de humanos. Em relação aos sorotipos P, 14 tem sido descritos e destes 9 foram recuperados de humanos. Vale ressaltar que podem ocorrer diversas combinações entre os genes que codificam para as proteínas estruturais VP7 e VP4, uma vez que estes segregam independentemente (SANTOS; HOSHINO, 2005).

A proteína estrutural VP6 é codificada por um gene muito conservado dentre todos os sorotipos/genótipos de RV. Como esta pode ser comum à grande maioria dos sorotipos de RV, este gene pode ser usado para a detecção de vários sorotipos, sendo que o iniciador gênico utilizado flanqueia uma região de 379 pares de base (pb) neste gene. Posteriormente o sorotipo específico pode ser determinado com iniciadores para os genes codificadores de VP7

e VP4 (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002; FONG; LIPP, 2005).

A infecção ocorre principalmente pela via oral por meio da ingestão de água e alimentos contaminados com fezes (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). A doença ocasionada pelo RV é precedida por um período de incubação de 24 a 48 h. Durante a infecção, um grande número de partículas virais é excretado nas fezes (10^9 a 10^{10} partículas por grama de fezes). Além disso, as partículas são resistentes à inativação física contribuindo para a transmissão dos RV. Infecções constantes em enfermarias e alta taxa de infecções nosocomiais são características que reforçam a contaminação do ambiente como importante fonte de infecção (AITKEN; JEFFRIES, 2001; SWIERKOSZ, 2001).

A cepa do RV que foi utilizada como vírus padrão neste trabalho foi o símio SA11, que é seguro, uma vez que o RV símio mimetiza com confiabilidade os mesmos efeitos produzidos pela cepa humana deste vírus e, ao mesmo tempo, não confere periculosidade ao manipulador, desde que respeitadas as condições de biossegurança, disponíveis no laboratório.

2.7 Metodologias disponíveis para detecção de vírus em lodo de esgoto

As metodologias desenvolvidas para a detecção viral em amostras clínicas e ambientais refletem a evolução do conhecimento na área de virologia, que começou com o isolamento dos vírus por indução da doença em animais de laboratório, detecção do ECP viral em culturas celulares, evoluindo para metodologias imunológicas e moleculares que detectam o material genético viral e identificam as espécies circulantes, através de análise de restrição (Reação em cadeia pela polimerase (PCR)-*restriction fragment length polymorphism*-(RFLP)) (METCALF; MELNICK; ESTES, 1995; ELNIFRO et al., 2000; ALLARD; ALBINSSON; WADELL, 2001; SOARES et al., 2002).

Quando presentes no meio ambiente, os vírus encontram-se em pequenas quantidades ou muito dispersos. Além disso, no lodo tratado os vírus presentes podem ser infectivos ou não. Assim, o lodo proveniente das ETE's 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; STEWART; LECHEVALLIER, 1999).

A técnica de cultura celular foi uma técnica muito utilizada para determinar a ocorrência de enterovírus infecciosos em amostras ambientais antes do desenvolvimento de métodos moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) no final da década de 1980 e é ainda o único método para determinar a infecciosidade das partículas virais presentes em amostras ambientais (FONG; LIPP, 2005). Por meio deste método o número de partículas virais é aumentado pela multiplicação e a detecção é possível pelo desenvolvimento de um ECP característico da infecção viral, o qual é visualizado em microscópio ótico (REYNOLDS; GERBA; PEPPER, 1996).

Os ensaios utilizando células BGMK foram um dos métodos mais tradicionais para monitoramento de enterovírus em amostras ambientais (BERG et al., 1984). Entretanto, muitos vírus entéricos podem não ser detectados por este método e, portanto este pode não ser adequado para avaliar a contaminação (CHAPRON; BALLESTER; MARGOLIN, 2000). A recuperação de vírus entéricos em amostras de lodo de esgoto pode ser variável e pequenas quantidades de vírus podem ser recuperadas, estando abaixo do limite de detecção de um ensaio de placa. Isto se confirma quando inibidores ambientais estão presentes no lodo de esgoto, o que pode impedir a formação da placa (CHAPRON; BALLESTER; MARGOLIN, 2000). Podem ocorrer também resultados falso-positivos devido à presença de substâncias citotóxicas como os ácidos húmicos, metais pesados e íons ferro, presentes nas amostras ambientais. Essas substâncias, por promoverem a lise celular, podem interferir na especificidade dos resultados (MONPOEHO et al., 2001; REYNOLDS et al., 2001).

A existência de uma grande diversidade de vírus presentes nas amostras ambientais também é um fator que pode dificultar a detecção de determinados grupos de vírus, uma vez que os menos fastidiosos produzem alterações morfológicas na monocamada celular mais rapidamente do que os mais fastidiosos (REYNOLDS; GERBA; PEPPER, 1996; REYNOLDS et al., 2001).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para detecção de patógenos virais em lodo de esgoto (BERMAN; SAFFERMAN, 1981; BRASHEAR; WARD, 1982; SAFFERMAN; ROHR; GOYKE, 1988; STETLER; MORRIS; SAFFERMAN, 1992). Eles normalmente consistem em três procedimentos, que são a eluição viral do lodo, a concentração viral e a detecção viral (SANO et al., 2003).

Antes da eluição das partículas virais, algumas metodologias indicam a adição de AlCl_3 e ajuste da solução para um pH 3,5 (BERMAN; SAFFERMAN, 1981; EPA, 1992; SOARES et al., 1994; SCHWARTZBROD, 1995) ou glicina 1M pH 2,0 (SCHEUERMEN;

FARRAH; BITTON, 1986).

No processo de eluição das partículas virais, várias soluções são indicadas como eluentes. Entre elas podemos citar: mistura de caseína isoelétrica com lecitina semi-purificada a 3% (JOHNSON; ELLENDER; TSAI, 1984); extrato de carne em diferentes pHs e concentrações (HURST et al., 1978; EPA, 1992; AHMED; SONRENSEN, 1995; STRAUB; PEPPER; GERBA, 1995; SCHWARTZBROD, 1995); tampão borato 0,1M contendo extrato de carne a 3% (pH 9) (ALBERT; SCHWARTZBROD, 1991); Na₂HPO₄, ácido cítrico e extrato de carne a 3% (SOARES et al., 1994; STRAUB et al., 1994); solução contendo glicina 0,05M, NaCl 0,14M (MIGNOTTE; MAUL; SCHWARTZBROD, 1999); extrato de carne a 7% e NaCl 0,3M (ALOUINI; SOBSEY, 1995); glicina (WALLIS; HENDERSON; MELNICK, 1972; SOBSEY et al., 1973; JAKUBOWSKI et al., 1974; JOFRE et al., 1989; PUIG et al., 1994; FORMIGA-CRUZ et al., 2005; HUNDESA et al., 2006); solução contendo Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, MgSO₄, CaCl₂ em água destilada (TARTERA; JOFRE, 1987). Além disso, o volume de eluente adicionado é de 2 a 50 vezes maior que o do lodo original.

A mistura entre o lodo e o eluente pode ser feita por agitação mecânica ou magnética, sonicação ou pela associação destes. Entre as metodologias disponíveis, a empregada por Albert e Schwartzbrod (1991) e Otawa et al. (2007) indica a sonicação da solução. O período de contato entre o eluente e o lodo também é bastante variável, de 5 min (HURST et al., 1978), 10 min (SOARES et al., 1994), 30 min (EPA, 1992) a 45 min (ALBERT; SCHWARTZBROD, 1991).

Esse estágio é seguido por centrifugação com velocidade e tempo variáveis de acordo com a metodologia adotada. Após o processo de eluição viral, algumas metodologias indicam a concentração viral que pode ocorrer por floculação orgânica (KATZENELSON; FATTAL; HOSTOVESKY, 1976) ou precipitação com PEG 6000 (LEWIS; METCALF, 1988).

No processo de concentração descrito por Lewis e Metcalf (1988), a precipitação viral ocorre com PEG em um período de incubação de 14 a 16 h. Após, ocorre uma centrifugação e o tempo desta é variável de acordo com o estudo, para citar: 10000 Xg por 45 min (BELGUITH; HASSEN; AOUNI, 2006) e 10000 Xg por 90 min (MIGNOTTE; MAUL; SCHWARTZBROD, 1999; MONPOEHO et al., 2001; MONPOEHO et al., 2004).

Vários estudos avaliaram algumas das metodologias de eluição viral descritas. Mignotte, Maul e Schwartzbrod (1999) compararam oito métodos de eluição viral. Os mais eficientes foram os descritos por Albert e Schwartzbrod (1991), Ahmed e Sorensen (1995), Alouini e Sobsey (1995). Já, Monpoeho et al. (2001) ao comparar oito métodos concluiu que

o que demonstrou o melhor rendimento na eluição viral foi o desenvolvido por Ahmed e Sorensen (1995). Nos dois trabalhos relatados utilizou-se enterovírus como modelo de análise.

Entretanto, para Belguith, Hassen e Aouni (2006) o método de eluição viral mais eficiente para recuperar enterovírus foi o descrito pela EPA (1992), com uma alta recuperação viral em cultura celular e melhor detecção por RT-PCR quando comparado a outros três métodos.

Já é bem conhecido que resíduos de lodo urbano são altamente heterogêneos e que variações no conteúdo viral de um resíduo para outro torna difícil a comparação (BELGUITH; HASSEN; AOUNI, 2006), particularmente por lodo ativado e lodo adensado onde o número de partículas virais é geralmente menor que o limite de detecção por cultura celular (SCHWARTZBROD, 1995). Como resultado, a heterogeneidade da amostra afeta a classificação estatística e a recuperação viral de diferentes métodos de eluição (BELGUITH; HASSEN; AOUNI, 2006).

A PCR é um método sensível e específico para detecção de genomas virais (KWOK et al., 1988; LARZUL et al., 1988; LAURE et al., 1988; SAIKI et al., 1988; GRIFFIN et al., 2003; GALLAGHER; MARGOLIN, 2007) e é relativamente simples comparada a cultura celular (GRIFFIN et al., 2003), porém não é capaz de distinguir entre partículas virais infecciosas e não infecciosas (GRIFFIN et al., 2003). A eficiência de amplificação viral por PCR em amostras ambientais é influenciada pela habilidade de recuperação viral da matriz ambiental e purificação do ácido nucléico recuperado (METCALF; MELNICK; ESTES, 1995).

PCR precedida de transcrição reversa (RT-PCR) é um método sensível, específico e rápido para detecção de vírus com genoma de RNA; entretanto, ela também não é capaz de distinguir entre partículas virais infecciosas e partículas virais que foram inativadas e não representam risco a saúde (RICHARDS, 1999; SANO et al., 2003; BELGUITH; HASSEN; AOUNI, 2006).

PCR integrada a cultura celular (ICC-PCR) foi desenvolvida para detectar partículas virais cultiváveis (CHUNG; JAYKUS; SOBSEY, 1996; REYNOLDS; GERBA; PEPPER, 1996; CHAPRON et al., 2000). Este método combina cultura celular e detecção molecular do ácido nucléico genômico viral (KO; CROMEANS; SOBSEY, 2003), superando as desvantagens individuais da cultura celular e da PCR. O uso da cultura celular ajuda a diluir os inibidores da PCR que, de outra forma, teriam que ser removidos utilizando técnicas como colunas, que embora removam os inibidores da PCR, também reduzem simultaneamente a

concentração de vírus. Além disso, a cultura celular anteriormente a amplificação dos ácidos nucleicos fornece um sistema de amplificação *in vitro* que aumenta o número de cópias de partículas virais infecciosas, que leva a um aumento na sensibilidade e aumenta a probabilidade de sua detecção, mesmo se as partículas virais não produzem ECP (KO; CROMEANS; SOBSEY, 2003) e ao mesmo tempo permite uma diferenciação entre partículas virais infecciosas e não infecciosas (REYNOLDS, 2004). ICC-PCR permite avaliar um grande número de amostras quando comparado com a PCR tradicional (GALLAGHER; MARGOLIN, 2007). Vários estudos têm considerado a sensibilidade, eficiência e facilidade da ICC-PCR e descobriram que este é um método melhor que a PCR tradicional ou a cultura celular somente (BLACKMER et al., 2000; CHAPRON et al., 2000; GREENING; HEWITT; LEWIS, 2002; JIANG et al., 2004; KO; CROMEANS; SOBSEY, 2003; LEE; JEONG, 2004; LEE et al., 2005; REYNOLDS; GERBA; PEPPER, 1996; REYNOLDS; GERBA; PEPPER, 1997; REYNOLDS et al., 2001).

(RT)-PCR em tempo real é uma técnica poderosa e cada vez mais popular para detecção rápida e quantificação de microorganismos patogênicos em amostras clínicas e ambientais (HEIM et al., 2003; MONPOEHO et al., 2002).

Os procedimentos para detecção de vírus no lodo devem permitir a recuperação de partículas virais 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).

Vírus potencialmente patogênicos encontrados em efluentes de esgoto incluem AdV humanos A-F, PV, enterovírus A-D, HAV, RV do grupo A entre outros (GIRONES, 2006). O monitoramento e a detecção de patógenos virais como PV, coxsackievirus e echovirus em lodo de esgoto tem sido bem documentado (HURST, 1991; MATSUI; GREENBERG, 1996).

Como já citado anteriormente, apesar do CONAMA ter publicado em 2006, a Resolução 375, que define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em ETE's sanitário e seus produtos derivados (CONAMA, 2006), ainda não foram realizados estudos sistemáticos no Brasil sobre a presença de patógenos virais nesse tipo de amostra.

A adoção de uma metodologia simplificada e rápida, que possibilite a recuperação de vírus entéricos humanos de amostras de lodo de esgoto, empregando técnicas clássicas e moleculares, é ferramenta essencial em futuras avaliações sobre o risco em se utilizar esse

material como coadjuvante na agricultura.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Padronizar técnicas de concentração e detecção de vírus entéricos (métodos moleculares e cultivo celular) a partir de amostras de lodo de esgoto e avaliar a prevalência de AdV, HAV, PV e RV no lodo da ETE– Sistema Insular, de Florianópolis, SC.

3.2 Específicos

- Produzir e titular suspensões-estoques dos vírus utilizados no estudo.
- Padronizar o método de eluição e concentração viral a partir do lodo de esgoto autoclavado e semeado utilizando como modelo o AdV5.
- Avaliar diferentes protocolos de clarificação a partir do lodo de esgoto autoclavado e semeado utilizando como modelo o AdV5.
- Avaliar diferentes protocolos de extração do material genético viral a partir do lodo de esgoto autoclavado e semeado com concentrações conhecidas utilizando como modelo o AdV5 (genoma DNA) e o RV Símio SA11 (genoma RNA).
- Determinar o limite de sensibilidade de detecção viral a partir do protocolo de processamento, isolamento e purificação de material genético viral selecionado para detecção de:
 - AdV por PCR e nested PCR;
 - HAV por RT- nested PCR;
 - PV por RT-PCR;
 - RV por RT-PCR.
- Avaliar a citotoxicidade das amostras de lodo de esgoto previamente autoclavadas em células permissivas à infecção pelos vírus de interesse.
- Utilizar os protocolos padronizados para a detecção de AdV, HAV, PV e RV em amostras de campo coletadas de junho de 2007 a maio de 2008.
- Aplicar técnicas de ICC-PCR/ICC-nested PCR ou ICC-RT-(nested) PCR para verificar a viabilidade das partículas virais detectadas por técnicas moleculares nas amostras de campo.

- Quantificar e comparar a viabilidade dos AdV presentes nas amostras de campo através do ensaio de imunofluorescência indireta (IFI).
- Quantificar os AdV e o HAV presentes nas amostras de campo através da (RT)-PCR em tempo real.
- Distinguir os tipos entéricos, AdV40 e AdV41, dentre os AdV detectados em amostras de campo pelo método de PCR-RFLP.
- Avaliar a significância estatística dos resultados obtidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais Biológicos

4.1.1 Células

- Foram utilizadas células A549 originárias de carcinoma alveolar basal humano. Estas células são permissivas à infecção *in vitro* pelo AdV2 e foram gentilmente cedidas pela Professora Dr^a. Rosina Girones Llop do Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona (Espanha);
- Foram utilizadas células embrionárias FRHK-4 originárias de rim de macaco *Rhesus*. Estas células são permissivas à infecção *in vitro* pelo HAV e foram gentilmente cedidas pelo Dr. Keith Williams da *Macquarie University* (Austrália);
- Foram utilizadas células HEP-2 originárias de carcinoma de orofaringe humana. Estas células são permissivas à infecção *in vitro* pelo AdV5 e foram adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC), EUA;
- Foram utilizadas células epiteliais MA104 originárias de rim de macaco verde africano. Estas células são permissivas à infecção *in vitro* pelo RV e foram adquiridas do ATCC;
- Foram utilizados fibroblastos VERO (ATCC: CCL81) originários de rim do macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*). Estas células são permissivas à infecção *in vitro* pelo PV.

4.1.2 Vírus

Os vírus utilizados foram:

- AdV2 que foi gentilmente cedido pela Professora Dra. Rosina Girones Llop do Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona (Espanha);
- AdV5 que foi gentilmente cedido pela Professora Dr^a. Dolores U. Menhert do Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (USP);
- Cepa do HAV HAF 203 adaptada ao cultivo *in vitro* gentilmente cedida pela Dr^a. Ana Maria Coimbra Gaspar da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ);

- PV2 gentilmente cedido pelo setor de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (SP);
- RV Símio SA11 que foi gentilmente cedido pelo setor de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, SP.

4.1.3 Amostras de lodo de esgoto

A primeira etapa do trabalho envolveu as padronizações das metodologias de eluição, concentração viral e ensaios moleculares e de cultura celular. Para este processo, as amostras de lodo de esgoto foram previamente autoclavadas (STRAUB; PEPPER; GERBA, 1995) a 120°C por 30 min (BELGUITH; HASSEN; AOUNI, 2006), para garantir a inativação de partículas virais eventualmente presentes antes da semeadura em laboratório. As amostras de lodo de esgoto foram obtidas da CASAN, Sistema Insular, com autorização da mesma (Anexo A-Autorização de coleta de amostras na CASAN, ETE Insular) e após o processo de tratamento por lodo ativado sem a adição de polieletrólitos.

As amostras coletadas de junho de 2007 a maio de 2008 serviram como amostras de campo e foram estocadas a -80°C até a finalização das etapas de padronização.

4.2 Crescimento e manutenção das células

As células A549, FRHK-4, MA104 e Vero foram mantidas em garrafas de 75cm² contendo Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's (MEM) (Sigma), suplementado com 5% (volume-v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Gibco-BRL, Life Technologies do Brazil Ltda), antibióticos/antifúngico: penicilina G (100U/ml) e sulfato de estreptomicina (100µg/ml) /anfotericina B (0,025µg/ml) (Gibco-BRL). As células Hep-2 foram mantidas nas mesmas condições citadas acima, porém suplementadas com 1% (v/v) de SFB.

As células foram mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

4.3 Preparo das suspensões virais padrão

Para produção dos estoques virais, as células foram previamente cultivadas conforme descrito no item 4.2 e, ao atingirem uma monocamada confluenta, foram lavadas 2X com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2. A seguir, as células receberam 1 ml de um inóculo viral já existente (não quantificado). Somente os RV foram previamente tratados com tripsina 10µg/mL por 30 min a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 90 min, a fim de propiciar a adsorção das partículas virais à monocamada celular.

A seguir, o inóculo foi removido e as células suplementadas com meio para infecção. O meio de infecção para MA104 foi MEM suplementado com 5µg/mL de tripsina, 2% antibióticos/antifúngico e livre de soro. Para FRHK-4, o meio de manutenção consistia de MEM acrescido de 2% de SFB e 1% antibióticos/antifúngico. Já para as células Vero, era MEM com 5% SFB e 1% antibióticos/antifúngico. Para Hep-2, MEM suplementado com 1% SFB e 1% antibióticos/antifúngico. As células foram incubadas sob as mesmas condições acima mencionadas.

A replicação viral foi monitorada a cada 24h pela observação de ECP nas células infectadas utilizando-se um microscópio invertido, sendo que o controle negativo consistia de uma cultura não-infectada. Quando o percentual de destruição da monocamada atingiu 100%, as células foram congeladas a -80°C e degeladas a 37°C por três vezes, a fim de promover a lise da membrana celular de células ainda intactas pela infecção viral e liberar os vírus intracelulares.

A suspensão foi transferida para um tubo e centrifugada a 350 Xg por 20 min a 4°C, para remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi utilizado para novas infecções em células permissivas a fim de obter um estoque viral com alto título infeccioso. Isto foi observado pela diminuição no tempo de observação do ECP nas células infectadas. Quando esta meta foi atingida, os fluídos virais foram titulados, aliquotados e estocados a -80°C.

4.4 Determinação do título infeccioso viral

Alguns conceitos básicos devem ser considerados antes de se iniciar a descrição do método propriamente dito. Segundo Burlenson, Chambers e Wiedbrauk (1992):

- **Infeciosidade viral** é a capacidade que uma partícula viral possui de invadir uma célula e parasitá-la para se replicar;
- **Título** corresponde ao número de partículas virais por unidade de volume, capazes de infectar células permissivas;
- **ECP** é o conjunto de todas as lesões provocadas por uma partícula viral nas células onde ela se multiplica. A maioria dos vírus provoca modificações celulares específicas e fáceis de observar ao microscópio. O ECP do RV é caracterizado por células arredondadas e granulação. Eventualmente, as células se destacam, desintegrando a monocamada (WIEDBRAUK; SHERYL, 1992). O ECP do AdV e PV é caracterizado por arredondamento, aumento de volume citoplasmático e agrupamento das células em “cachos” (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 1996). O HAV cepa HAF 203 produz ECP mais lento e mais discreto.

O título infeccioso do estoque viral de AdV5 e PV2 produzido neste trabalho foi determinado através do método de contagem de placas de lise e o título infeccioso de HAV, AdV2 e do RV SA11 foi determinado através de IFI.

4.4.1 Método de contagem de placas de lise para titulação de AdV5 e PV2

A titulação ocorreu segundo Burlenson, Chambers e Wiedbrauk (1992) e Kingchington, Kangro e Jeffries (1995). Células (Hep-2 e Vero) permissivas a cada linhagem viral foram cultivadas na densidade de $2,0 \times 10^5$ células/ml em placas de 24 cavidades até atingirem confluência.

Após este período, o meio de cultivo de cada uma das 24 cavidades contendo a monocamada de células foi retirado e estas células foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Retirou-se o PBS e adicionou-se 250 µl das suspensões virais diluídas de forma seriada de 10^1 a 10^{-7} em MEM, além de um controle negativo que consistia apenas de MEM. As placas foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂, por 60 min. Após este período, o inóculo foi removido e adicionou-se 1 ml da seguinte solução em cada cavidade: MEM 2X e solução aquosa 1,5% de carboximetilcelulose na proporção de 1:1. As placas foram então incubadas por 24 h sob as mesmas condições. Após este período, o meio foi aspirado e as células fixadas e coradas pela adição de 250 µl do corante preto de naftaleno (Sigma) (0,1% de corante em solução aquosa a 5% de ácido acético (v/v), pH 2,3-2,5) durante 30 min à temperatura ambiente, sob agitação.

Em seguida, o corante foi aspirado e as células deixadas para secar. Para calcular o título foram escolhidas diluições que apresentavam menor número de focos de infecção, caracterizados por áreas claras de lise celular, chamadas de placas. Estas foram contadas com ajuda de microscópio estereoscópico.

Segundo Burlenson, Chambers e Wiedbrauk (1992), o título infeccioso é expresso através do número de unidades formadoras de placa (PFU)/ml e, portanto de partículas virais, já que teoricamente, cada placa é iniciada pela infecção de um único vírus. Sendo assim, o título viral foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Número de placas} \times \text{recíproca da diluição} \times \text{recíproca do volume em ml}$$

4.4.2 Método de IFI para titulação de Adv2, HAV e RV

As suspensões virais de Adv2, RV SA11 e HAV cepa HAF 203 foram tituladas através do método descrito por Barardi et al. (1998).

Células (A549, MA104 e FRHK-4) permissivas respectivamente a cada uma das linhagens virais acima foram cultivadas em meio de crescimento durante 24 h em câmaras de 8 poços (Lab Tek[®], NUNC), na densidade de $3,0 \times 10^5$ células/ml. Os fluidos virais foram diluídos seriadamente de 10^{-1} - 10^{-7} em meio de manutenção e 100 μ L de cada uma das diluições foi inoculado nos poços contendo as células em duplicata. Para as células MA104 a diluição seriada ocorreu em meio de manutenção na presença de 10 μ g/ml de tripsina. Os controles negativos consistiram somente de inoculação com PBS e, em seguida meio de manutenção, no caso da MA104 meio de manutenção contendo tripsina. Após adsorção viral por 90 min, o inóculo foi removido e 500 μ L de meio de manutenção foram adicionados, inclusive no controle celular (negativo). As células A549 ficaram sob incubação durante 3 dias a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂, MA104 ficaram sob incubação durante 24 h e FRHK-4 foram mantidas por sete dias sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera acima mencionadas.

Após a incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas 2X com PBS. Em seguida as células foram fixadas à câmara pela adição de 300 μ L de metanol gelado a -20°C e mantidas por 5 min à temperatura ambiente. As células foram então reidratadas pela adição de

300 μ L de PBS e inoculadas durante 30 min com 300 μ L de solução bloqueadora (PBS, soroalbumina bovina a 1% GibcoBRL e Tween-20 a 0,05% BIO-RAD), a fim de bloquear as reações inespecíficas.

A cada poço foram adicionados no caso da A549, 100 μ L do anticorpo antiadenovírus clone 20/11 (MAB8052), Millipore, diluído na razão 1:200 em solução bloqueadora. Para MA104 foram adicionados 100 μ L do sobrenadante de hibridoma contendo o anticorpo monoclonal Mab60 anti-VP7 do RV (SHAW et al., 1986), diluído na razão 1:4 em solução bloqueadora. Já para FRHK-4, foram adicionados 100 μ L anticorpo monoclonal MAB 8241 (Chemicon International Inc.), diluído 1:100 em solução bloqueadora. As células A549 foram incubadas por 60 min a 37°C. As células MA104 e FRHK-4 foram incubadas por 16 h a 4°C.

As células foram posteriormente lavadas três vezes com solução bloqueadora e incubadas por 15 min em temperatura ambiente com um anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) diluído a 1:100. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes com solução bloqueadora, secas à temperatura ambiente e montadas em solução de montagem [formalina 5%, NaCl 0,25M, DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano), pH 8.6, 2,5%]. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40). O título viral foi determinado através da contagem do número de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos (FFU)/ml.

4.5 Semeadura das amostras de lodo com vírus

As amostras de lodo de esgoto foram previamente autoclavadas a 120°C por 30 min (BELGUITH; HASSEN; AOUNI, 2006), para garantir a inativação de partículas virais eventualmente presentes antes da semeadura em laboratório. Posteriormente, ocorreu a semeadura de lodo de esgoto com diluições seriadas de base 10 de AdV5 ou HAV ou PV2 ou RV antes da etapa de eluição ou após a etapa de clarificação (controle positivo). Cada experimento foi realizado em quadruplicata. A estratégia de detecção viral está demonstrada na Figura 3.

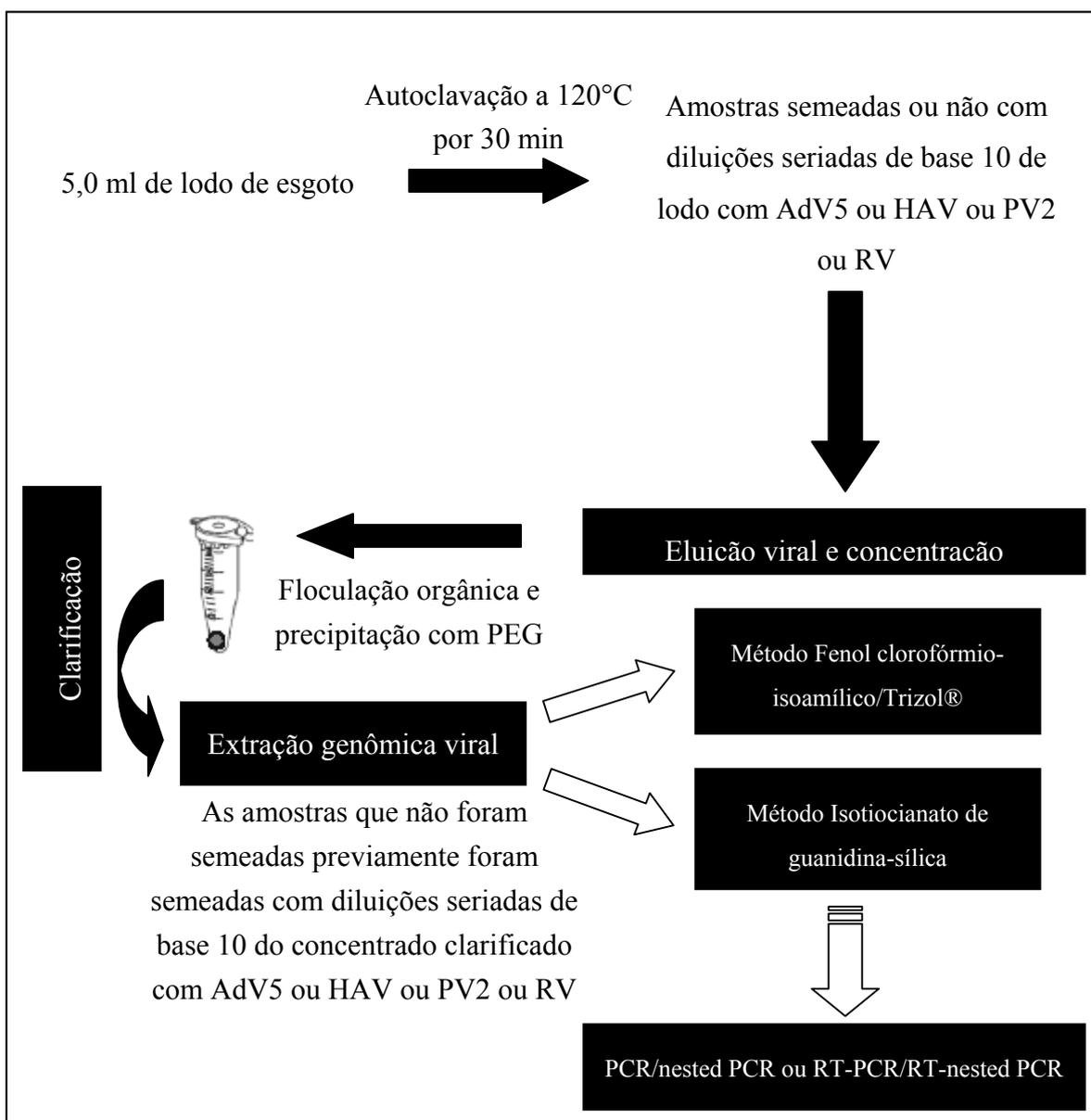


Figura 3. Diagrama esquemático descrevendo a estratégia de detecção de vírus entéricos em amostras de lodo de esgoto.

4.6 Processamento das amostras de lodo de esgoto pelo método de eluição e concentração viral

O método que foi utilizado para a eluição viral foi o recomendado EPA (EPA, 2003) com algumas modificações.

À amostra de lodo, 5,0 ml, foi adicionado 1% (v/v) de uma solução de cloreto de alumínio 0,05M e o pH foi ajustado a 3,5 com HCl 5M. A mistura foi homogeneizada por 30

min a 500 rotações por minuto (rpm). Depois foi centrifugada a 2.500 Xg por 15 min a 4°C. O sedimento foi suspenso em 15 ou 35 ml* de extrato de carne a 10% (LP029B, Oxoid) e o pH foi ajustado a 7,0. A mistura foi novamente homogeneizada por 30 min a 500 rpm e centrifugada a 10.000 Xg por 30 min a 4°C. O sobrenadante resultante deste processo foi aqui denominado “extrato”.

Posteriormente, foi realizada a concentração viral de acordo com a técnica descrita por Lewis e Metcalf (1988). O primeiro estágio de concentração utilizou a precipitação viral pelo uso do Polietileno glicol (PEG) 6000 que foi realizada pela adição de 8% de PEG 6000 (em PBS pH 7,2) ao extrato. Após agitação vigorosa e incubação por 2 ou 16 h* a 4°C, o extrato foi centrifugado a 10.000 Xg por 90 min a 4°C. O sedimento foi suspenso em 5,0 ml de PBS 0,1M pH 7,2 e foi denominado “concentrado”.

* Algumas alterações foram introduzidas com a finalidade de estabelecer quais as melhores condições para recuperação viral do lodo utilizado nesta padronização, que originou a metodologia final, posteriormente utilizada para as análises das amostras de campo.

4.6.1 Ensaios para padronização do processo de eluição e concentração viral

➤ Estabelecimento do volume mais adequado de eluente

Para verificar se o volume da solução protéica de extrato de carne a 10% (LP029B, Oxoid) influenciava o processo de eluição viral, foram realizados ensaios em quadruplicata com um volume de 5,0 ml de lodo autoclavado e inoculado com 500 µl de suspensão viral AdV5 contendo 7×10^6 PFU/ml. O volume de extrato de carne utilizado foi de 15 e 35 ml, ou seja, 3 e 7 vezes o volume inicial do lodo. Os procedimentos posteriores foram os descritos no item 4.6.

A taxa de recuperação foi avaliada por detecção molecular segundo descrito nos itens 4.8, 4.9 e 4.11.

➤ Avaliação do tempo de incubação adotada para concentração da amostra de lodo

Para verificar se o tempo de incubação empregado no processo de concentração da amostra influencia na recuperação das partículas virais foram realizados ensaios em quadruplicata utilizando dois tempos: 2 h e 16 h.

A amostra inicial foi 5,0 ml de lodo autoclavado e inoculado com 500 µl de suspensão

viral de AdV5 com 7×10^6 PFU/ml. Foram utilizadas amostras eluídas com 15 e 35 ml de extrato de carne a 10% (LP029B, Oxoid).

A taxa de recuperação também foi avaliada por detecção molecular segundo descrito nos itens 4.8, 4.9 e 4.11.

4.7 Clarificação das amostras de lodo de esgoto concentradas

Para a padronização foram testados dois métodos de clarificação. A clarificação tem como principal objetivo remover bactérias e fungos contidos na amostra. O primeiro método consistiu na adição de um terço de volume de clorofórmio à amostra. Depois ocorreu uma agitação vigorosa por 30 min a 4°C e centrifugação a 1.500 Xg por 10 min a 4°C. A fase orgânica foi removida e a fase aquosa foi denominada de “concentrado descontaminado” (MIGNOTE; MAUL; SCHWARTZBROD, 1999).

No segundo método descrito por Croci et al. (2007), após a concentração viral, a amostra foi centrifugada a 10.000 Xg por 10 min a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado 30% de clorofórmio. Depois ocorreu uma centrifugação a 10.000 Xg por 10 min a 4°C. A fase orgânica foi removida e a fase aquosa foi denominada de “concentrado descontaminado”.

A amostra inicial foi 5,0 ml de lodo autoclavado e inoculado com 500 µl de suspensão viral AdV5 com título de 7×10^6 PFU/ml.

4.8 Extração dos ácidos nucléicos a partir da suspensão viral e das amostras de lodo de esgoto concentradas

A extração dos ácidos nucléicos foi previamente padronizada. Os métodos que foram utilizados são:

Para a extração do DNA viral foram testados dois métodos:

- ✓ Extração Fenol-clorofórmio-isoamílico, de acordo com Sambrook e Russell (2001), com algumas modificações;
- ✓ Extração pelo método do Isotiocianato de guanidina-sílica, de acordo com Boom et al. (1990), com modificações.

Para a extração do RNA viral foram testados também dois métodos:

- ✓ Reagente Trizol®, de acordo com as especificações do fabricante (com modificações);
- ✓ Extração pelo método do Isotiocianato de guanidina-sílica, de acordo com Boom et al. (1990), com modificações.

Para avaliar a eficiência dos métodos de extração, foi utilizado AdV5 e RV como modelos de genoma de DNA e RNA, respectivamente. Depois o método mais sensível de extração de ácidos nucleicos foi aplicado para os demais vírus entéricos padronizados (HAV e PV2) bem como para as amostras de campo.

4.8.1 Extração dos ácidos nucleicos pelo método Fenol-clorofórmio-isoamílico

Alíquotas de 500 µl de amostra, foram tratadas com proteinase K a uma concentração final de 400 µg/ml juntamente com o tampão da enzima composto de Tris-HCl pH 7,5, dodecil sulfato de sódio (SDS) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a uma concentração final de 0,5% (peso-p/v) e 5 mM, respectivamente, por 60 min a 56°C. As amostras foram então tratadas com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) and NaCl a uma concentração final de 1,3% (p/v) e 0,6 M, respectivamente, e incubadas a 56° por 30 min. Após a incubação, foram acrescentados às amostras 700 µl de fenol equilibrado. Estas foram então agitadas e centrifugadas a 12.000 Xg por 10 min a 4°C. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e a este foi adicionado um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção 25:24:1. Estas foram agitadas por 30 s e centrifugadas como descrito acima. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e acrescida de 500 µl de clorofórmio a fim de retirar os traços de fenol restantes na amostra, agitada por 1 min e centrifugada como descrito acima. Para precipitação dos ácidos nucleicos, foram adicionados à fase aquosa 1 ml de isopropanol 100% por 10 min a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 Xg por 20 min a 4°C. A fase aquosa foi descartada e cada amostra foi acrescida de 2 volumes de etanol 70%, mantido a -20°C. Estas foram homogeneizadas levemente e centrifugadas a 12.000 Xg, durante 10 min, a 4°C. A fase aquosa foi novamente descartada, o tubo vertido sob papel absorvente e o DNA foi seco ao ar. Foram adicionados ao precipitado 50 µl de água Milli-Q autoclavada e o tubo foi estocado a -20°C até a utilização.

4.8.2 Extração dos ácidos nucléicos utilizando o reagente Trizol®

Alíquotas de 500 µl de amostra, foram tratadas com proteinase K a uma concentração final de 400 µg/ml juntamente com o tampão da enzima composto de Tris-HCl pH 7,5, SDS e EDTA a uma concentração final de 0,5% (p/v) e 5mM, respectivamente, por 60 min a 56°C. As amostras foram então tratadas com CTAB e NaCl a uma concentração final de 1,3% (p/v) e 0,6 M, respectivamente, e incubadas a 56° por 30 min. Em seguida, foi adicionado 500 µl de Trizol (Invitrogen *Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA). A lise celular foi obtida através da passagem da amostra várias vezes pela ponteira da pipeta. As amostras foram então mantidas à temperatura ambiente por 5min. Após a incubação, 400 µl de clorofórmio foi adicionado aos tubos, estes foram homogeneizados vigorosamente por 15 s e incubados por 15 min à temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 Xg a 4°C por 15 min. A fase orgânica contendo Trizol® foi desprezada e a fase aquosa transferida para outro tubo onde o ácido nucléico foi precipitado pela adição de 2 volumes de álcool isopropílico 100%. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 10min à temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000 Xg a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi desprezado por inversão, e ao precipitado foi adicionado 2 volumes de etanol 70% mantido a -20°C. As amostras foram centrifugadas como descrito acima. O sobrenadante foi novamente desprezado e o RNA seco ao ar. Em cada tubo foram adicionados 50 µl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Invitrogen *Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA). Os RNAs foram armazenados a -80°C até utilização.

4.8.3 Extração dos ácidos nucléicos pelo método do Isotiocianato de guanidina-sílica

Alíquotas de 400 µl de amostra, foram tratadas com proteinase K a uma concentração final de 400 µg/ml juntamente com o tampão da enzima composto de Tris-HCl pH 7,5, SDS e EDTA a uma concentração final de 0,5% (p/v) e 5 mM, respectivamente, por 60 min a 56°C. As amostras foram então tratadas com CTAB e NaCl a uma concentração final de 1,3% (p/v) e 0,6 M, respectivamente, e incubadas a 56° por 30 min. A seguir foi adicionado 800 µL de uma solução de lise L6 (5,25 M isotiocianato de guanidina (GuSCN), 50 mM Tris- HCl pH 6,4, 20 mM EDTA, 1,3% p/v Triton X-100). Após homogeneização vigorosa, a amostra foi

mantida à temperatura ambiente por 10 min. Subsequentemente, foram adicionados aos tubos 15 µL de sílica, homogeneizados vigorosamente e mantidos durante 20 min à temperatura ambiente sob agitação constante. Com este procedimento ocorre a lise celular seguida pela adesão dos ácidos nucleicos às partículas da sílica que ficarão na parte inferior do tubo.

A seguir, os tubos foram centrifugados a 12.000 Xg por 1 min e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 µL de uma solução de lavagem L2 (5,25 M GuSCN, 50 mM Tris-HCl pH 6,4), os tubos foram novamente agitados vigorosamente e centrifugados como anteriormente. Após o descarte do sobrenadante, as amostras foram lavadas com 500 µl de etanol 70% mantido a -20°C, centrifugadas novamente. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se as amostras com 500 µl de acetona. O mesmo procedimento de agitação e centrifugação foi realizado.

Os precipitados de sílica, onde ficaram aderidos os ácidos nucleicos, foram secos em banho-maria a 56°C com as tampas dos tubos abertas, a fim de permitir a total evaporação de traços de acetona. A sílica foi então suspensa em 60 µL de água tratada com DEPC (para RNA) ou Milli-Q autoclavada (para DNA). Os tubos foram gentilmente homogeneizados e incubados em banho-maria a 56°C por 15 min, com as tampas fechadas. Por fim, a amostra foi centrifugada a 12.000 Xg por 3 min e 45 µL do sobrenadante foi coletado (no qual estão presentes os ácidos nucleicos) e estocado a -80°C até utilização.

4.9 Determinação da ocorrência de AdV através da PCR ou pelo nested PCR

Os AdV foram detectados pelos protocolos de PCR e/ou nested-PCR descritos por Allard, Albinsson e Wadell (1992) e Puig et al. (1994), respectivamente. A reação da PCR foi realizada por meio da amplificação de sequências correspondentes à região que codifica a proteína *hexon*, extremamente conservada em todos os subgêneros de AdV. Os iniciadores externos hexAA1885 (5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3') e hexAA1913 (5'-CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT-3') utilizados flanqueiam um produto de 300 pb. Para a reação de nested-PCR utilizou-se os iniciadores internos nexAA1893 (5'-GCCACCGAGACGTACTIONTTCAGCCTG-3') e nexAA1905 (5'-TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC-3'), que serviram para confirmar e aumentar a sensibilidade de detecção viral. Estes iniciadores flanqueiam uma região de 142 pb no

genoma.

Primeiramente, os protocolos de PCR e/ou nested-PCR foram utilizados para a detecção do DNA dos AdV extraídos a partir das suspensões virais padrão; e em seguida para as amostras de lodo experimentalmente inoculadas e amostras de campo.

Cinco microlitros de DNA viral e 19 pmoles de cada iniciador foi adicionado a uma mistura de reação contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 0,2 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 1,5 mM MgCl₂ e 1U de Taq DNA polimerase (todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen *Life Technologies*, Carlsbad, CA,USA), em um volume final de 25 µl. A reação consistiu de 40 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturação), 56°C por 1 min (ligação) e 72°C por 45 s (extensão), com uma extensão final de 7 min a 72°C. Em todas as reações de PCR/nested PCR, RT-PCR/RT-nested PCR descritas a partir de agora, os controles negativos (água Milli-Q estéril para genoma de DNA e água tratada com DEPC para genoma RNA) e controles positivos (DNA de AdV ou RNA específicos dos vírus amplificados) foram utilizados nos experimentos.

Para nested PCR, 1 µl do produto de PCR foi adicionado a uma mistura de reação de 25 µl contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 0,2 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 1,5 mM MgCl₂; 20 pmoles de nexAA1893 e nexAA1905; 1U de Taq DNA polimerase (todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen *Life Technologies*, Carlsbad, CA,USA). A reação consistiu de 25 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturação), 57°C por 1 min (ligação) e 72°C por 45 s (extensão), com uma extensão final de 5 min a 72°C.

4.10 Determinação da ocorrência do HAV, PV e RV através da RT-PCR ou pela RT-nested PCR

O HAV foi detectado pelo protocolo de RT- nested PCR descrito por De Paula et al. (2004). Os iniciadores externos utilizados foram F6 (+) (5'-CTATTCAGATTGCAAATTAYAAT- 3') e F7 (-) (5'-AAYTTCATYATTTTCATGCTCCT- 3'), que amplificam um fragmento de 392 pb. Estes iniciadores amplificam todos os genotipos de HAV (iniciadores universais). Os iniciadores internos utilizados foram F8 (+) (5'-TATTTGTCTGTYACAGAACAATCAG- 3') e F9 (-) (5'-AGGRGGTGGAAAGYACTTCATTTGA- 3') que amplificam um fragmento de 247 pb.

A detecção de PV foi realizada utilizando o protocolo de RT-PCR descrito por Atmar

et al. (1993). Os iniciadores utilizados para os ensaios de RT-PCR foram Polio-R (5'-ACGGACACCCAAAGTA-3') e Polio-L (5'-AGCACTTCTGTTTCCC-3'), que amplificam um fragmento de 394 pb na região 5' não codificadora do genoma viral.

A detecção dos RV foi realizada utilizando os protocolos de RT-PCR descritos por Iturriza-Gómara et al. (2002). Os iniciadores utilizados para os ensaios foram VP6-F (+) (5'-GACGGVGCRACTACATGGT-3') e VP6-R (-) (5'-GTCCAATTCATNCCTGGTGG-3'), que amplificam um fragmento de 379 pb do gene que codifica a proteína VP6 do capsídeo interno do RV.

A transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando hexanucleotídeos randômicos adquiridos da Invitrogen *Life Technologies* (USA) que foram utilizados para síntese do DNA complementar (cDNA). Uma alíquota de 5,0 µl do RNA não diluído foi desnaturada a 99°C por 5 min e rapidamente resfriada em gelo por 2 min. O RNA desnaturado foi adicionado à mistura da reação. Esta mistura continha iniciador randômico; 50 mM Tris-HCl pH 8,4; 75 mM KCl; 0,5 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 20U de inibidor de RNase e 100U de transcriptase reversa M-MLV (todos os reagentes foram obtidos da Invitrogen *Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), em um volume de 25 µL. A RT do RNA genômico viral foi realizada a 37°C por 60 min.

Para a reação de amplificação gênica (PCR) do HAV, 5 µl de cDNA e 15 pmoles de cada iniciador (F6 e F7) foram adicionados à mistura da reação que consistia de 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 0,4 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 3,0 mM MgCl₂ e 0,5U de Taq DNA polimerase (todos os reagentes foram obtidos da Invitrogen *Life Technologies*), em um volume de 25 µL. A amplificação foi realizada com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida por 30 ciclos de 94°C por 30 s, 40°C por 30 s e 72°C por 1 min, e uma extensão final a 72°C por 7 min. Nested PCR foi realizada com 1 µl do produto de PCR adicionado a uma mistura de reação de 25 µl contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 0,4 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 3,0 mM MgCl₂; 15 pmoles de F8 e F9; 0,5U de Taq DNA polimerase (todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen *Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA). A amplificação da nested PCR ocorreu nas mesmas condições anteriormente citadas (somente alterando-se a temperatura de anelamento para 48°C).

Para PV, 5 µl de cDNA e 20 pmoles de cada iniciador (Polio-R e Polio-L) foram adicionados à mistura de reação que consistiu de 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 0,2 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 2,0 mM MgCl₂ e 1U de Taq DNA polimerase, em um volume de 25 µL. A amplificação foi realizada com uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, e uma

extensão final a 72°C por 7 min.

Para RV, 5 µl de cDNA e 26 pmoles de cada iniciador (VP6-F e VP6-R) foram adicionados à mistura de reação que consistiu de 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 0,2 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 2,0 mM MgCl₂ e 0,5U de Taq DNA polimerase, em um volume de 25 µL. A amplificação foi realizada com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 30 s e 72°C por 1 min, e uma extensão final a 72°C por 7 min.

4.11 Visualização dos produtos amplificados

Os fragmentos amplificados (10µl da mistura final de reação) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TBE 1X (Tris-HCl 0,09 M; ácido bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O marcador de peso molecular 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen *Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA) foi aplicado a cada conjunto de amostras, a fim de definir o peso molecular dos fragmentos encontrados.

Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (Sigma) a 1µg/mL. Os produtos de amplificação foram visualizados através da exposição à UV, no transiluminador UV (Pharmacia Biotech®) e fotografados com o sistema de fotodocumentação Kodak® Image System.

4.12 Determinação da sensibilidade de detecção viral pela reação de PCR/nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR

Este ensaio teve como objetivo determinar a sensibilidade das reações de PCR/nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR para a detecção dos vírus entéricos presentes nas amostras de lodo de esgoto experimentalmente inoculadas com as suspensões virais padrão.

4.12.1 Amostras de lodo de esgoto experimentalmente inoculadas após a etapa de clarificação (controles positivos)

Este ensaio teve por objetivo determinar a sensibilidade dessas reações na detecção dos genomas virais para verificar a mínima quantidade de partículas virais detectadas nas amostras de lodo definindo, conseqüentemente, o protocolo mais sensível a ser aplicado nos ensaios subseqüentes. Foram realizadas diluições seriadas de base 10 (10^{-1} a 10^{-15}) das suspensões virais em amostras de lodo de esgoto previamente autoclavadas para posterior semeadura do lodo e detecção através dos ensaios de PCR/nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR. As concentrações dos vírus padrões, nas respectivas diluições, estão mostradas nas Tabelas 1 e 2.

O DNA/RNA viral das diluições foi extraído através do método descrito no item 4.8 e realizou-se a reação de amplificação gênica segundo descrito nos itens 4.9 ou 4.10.

Tabela 1. Diluições das suspensões virais padrão (RV, HAV e PV2) em amostras de lodo de esgoto autoclavado após a etapa de clarificação e suas respectivas concentrações.

<i>Diluições das suspensões virais padrão</i>	<i>RV</i>		<i>HAV</i>	<i>PV2</i>
	<i>Concentração em FFU</i>		<i>Concentração em FFU</i>	<i>Concentração em PFU</i>
	Trizol®*	Isotiocianato de guanidina-sílica*	Trizol®*	Trizol®*
Puro	2,16x10 ⁴	1,73x10 ⁴	7,2x10 ¹	1,88x10 ³
10 ⁻¹	2,16x10 ³	1,73x10 ³	7,2	1,88x10 ²
10 ⁻²	2,16x10 ²	1,73x10 ²	7,2x10 ⁻¹	1,88x10 ¹
10 ⁻³	2,16x10 ¹	1,73x10 ¹	7,2x10 ⁻²	1,88
10 ⁻⁴	2,16	1,73	7,2x10 ⁻³	1,88x10 ⁻¹
10 ⁻⁵	2,16x10 ⁻¹	1,73x10 ⁻¹	7,2x10 ⁻⁴	1,88x10 ⁻²
10 ⁻⁶	2,16x10 ⁻²	1,73x10 ⁻²	7,2x10 ⁻⁵	1,88x10 ⁻³
10 ⁻⁷	2,16x10 ⁻³	1,73x10 ⁻³	7,2x10 ⁻⁶	1,88x10 ⁻⁴
10 ⁻⁸	2,16x10 ⁻⁴	1,73x10 ⁻⁴	7,2x10 ⁻⁷	1,88x10 ⁻⁵
10 ⁻⁹	2,16x10 ⁻⁵	1,73x10 ⁻⁵	7,2x10 ⁻⁸	1,88x10 ⁻⁶
10 ⁻¹⁰	2,16x10 ⁻⁶	1,73x10 ⁻⁶	7,2x10 ⁻⁹	1,88x10 ⁻⁷
10 ⁻¹¹	2,16x10 ⁻⁷	1,73x10 ⁻⁷	7,2x10 ⁻¹⁰	1,88x10 ⁻⁸
10 ⁻¹²	2,16x10 ⁻⁸	1,73x10 ⁻⁸	7,2x10 ⁻¹¹	1,88x10 ⁻⁹
10 ⁻¹³	2,16x10 ⁻⁹	1,73x10 ⁻⁹	7,2x10 ⁻¹²	1,88x10 ⁻¹⁰
10 ⁻¹⁴	2,16x10 ⁻¹⁰	1,73x10 ⁻¹⁰	7,2x10 ⁻¹³	1,88x10 ⁻¹¹
10 ⁻¹⁵	2,16x10 ⁻¹¹	1,73x10 ⁻¹¹	7,2x10 ⁻¹⁴	1,88x10 ⁻¹²

* Método de extração dos ácidos nucleicos como descrito no item 4.8.

Tabela 2. Diluições da suspensão viral padrão (AdV5) em amostras de lodo de esgoto após a etapa de clarificação e suas respectivas concentrações.

<i>Diluições das suspensões virais padrão</i>	<i>AdV5</i>			
	<i>Concentração em PFU</i>			
	<i>Fenol-clorofórmio-isoamílico*</i>		<i>Isotiocianato de guanidina-sílica*</i>	
	<i>PCR**</i>	<i>Nested PCR**</i>	<i>PCR**</i>	<i>Nested PCR**</i>
Puro	1,26x10 ⁴	2,1 x10 ³	1,0x10 ⁴	1,68 x 10 ³
10 ⁻¹	1,26x10 ³	2,1 x10 ²	1,0x10 ³	1,68 x 10 ²
10 ⁻²	1,26x10 ²	2,1 x10 ¹	1,0x10 ²	1,68 x 10 ¹
10 ⁻³	1,26x10 ¹	2,1	1,0x10 ¹	1,68
10 ⁻⁴	1,26	2,1 x10 ⁻¹	1,0	1,68 x 10 ⁻¹
10 ⁻⁵	1,26x10 ⁻¹	2,1x10 ⁻²	1,0x10 ⁻¹	1,68 x 10 ⁻²
10 ⁻⁶	1,26x10 ⁻²	2,1 x10 ⁻³	1,0x10 ⁻²	1,68 x 10 ⁻³
10 ⁻⁷	1,26x10 ⁻³	2,1 x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻³	1,68 x 10 ⁻⁴
10 ⁻⁸	1,26x10 ⁻⁴	2,1 x10 ⁻⁵	1,0x10 ⁻⁴	1,68 x 10 ⁻⁵
10 ⁻⁹	1,26x10 ⁻⁵	2,1 x10 ⁻⁶	1,0x10 ⁻⁵	1,68 x 10 ⁻⁶
10 ⁻¹⁰	1,26x10 ⁻⁶	2,1 x10 ⁻⁷	1,0x10 ⁻⁶	1,68 x 10 ⁻⁷
10 ⁻¹¹	1,26x10 ⁻⁷	2,1 x10 ⁻⁸	1,0x10 ⁻⁷	1,68 x 10 ⁻⁸
10 ⁻¹²	1,26x10 ⁻⁸	2,1 x10 ⁻⁹	1,0x10 ⁻⁸	1,68 x 10 ⁻⁹
10 ⁻¹³	1,26x10 ⁻⁹	2,1 x10 ⁻¹⁰	1,0x10 ⁻⁹	1,68 x 10 ⁻¹⁰
10 ⁻¹⁴	1,26x10 ⁻¹⁰	2,1 x10 ⁻¹¹	1,0x10 ⁻¹⁰	1,68 x 10 ⁻¹¹
10 ⁻¹⁵	1,26x10 ⁻¹¹	2,1 x10 ⁻¹²	1,0x10 ⁻¹¹	1,68 x 10 ⁻¹²

* Método de extração dos ácidos nucleicos como descrito no item 4.8. ** Reação de amplificação gênica segundo descrito no item 4.9.

4.12.2 Amostras de lodo de esgoto experimentalmente inoculadas antes do processo de eluição viral

Este ensaio teve por objetivo determinar a sensibilidade dessas reações para verificar a mínima quantidade de partículas virais detectadas nas amostras de lodo de esgoto experimentalmente inoculadas e definir, conseqüentemente, o melhor protocolo a ser utilizado

nos ensaios subsequentes. Foram realizadas diluições seriadas na base 10 (10^{-1} a 10^{-15}) das suspensões virais em PBS que foram inoculadas no lodo de esgoto previamente autoclavado para posterior detecção através dos ensaios de PCR/nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR. As concentrações virais destas amostras de lodo em suas respectivas diluições estão mostradas na Tabela 3 e 4.

O DNA/RNA viral das diluições foi eluído, concentrado e clarificado segundo o método já padronizado descrito nos itens 4.6 e 4.7. A extração viral ocorreu através do método descrito no item 4.8 e realizou-se a reação de amplificação gênica segundo descrito nos itens 4.9 ou 4.10.

Tabela 3. Diluições das amostras de lodo de esgoto previamente inoculadas com RV, HAV e PV2 antes do processo de eluição viral e suas respectivas concentrações.

<i>Diluições das suspensões virais padrão</i>	<i>RV</i>		<i>HAV</i>	<i>PV2</i>
	<i>Concentração em FFU</i>		<i>Concentração em FFU</i>	<i>Concentração em PFU</i>
	Trizol®*	Isotiocianato de guanidina-sílica*	Trizol®*	Trizol®*
Puro	$2,4 \times 10^3$	$1,92 \times 10^3$	7,2	$1,88 \times 10^2$
10^{-1}	$2,4 \times 10^2$	$1,92 \times 10^2$	$7,2 \times 10^{-1}$	$1,88 \times 10^1$
10^{-2}	$2,4 \times 10^1$	$1,92 \times 10^1$	$7,2 \times 10^{-2}$	1,88
10^{-3}	2,4	1,92	$7,2 \times 10^{-3}$	$1,88 \times 10^{-1}$
10^{-4}	$2,4 \times 10^{-1}$	$1,92 \times 10^{-1}$	$7,2 \times 10^{-4}$	$1,88 \times 10^{-2}$
10^{-5}	$2,4 \times 10^{-2}$	$1,92 \times 10^{-2}$	$7,2 \times 10^{-5}$	$1,88 \times 10^{-3}$
10^{-6}	$2,4 \times 10^{-3}$	$1,92 \times 10^{-3}$	$7,2 \times 10^{-6}$	$1,88 \times 10^{-4}$
10^{-7}	$2,4 \times 10^{-4}$	$1,92 \times 10^{-4}$	$7,2 \times 10^{-7}$	$1,88 \times 10^{-5}$
10^{-8}	$2,4 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-5}$	$7,2 \times 10^{-8}$	$1,88 \times 10^{-6}$
10^{-9}	$2,4 \times 10^{-6}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$7,2 \times 10^{-9}$	$1,88 \times 10^{-7}$
10^{-10}	$2,4 \times 10^{-7}$	$1,92 \times 10^{-7}$	$7,2 \times 10^{-10}$	$1,88 \times 10^{-8}$
10^{-11}	$2,4 \times 10^{-8}$	$1,92 \times 10^{-8}$	$7,2 \times 10^{-11}$	$1,88 \times 10^{-9}$
10^{-12}	$2,4 \times 10^{-9}$	$1,92 \times 10^{-9}$	$7,2 \times 10^{-12}$	$1,88 \times 10^{-10}$
10^{-13}	$2,4 \times 10^{-10}$	$1,92 \times 10^{-10}$	$7,2 \times 10^{-13}$	$1,88 \times 10^{-11}$
10^{-14}	$2,4 \times 10^{-11}$	$1,92 \times 10^{-11}$	$7,2 \times 10^{-14}$	$1,88 \times 10^{-12}$
10^{-15}	$2,4 \times 10^{-12}$	$1,92 \times 10^{-12}$	$7,2 \times 10^{-15}$	$1,88 \times 10^{-13}$

* Método de extração dos ácidos nucléicos como descrito no item 4.8.

Tabela 4. Diluições das amostras de lodo de esgoto previamente inoculadas com AdV5 antes do processo de eluição viral e suas respectivas concentrações.

<i>Diluições das suspensões virais padrão</i>	<i>AdV5</i>			
	<i>Concentração em PFU</i>			
	<i>Fenol-clorofórmio-isoamílico*</i>		<i>Isotiocianato de guanidina-sílica*</i>	
	<i>PCR**</i>	<i>Nested PCR**</i>	<i>PCR**</i>	<i>Nested PCR**</i>
Puro	$6,3 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$	$5,6 \times 10^3$	$1,68 \times 10^2$
10^{-1}	$6,3 \times 10^2$	$2,1 \times 10^1$	$5,6 \times 10^2$	$1,68 \times 10^1$
10^{-2}	$6,3 \times 10^1$	2,1	$5,6 \times 10^1$	1,68
10^{-3}	6,3	$2,1 \times 10^{-1}$	5,6	$1,68 \times 10^{-1}$
10^{-4}	$6,3 \times 10^{-1}$	$2,1 \times 10^{-2}$	$5,6 \times 10^{-1}$	$1,68 \times 10^{-2}$
10^{-5}	$6,3 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-3}$	$5,6 \times 10^{-2}$	$1,68 \times 10^{-3}$
10^{-6}	$6,3 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-3}$	$1,68 \times 10^{-4}$
10^{-7}	$6,3 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-5}$	$5,6 \times 10^{-4}$	$1,68 \times 10^{-5}$
10^{-8}	$6,3 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-6}$	$5,6 \times 10^{-5}$	$1,68 \times 10^{-6}$
10^{-9}	$6,3 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-7}$	$5,6 \times 10^{-6}$	$1,68 \times 10^{-7}$
10^{-10}	$6,3 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-8}$	$5,6 \times 10^{-7}$	$1,68 \times 10^{-8}$
10^{-11}	$6,3 \times 10^{-8}$	$2,1 \times 10^{-9}$	$5,6 \times 10^{-8}$	$1,68 \times 10^{-9}$
10^{-12}	$6,3 \times 10^{-9}$	$2,1 \times 10^{-10}$	$5,6 \times 10^{-9}$	$1,68 \times 10^{-10}$
10^{-13}	$6,3 \times 10^{-10}$	$2,1 \times 10^{-11}$	$5,6 \times 10^{-10}$	$1,68 \times 10^{-11}$
10^{-14}	$6,3 \times 10^{-11}$	$2,1 \times 10^{-12}$	$5,6 \times 10^{-11}$	$1,68 \times 10^{-12}$
10^{-15}	$6,3 \times 10^{-12}$	$2,1 \times 10^{-13}$	$5,6 \times 10^{-12}$	$1,68 \times 10^{-13}$

*Método de extração dos ácidos nucleicos a partir das amostras de lodo de esgoto como descrito no item 4.8.**

Reação de amplificação gênica segundo descrito no item 4.9.

4.13 Avaliação da citotoxicidade das amostras de lodo de esgoto previamente autoclavadas

Este ensaio teve como objetivo estabelecer a diluição na qual o lodo concentrado não apresenta toxicidade para as células permissivas aos vírus de interesse. Esta diluição serviu como referência para os ensaios envolvendo a inoculação das amostras de lodo contendo vírus

em células cultivadas *in vitro*, e subsequentemente submetidas a RT-PCR/RT-nested PCR e PCR/nested PCR. Foram utilizadas amostras de lodo de esgoto autoclavadas e livres de patógenos (resultados confirmados por amplificação gênica) a fim de que as alterações observadas nas células fossem exclusivamente devido ao efeito dos componentes do lodo.

Células permissivas a cada linhagem viral foram cultivadas na densidade de $2,0 \times 10^5$ células/ml em placas de 24 cavidades até atingirem confluência. Após este período, o meio de cultivo de cada uma das 24 cavidades contendo a monocamada de células foi retirado e estas células foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Retirou-se o PBS e adicionou-se 250µL das amostras concentradas de lodo de esgoto (amostras negativas para os vírus de interesse) diluídas em MEM em diluições de base 2 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), além de uma amostra concentrada de lodo de esgoto sem nenhuma diluição (também negativa para os vírus de interesse).

Previamente cada amostra foi tratada com antibióticos/antifúngico: penicilina G (100U/ml) e sulfato de estreptomicina (100µg/ml)/anfotericina B (0,025µg/ml) (Gibco-BRL). Além disso, para as células MA104 as amostras foram previamente tratadas com tripsina 10µg/mL por 30 min a 37°C e 5% de CO₂. As placas foram então mantidas a 37°C, 5% de CO₂, com homogeneização a cada 15 min. Após 90 min, as amostras foram aspiradas e adicionou-se às células meio de manutenção de acordo com o tipo celular.

Para as células A549 e FRHK-4, o meio de manutenção consistia de MEM acrescido de 2% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngico. Já para as células Vero, consistia de MEM com 5% SFB e 1% antibióticos/antifúngico. E por fim, para MA104 utilizou-se MEM suplementado com 5µg/mL de tripsina, 2% antibióticos/antifúngico e livre de soro.

As placas foram incubadas nas condições acima citadas durante um período de 48 h para MA104, 72 h para A549 e Vero e 7 dias para FRHK-4. Ao final do período estipulado para cada linhagem celular, as placas foram observadas ao microscópio invertido, com a finalidade de identificar possíveis alterações morfológicas celulares (ECP) provocadas pelas amostras testadas, comparando com os controles celulares (contendo apenas células e meio de manutenção). A integridade das células foi confirmada adicionando-se a cada cavidade 250 µl do corante preto de naftaleno. As placas foram homogeneizadas por 30 min e secas para confirmação das observações.

Definido o limite de citotoxicidade, sabia-se que os efeitos citopáticos observados nas células durante os experimentos de inoculação das amostras de campo de lodo de esgoto que foram positivas para os vírus de interesse, eram devido à infecção por vírus viáveis contidos

nestas amostras e não devido à possível toxicidade destes concentrados.

4.14 Verificação da viabilidade das partículas virais recuperadas através do ensaio de ICC-PCR/ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR em amostras de lodo de esgoto

O mesmo procedimento descrito no item 4.13 foi utilizado, agora com as amostras de lodo em diluições não citotóxicas contaminadas (artificialmente ou não) pelos vírus entéricos.

Tal procedimento foi realizado com todas as amostras de campo a fim de, além de verificar a viabilidade das amostras positivas por técnicas moleculares, verificar se ocorria ou não um aumento da sensibilidade utilizando este método. As placas contendo as monocamadas celulares semeadas com amostras de lodo foram mantidas por 90 min a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, com homogeneização a cada 15 min. Após, os inóculos foram aspirados e as células foram novamente lavadas com PBS 1X, a fim de eliminar partículas virais não infecciosas que não penetraram nas células e permaneceram no sobrenadante. Após, adicionou-se meio de manutenção conforme descrito no item 4.13 e as placas foram mantidas sob as mesmas condições descritas no item 4.13.

Ao final deste período, as placas foram retiradas da estufa e passaram por 3 ciclos de congelamento e descongelamento conforme já descrito. Em seguida, uma alíquota do sobrenadante foi utilizado para extração do material genético e reação de amplificação gênica, conforme descrito nos itens 4.8 ou 4.10 e 4.11. Deste modo, pode-se determinar um limite de detecção viral confiável, uma vez que a presença dos vírus demonstra sua viabilidade em cultura celular.

4.15 Ensaio de IFI para quantificação de AdV

A técnica de IFI descrita no item 4.4.2 também foi utilizada para atestar a viabilidade dos AdV detectados molecularmente nas amostras de lodo.

Além disso, o mesmo procedimento foi realizado com o fluído viral de AdV2 que foi diluído seriadamente de 10⁻¹ a 10⁻⁷ em amostras de lodo de esgoto autoclavada e 100 µL de cada uma das diluições foi inoculado nos poços contendo as células em duplicata, a fim de

observar se a amostra de lodo de esgoto era capaz de inibir a replicação viral dos AdV nas células A549 (controle positivo das reações).

4.16 Caracterização dos AdV utilizando método PCR-RFLP

Os produtos amplificados com os iniciadores hexAA1885 e hexAA1913, foram digeridos com a endonuclease TaqI (Promega®) para a caracterização dos AdV pertencentes ao subgênero entérico F (ALLARD; KAJON; WADELL, 1994). Diferentemente dos outros AdV, os produtos amplificados dos AdV 40 e 41, possuem um sítio de clivagem para esta enzima e, ao serem submetidos à digestão com esta endonuclease, geram dois fragmentos (110 pb e 190 pb).

Alíquotas de 10 µl foram digeridas com a endonuclease TaqI, em condições ótimas de salinidade e temperatura, segundo as instruções do fabricante.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e corados com brometo de etídio a 1µg/mL. A presença de bandas foi evidenciada após exposição à luz UV.

4.17 PCR em tempo real para quantificação de AdV viáveis

As amostras que foram submetidas ao ensaio descrito no item 4.14 e apresentaram partículas virais de AdV viáveis foram quantificadas por PCR em tempo real conforme descrito por Hernroth et al. (2002). Estas foram extraídas conforme descrito no item 4.8.

A amplificação foi feita com o Kit Taqman Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) que contém a maioria dos reativos indispensáveis para a reação de PCR em tempo real, sendo necessário apenas a adição dos iniciadores, da sonda Taqman e das amostras que foram amplificadas.

Iniciadores, que flanqueiam uma região gênica conservada a todos os AdV foram utilizados: ADF (5'CWATACATGCACATCKCSGG3') e ADR (5'CRCGGGCRAAYTGCACCAG 3') com a seguinte sonda: ADP1 (5'-FAM – CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA-3'). Preparou-se a reação (sempre em uma sala livre de DNA) contendo a mistura do Kit (2X concentrada), sendo, portanto

adicionada em um volume igual à metade do volume final de reação. Preparou-se para cada tubo de reação um volume final de 25 μL contendo 12,5 μL de mistura de reação 2X concentrada, 1,0 μL de iniciador ADF (0,9 μM), 1,0 μL de iniciador ADR (0,9 μM) e 0,5 μL de sonda ADP1 (0,225 μM). Os ensaios foram realizados em duplicatas sempre com controle negativo onde o DNA não foi adicionado. Na mesma sala livre de DNA esta mistura foi distribuída em cada cavidade da placa de 96 poços. Transportou-se a placa para uma área onde se manipula DNA derivado de plasmídeos, e então adicionou-se os DNAs em cada uma das cavidades previamente estipuladas. A placa foi devidamente selada com papel transparente e colocada em um sistema detector de sequências ABI 7500 (*Applied Biosystems*). A reação consistiu de 2 min a 50°C seguida por 10 min a 95°C e 45 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. A curva padrão foi gerada utilizando diluições seriadas (10^1 a 10^7) do plasmídeo linearizado com a enzima de restrição Bam H1. Este clone foi gentilmente cedido pela Professora Dra. Rosina Girones Llop do Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona (Espanha). A quantidade de DNA foi definida como a média das duplicatas (com 2 réplicas) calculada pelo software e baseada na correlação com o valor do ponto inicial do ciclo (Ct) da curva padrão.

4.18 RT-PCR em tempo real para quantificação dos HAV viáveis

As amostras que foram submetidas ao ensaio descrito no item 4.14 e apresentaram partículas virais de HAV viáveis foram quantificadas por RT-PCR em tempo real. Estas foram extraídas conforme descrito no item 4.8.

A amplificação foi feita com o Kit Quantitect® Probe RT-PCR (QIAGEN) que é utilizado para fazer a RT e a PCR em uma única reação. Contém a maioria dos reativos indispensáveis para a reação de RT-PCR em tempo real, sendo necessária apenas a adição dos iniciadores, da sonda Taqman e das amostras que foram amplificadas.

Para o HAV os seguintes iniciadores foram utilizados: HAVF (5'GGTAGGCTACGGGTGAAAC3') e HAVR (5'GCGGATATTGGTGAGTTGTT3') com a seguinte sonda: HAVP (5'CTTAGGCTAATACTTTATGAAGAGATGC3'), cujos iniciadores flanqueiam a seguinte região gênica: 392-461 (69 pb de produto gênico) (JOTHIKUMAR et al., 2005). Preparou-se a reação (sempre em uma sala livre de DNA) contendo a mistura do Kit (sempre vem 2X concentrada, sendo, portanto adicionada em um

volume igual à metade do volume final de reação). Preparou-se para cada tubo de reação um volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de mistura de reação 2X concentrada, 0,25 µL de iniciador HAVF (0,25 µM), 0,25 µL de iniciador HAVR (0,25 µM) e 0,5 µL de sonda HAVP (0,15 µM). No caso da curva padrão utilizada em todas as análises não foi adicionado a enzima transcriptase reversa, apenas nas amostras adicionou-se 0,25 µL. Para completar o volume final da reação adicionou-se água livre de DNAses e RNAses. Os ensaios foram realizados em duplicatas sempre com controle negativo onde o RNA não foi adicionado. Na mesma sala livre de DNA esta mistura foi distribuída em cada cavidade da placa de 96 poços. Transportou-se a placa para uma área onde se manipula DNA derivado de plasmídeos, e então adicionou-se os RNAs em cada uma das cavidades previamente estipuladas. A placa foi devidamente selada com papel transparente e colocada em um sistema detector de sequências ABI 7500 (*Applied Biosystems*). A reação consistiu de RT por 30 min a 50°C seguida por desnaturação por 15 min a 95°C e 45 ciclos de amplificação a 95°C por 10 s (desnaturação), 55°C por 20 s (anelamento) e 72°C por 15 s (extensão). A curva padrão foi gerada utilizando diluições seriadas (10^1 a 10^7) correspondendo às seguintes quantidades do plasmídeo ($5,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^4$) linearizado com a enzima de restrição BSA A1. Este clone foi gentilmente cedido pela Professora Dra. Rosina Girones Llop do Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona (Espanha). A quantidade de RNA foi definida como a média das duplicatas (com 2 réplicas) calculada pelo software e baseada na correlação com o valor Ct da curva padrão.

4.19 Detecção de vírus entéricos presentes em amostra de lodo de esgoto (estudo de campo)

Amostras de lodo de esgoto foram coletadas mensalmente durante o período de um ano (junho de 2007 a maio de 2008) na ETE-CASAN, Sistema Insular, de Florianópolis; totalizando 12 amostras.

As amostras foram coletadas em um volume de 100 ml. No laboratório, 5,0 ml dessas amostras foram eluídas, concentradas e clarificadas como descrito nos itens 4.6 e 4.7. Posteriormente, estas amostras já concentradas e clarificadas passaram por uma extração do material genético e detecção dos vírus entéricos preconizados por nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR conforme descrito nos itens 4.8, 4.9 ou 4.10 e 4.11. Além disso, foram

realizados ensaios de ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR como descrito no item 4.14.

Posteriormente, as amostras que foram positivas para o AdV pelo método descrito nos itens 4.8, 4.9 e 4.11 foram digeridas pelo método PCR-RFLP descrito no item 4.16. As que foram positivas pelo método descrito no item 4.14 foram quantificadas pelo ensaio de IFI descrito no item 4.15 e por PCR em tempo real conforme descrito no item 4.17.

As amostras positivas para o genoma do HAV pelo método descrito no item 4.14 foram quantificadas por RT-PCR em tempo real descrito no item 4.18.

4.20 Cálculo da eficiência de recuperação viral

A eficiência de recuperação viral nas amostras de lodo de esgoto foi calculada conforme a fórmula abaixo.

$$\text{Eficiência de recuperação viral (\%)} = \frac{\text{Amostra semeada depois do processo de clarificação}}{\text{Amostra semeada antes do processo de eluição}} \times 100.$$

4.21 Análise estatística

O teste exato de Fischer foi aplicado para comparar duas proporções, com um nível de significância $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad InStat software 2003, versão 3.06 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Titulação viral

Utilizando o método de formação de placas de lise, foi determinado o título de $7,0 \times 10^6$ PFU/ml para AdV5 e $4,7 \times 10^5$ PFU/ml para PV2 (Tabela 5).

O título do fluido infeccioso do AdV2, HAV cepa HAF 203 e do RV símio SA11 foi determinado através da contagem do número de células fluorescentes na maior diluição viral. Tal procedimento permitiu determinar o título viral que foi de $4,5 \times 10^5$ FFU/ml para HAV; $6,0 \times 10^6$ FFU/ml para RV e $6,4 \times 10^9$ FFU/ml para AdV2 (Tabela 5).

Tabela 5. Titulação viral pelos métodos de contagem de placas de lise e IFI.

	<i>Contagem de placas de lise (PFU/ml)</i>	<i>IFI (FFU/ml)</i>
AdV2		$6,4 \times 10^9$
AdV5	$7,0 \times 10^6$	
HAV		$4,5 \times 10^5$
PV2	$4,7 \times 10^5$	
RV símio SA11		$6,0 \times 10^6$

5.2 Padronização do processo de eluição e concentração viral

Foi testado o volume da solução protéica de extrato de carne a 10% (LP029B, Oxoid) utilizado na eluição viral e o tempo de incubação empregado no processo de concentração da amostra. A taxa de recuperação foi avaliada por detecção molecular utilizando dois métodos de extração dos ácidos nucléicos: fenol-clorofórmio-isoamílico, de acordo com Sambrook e Russell (2001), com algumas modificações e extração pelo método do isotiocianato de guanidina-sílica, de acordo com Boom et al. (1990), com modificações. Os resultados com as respectivas porcentagens de recuperação encontram-se nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Resultados dos ensaios de padronização do processo de eluição (utilizando 15 ml de extrato de carne e 5,0 ml de lodo) e concentração viral do lodo semeado experimentalmente com AdV5.

<i>Tempo de incubação adotada para concentração da amostra de lodo</i>	<i>Proporção de extrato de carne: lodo (v/v) 3:1</i>					
	Fenol-clorofórmio-isoamílico		Porcentagem de recuperação	Isotiocianato de guanidina-sílica		Porcentagem de recuperação
	Amostra semeada antes do processo de eluição viral (PFU)	Amostra semeada após a clarificação (controle positivo) (PFU)		Amostra semeada antes do processo de eluição viral (PFU)	Amostra semeada após a clarificação (controle positivo) (PFU)	
2 h	$6,3 \times 10^2$	$1,26 \times 10^{-1}$	0,02	$5,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	0,18
16 h	$6,3 \times 10^2$	$1,26 \times 10^{-1}$	0,02	$5,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	0,18

Tabela 7. Resultados dos ensaios de padronização do processo de eluição (utilizando 35 ml de extrato de carne e 5,0 ml de lodo) e concentração viral do lodo semeado experimentalmente com AdV5.

<i>Tempo de incubação adotada para concentração da amostra de lodo</i>	<i>Proporção de extrato de carne: lodo (v/v) 7:1</i>					
	Fenol-clorofórmio-isoamílico		Porcentagem de recuperação	Isotiocianato de guanidina-sílica		Porcentagem de recuperação
	Amostra semeada antes do processo de eluição viral (PFU)	Amostra semeada após a clarificação (controle positivo) (PFU)		Amostra semeada antes do processo de eluição viral (PFU)	Amostra semeada após a clarificação (controle positivo) (PFU)	
2 h	$6,3 \times 10^{-1}$	$1,26 \times 10^{-1}$	20	$5,6 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	1,8
16 h	$6,3 \times 10^{-1}$	$1,26 \times 10^{-1}$	20	$5,6 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	1,8

5.3 Padronização do método de clarificação

Foram testados dois métodos de clarificação. O descrito por Mignote, Maul e Schwartzbrod (1999) e o descrito por Croci et al. (2007). Quando submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, observou-se a presença de uma banda em 300 pb indicando a presença do genoma viral apenas quando o método de clarificação descrito por Mignote, Maul e Schwartzbrod (1999) foi adotado (dados não mostrados).

5.4 Limite de sensibilidade dos métodos de extração de ácidos nucleicos por PCR/nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR

Para avaliar a eficiência dos métodos de extração, foram testados dois métodos: método fenol-clorofórmio-isoamílico/Trizol® e método isotiocianato de guanidina-sílica, utilizando AdV5 e RV como modelos. Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 4.

A sensibilidade da PCR/nested PCR ou RT-PCR foi determinada a partir de ensaios com diluições seriadas de base 10 de AdV5 ou RV em amostras de lodo de esgoto autoclavadas antes da etapa de eluição ou após a etapa de clarificação (controle positivo). O limite de detecção foi considerado a maior diluição viral que demonstrou um resultado positivo.

De acordo com a Figura 4, o limite de detecção para AdV5 utilizando o método fenol-clorofórmio-isoamílico e amplificação gênica pela PCR nas amostras semeadas antes da eluição e após a clarificação foi $6,3 \times 10^{-1}$ PFU e $1,26 \times 10^{-1}$ PFU respectivamente. O limite de detecção para AdV5 pelo método isotiocianato de guanidina-sílica e amplificação gênica pela PCR nas amostras semeadas antes da eluição foi $5,6 \times 10^2$ PFU e após a clarificação foi $1,0 \times 10^1$ PFU (Figura 4).

Quando houve um passo a mais de amplificação gênica (nested PCR), o limite de detecção para AdV5 utilizando tanto o método fenol-clorofórmio-isoamílico quanto o método isotiocianato de guanidina-sílica nas amostras semeadas antes da eluição e após a clarificação foi inferior a 1 PFU em ambos os casos.

O limite de detecção para RV utilizando o método de extração com o reagente Trizol® nas amostras semeadas antes da eluição e após a clarificação foi de $2,4 \times 10^1$ FFU e $2,16 \times 10^1$ FFU respectivamente (Figura 4). O limite de detecção para RV pelo método isotiocianato de

guanidina-sílica nas amostras semeadas antes da eluição foi $1,92 \times 10^2$ FFU e após a clarificação foi $1,73 \times 10^2$ FFU (Figura 4).

O teste exato de Fischer foi aplicado para comparar os dois métodos de extração utilizados (método orgânico por PCR ou RT-PCR e isotiocianato de guanidina-sílica por PCR ou RT-PCR), com um nível de significância $P < 0,05$. Em ambas as comparações, o método orgânico apresentou uma diferença estatisticamente significativa com $P = 0,0286$. O teste exato de Fisher não pode ser aplicado para comparar os dois métodos de extração utilizados para AdV5 quando a reação de amplificação gênica foi nested PCR tendo em vista que não se obteve um limite de detecção preciso.

Para HAV, o limite de detecção pelo método de extração utilizando o reagente Trizol® nas amostras semeadas antes da etapa de eluição e após a clarificação foi $7,2 \times 10^{-3}$ FFU (Figura 5). De acordo com a Figura 5, o limite de detecção do PV2 utilizando o mesmo método foi de $1,88 \times 10^1$ PFU com as amostras semeadas antes da etapa de eluição e após a etapa de clarificação.

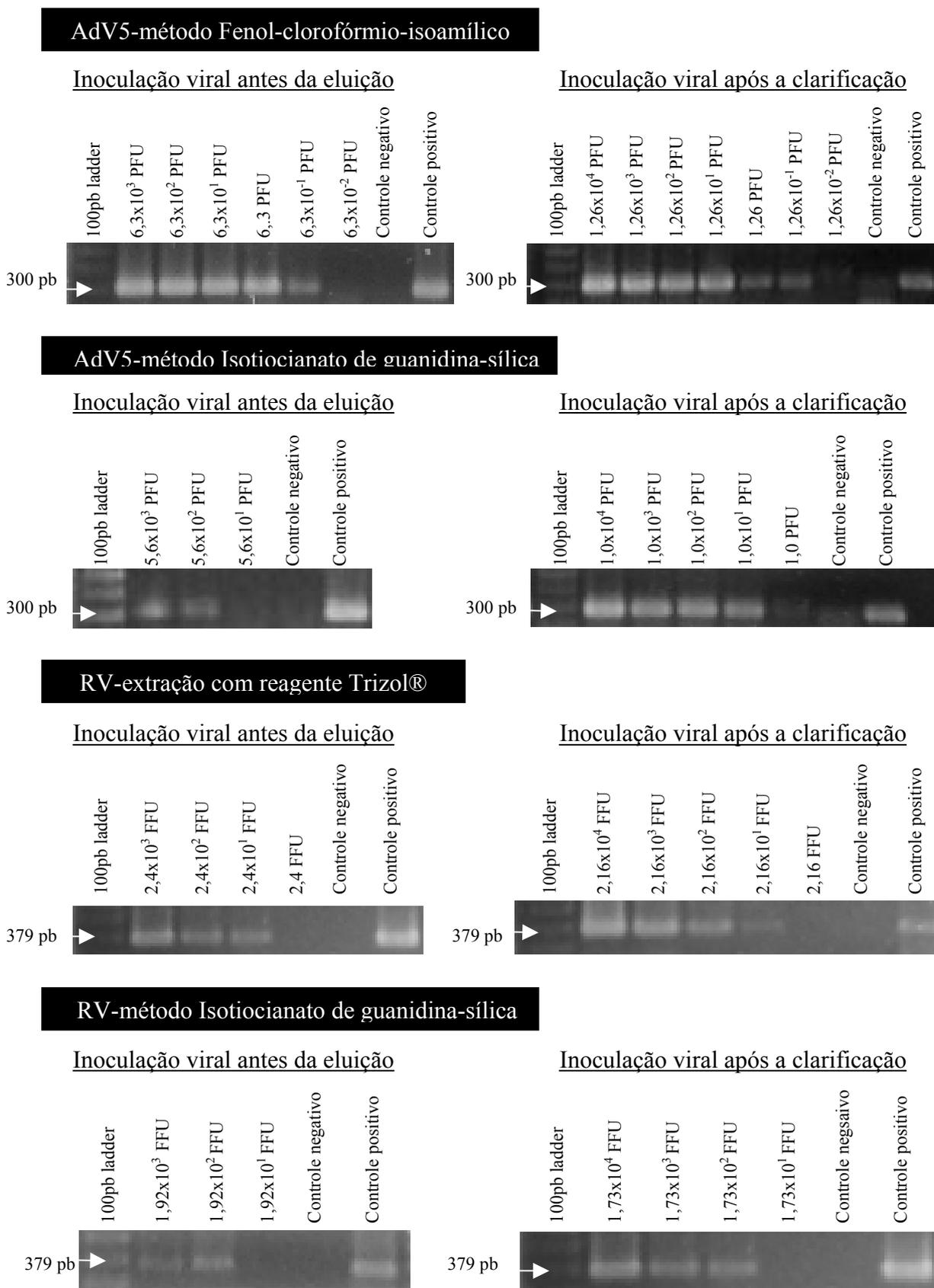


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o limite de sensibilidade da PCR ou RT-PCR para AdV5 e RV artificialmente semeados em amostras de lodo de esgoto autoclavadas.

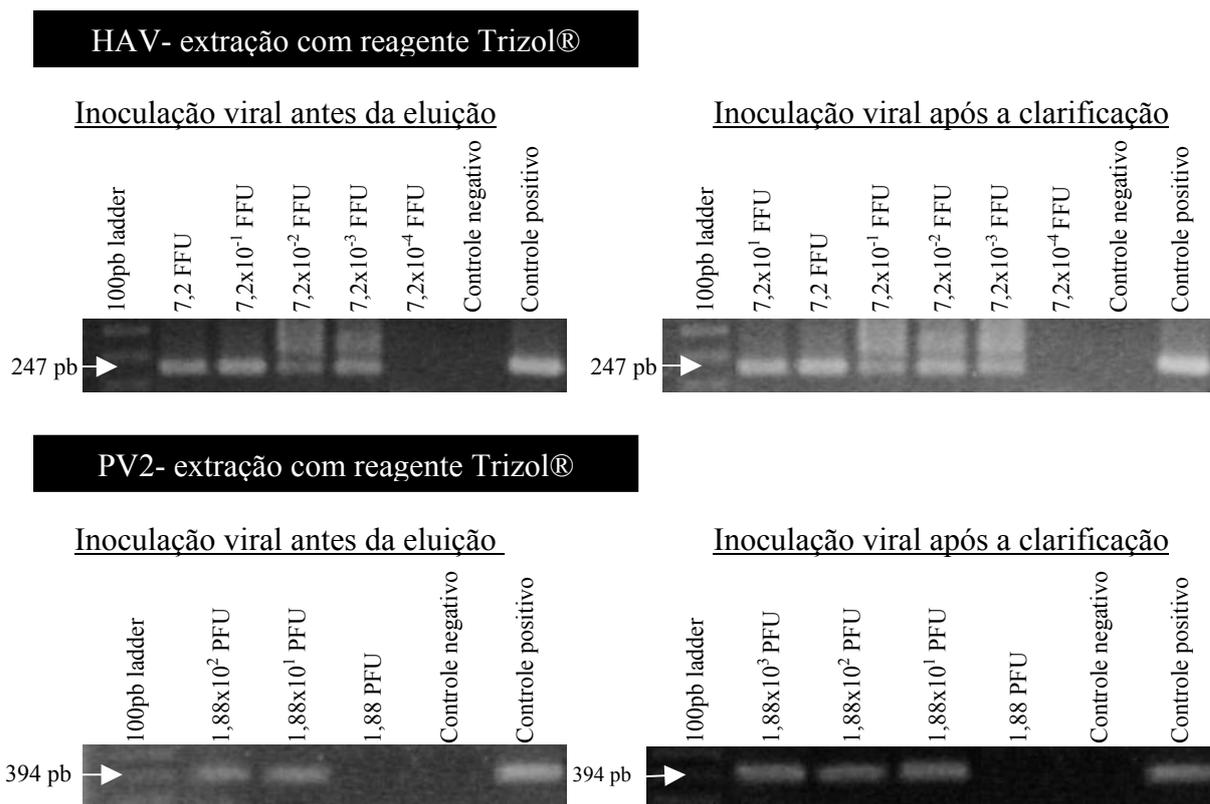


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o limite de sensibilidade da RT-nested PCR ou RT-PCR para HAV e PV2 artificialmente semeados em amostras de lodo de esgoto autoclavadas.

5.5 Porcentagem de recuperação utilizando os métodos de extração selecionados na detecção de vírus entéricos em amostras de lodo de esgoto artificialmente semeadas

Os resultados dos diferentes métodos de extração viral testados nas amostras de lodo de esgoto artificialmente semeadas com AdV5 ou RV ou HAV ou PV2 estão demonstrados na Tabela 8. Quando o limite de detecção do AdV5 foi comparado com os controles positivos (100% recuperação), o método fenol-clorofórmio-isoamílico foi capaz de recuperar 20% dos vírus semeados e o método isotiocianato de guanidina-sílica recuperou 1,8%. Na detecção do RV, o método utilizando o reagente Trizol® e o método isotiocianato de guanidina-sílica foram capazes de recuperar 90% dos vírus semeados. Para HAV e PV2, o método utilizando o reagente Trizol® foi capaz de recuperar 100% dos vírus semeados.

A eficiência de recuperação viral nas amostras de lodo de esgoto foi calculada conforme descrito no item 4.20.

Tabela 8. Limites de detecção das partículas virais de AdV5, HAV, PV2 e RV nas amostras de lodo de esgoto com dois diferentes métodos de extração de ácidos nucleicos: método orgânico e método isotiocianato de guanidina-sílica.

<i>Amostra</i>	Lodo de esgoto			
Vírus e método	Amostras semeadas antes da eluição	Amostras semeadas após a clarificação	Porcentagem de recuperação	Número de amostras positivas/número de amostras analisadas
AdV5 (PFU)				
Fenol	$6,3 \times 10^{-1}$	$1,26 \times 10^{-1}$	20	4/4
Silica	$5,6 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	1,8	4/4
RV (FFU)				
Trizol®	$2,4 \times 10^1$	$2,16 \times 10^1$	90	4/4
Silica	$1,92 \times 10^2$	$1,73 \times 10^2$	90	4/4
PV2 (PFU)				
Trizol®	$1,88 \times 10^1$	$1,88 \times 10^1$	100	4/4
HAV (FFU)				
Trizol®	$7,2 \times 10^{-3}$	$7,2 \times 10^{-3}$	100	4/4

5.6 Citotoxicidade das amostras de lodo de esgoto

A avaliação da toxicidade do lodo concentrado previamente autoclavado frente às células permissivas aos vírus de interesse está demonstrada na Figura 6. As placas de MA104 foram incubadas por um período de 48h e, após, observou-se a toxicidade apenas na amostra pura de lodo de esgoto. O mesmo ocorreu com as células A549 e Vero que foram incubadas por um período de 72h. Com relação às células FRHK-4, incubadas por um período de 7 dias, observou-se toxicidade até a diluição 1:8.

Deste modo, optou-se por utilizar a diluição 1:2 nos ensaios de cultivo de células *in vitro* para as amostras de campo positivas para a presença do genoma de RV/AdV e PV na reação de RT-PCR ou PCR/nested PCR. Para as amostras positivas para a presença do genoma de HAV na reação de RT-nested PCR optou-se por utilizar a diluição 1:16 nos ensaios de cultivo de células *in vitro*.

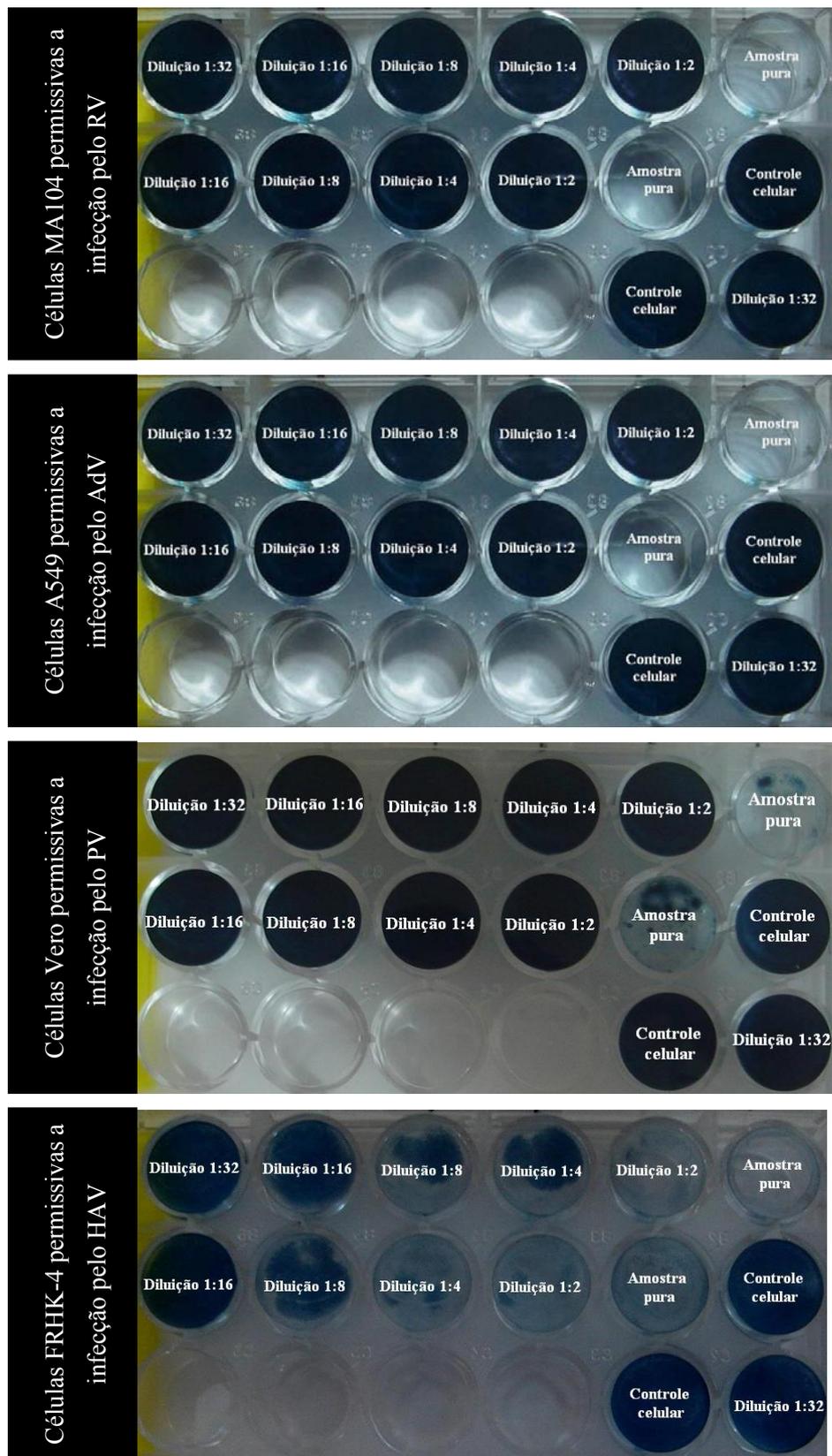


Figura 6. Citotoxicidade das amostras de lodo de esgoto previamente autoclavadas em células permissivas a infecção pelos vírus de interesse.

5.7 Detecção de vírus entéricos presentes em amostras de lodo de esgoto (amostras de campo)

Após a padronização da metodologia de detecção molecular e ensaios de cultivo de células *in vitro*, estes foram aplicados para verificar a presença de vírus entéricos nas amostras de campo de lodo de esgoto coletadas de junho de 2007 a maio de 2008.

5.7.1 PCR/nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR

Com relação ao AdV, verificou-se positividade em todas as amostras submetidas à reação de PCR e nested PCR, com exceção dos controles negativos. A Figura 7A mostra os resultados das reações de nested PCR.

Conforme observado na Figura 7B, C e D; o HAV foi positivo nas amostras dos meses de 06/2007, 08/2007 e 02/2008; o genoma do PV foi detectado nos meses: 06/2007, 07/2007, 09/2007, 10/2007, 11/2007, 02/2008, 04/2008 e 05/2008 e para o RV, observou-se positividade nos meses: 07/2007, 08/2007, 09/2007 e 02/2008, respectivamente.

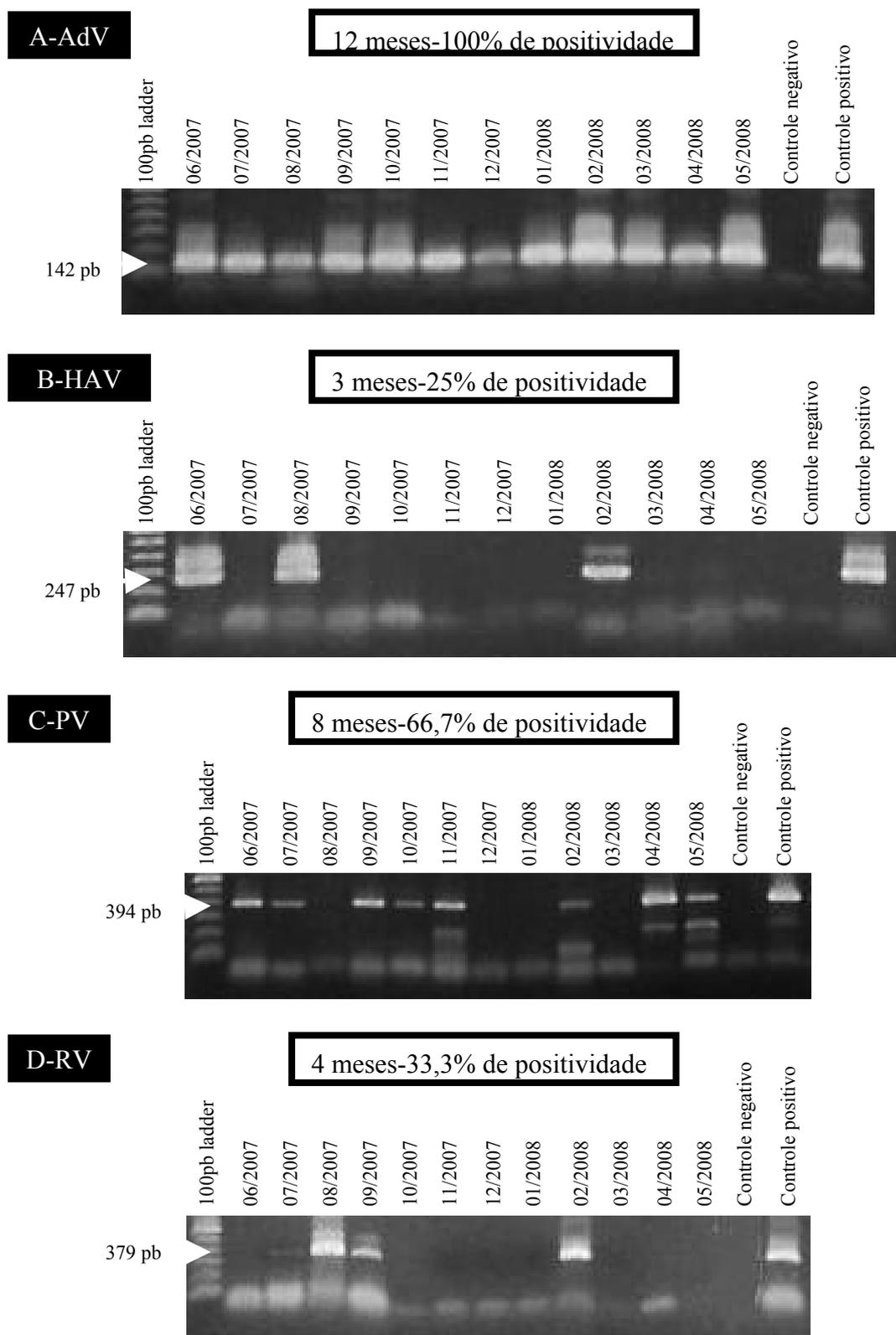


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1% mostrando a detecção de vírus entéricos em amostras de campo de lodo de esgoto por nested PCR/RT-PCR/RT-nested PCR.

5.7.2 ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR

Todas as amostras de campo também foram submetidas ao ensaio de ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR para verificar a viabilidade viral nas amostras positivas por técnicas moleculares, além de verificar se ocorria aumento ou não na sensibilidade de detecção ao utilizar este método.

Com relação ao AdV, verificou-se que todas as amostras que haviam sido submetidas à reação de nested PCR também foram positivas na reação de ICC-nested PCR (Figura 8A).

Para o HAV, observou-se que as amostras positivas foram diferentes das que apresentaram positividade no ensaio de RT-nested PCR. No ensaio de ICC-RT-nested PCR ocorreu positividade nos meses de 01/2008 e 04/2008 (Figura 8B). O mesmo não ocorreu com o PV, que além de apresentar positividade nos mesmos meses que as amostras submetidas ao RT-PCR, também foi positiva nos meses de 08/2007, 01/2008 e 03/2008 (Figura 8C).

Para o RV, observou-se positividade nos meses: 09/2007, 01/2008 e 03/2008 (Figura 8D); sendo que destas amostras apenas a relativa ao mês 09/2007 também havia sido positiva na reação de RT-PCR.

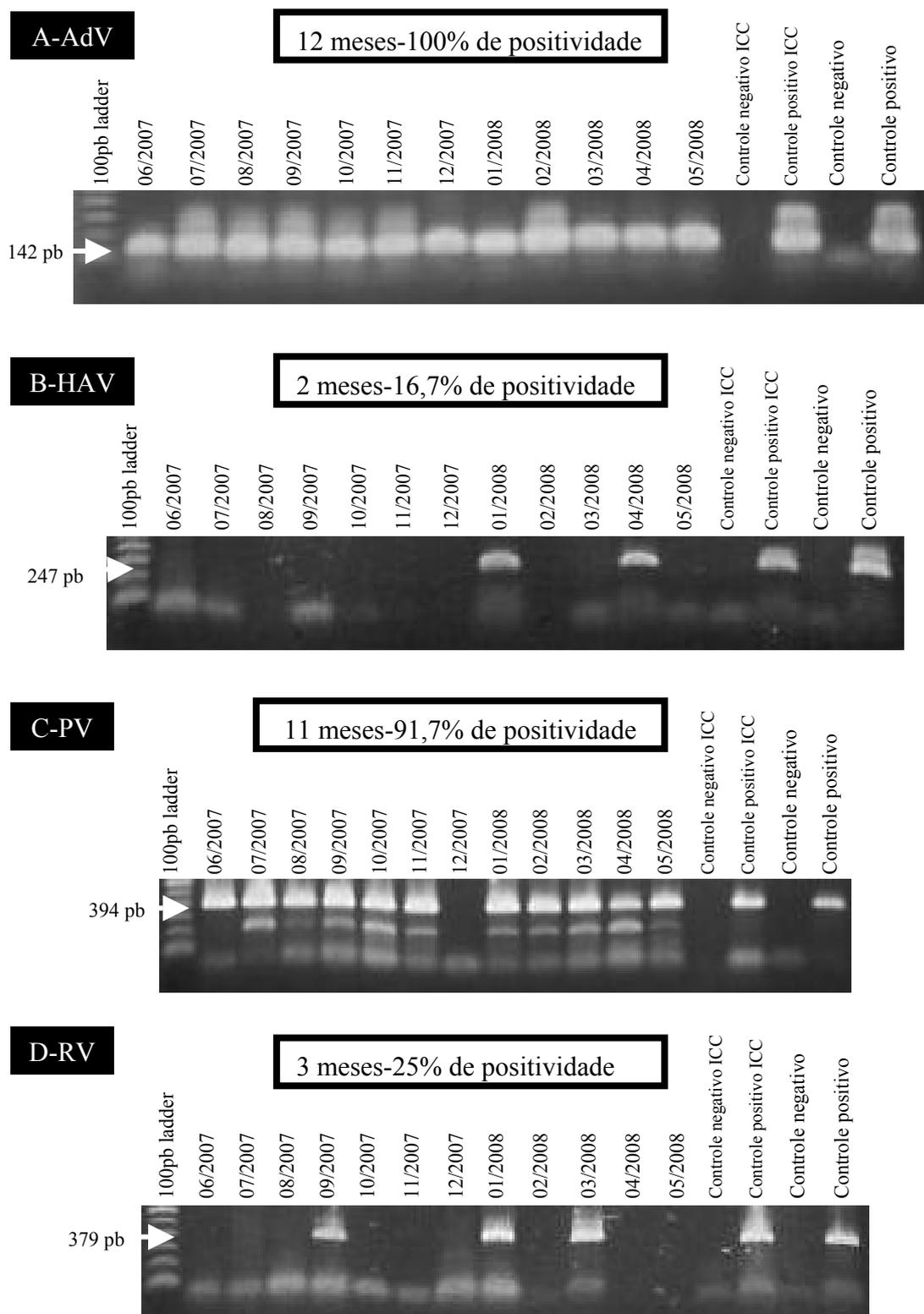


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 1% mostrando a detecção de vírus entéricos em amostras de campo de lodo de esgoto por ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR.

5.7.3 Comparação da detecção de vírus entéricos presentes em amostras de lodo de esgoto (amostras de campo) por nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR e ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR

Os resultados obtidos nos itens 5.7.1 e 5.7.2 foram sumarizados na Figura 9, onde observa-se que, por nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR, ocorreu 100% de positividade no mês 02/2008 indicando que neste mês foram detectadas a presença dos genomas virais de AdV, HAV, PV e RV. Porém, de acordo com o ensaio de ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR, 100% de positividade ocorreu no mês 01/2008 (Figura 9). Nesta mesma Figura, observa-se que as menores porcentagens de detecção por nested PCR ou RT-PCR/RT-nested PCR ocorreram nos meses 12/2007, 01/2008 e 03/2008. Por ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR, a menor porcentagem de detecção ocorreu no mês 12/2007. Porcentagens iguais de detecção por ambas as metodologias foram observadas de setembro de 2007 a dezembro de 2007 e em maio de 2008.

A Tabela 9 sumariza as porcentagens de amostras positivas para os vírus analisados de acordo com a metodologia de detecção empregada. Observou-se 100% de positividade para o AdV por nested PCR e por ICC-nested PCR. Para o HAV, verificou-se 25% de amostras positivas por RT-nested PCR e 16,7% por ICC-RT-nested PCR. O PV foi positivo em 66,7% das amostras analisadas por RT-PCR e em 91,7% das analisadas por ICC-RT-PCR. Para o RV, observou-se 33,3% de positividade por RT-PCR e 25% por ICC-RT-PCR.

Tabela 9. Porcentagem de positividade para cada um dos vírus analisados em amostras de lodo de esgoto (amostras de campo) de acordo com a metodologia de detecção empregada.

	Porcentagem de amostras positivas	
	Técnicas moleculares*	Técnicas moleculares associadas à cultura celular**
AdV	100	100
HAV	25,0	16,7
PV	66,7	91,7
RV	33,3	25,0

* Nested PCR/RT-PCR/RT-nested PCR

** ICC-nested PCR/ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR

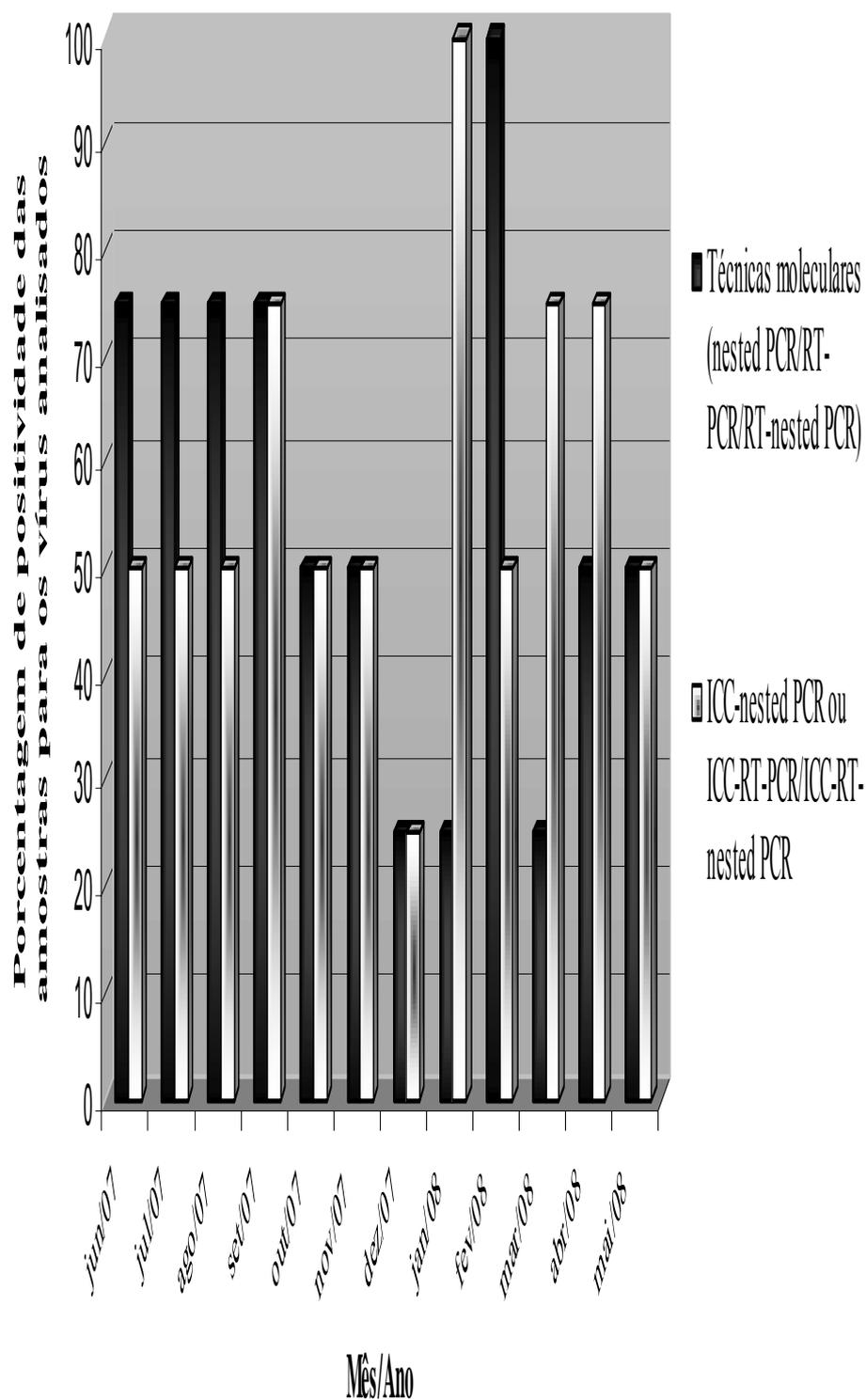


Figura 9. Porcentagem de positividade das amostras para os vírus analisados de acordo com o mês e com a metodologia de detecção adotada

5.7.4 IFI para quantificação de AdV

Todas as amostras que foram positivas segundo técnicas moleculares associadas à cultura celular foram submetidas a quantificação viral por IFI. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 10.

Na Figura 11 observamos a fluorescência de células A549 infectadas com amostras de campo positivas para AdV.

O fluido viral de AdV2 foi diluído seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} em amostras de lodo de esgoto autoclavada e submetido a IFI para quantificação. Este procedimento foi realizado a fim de observar se a amostra de lodo de esgoto era capaz de inibir a replicação viral dos AdV nas células A549. O resultado obtido foi $1,1 \times 10^9$ FFU/ml sendo que a titulação do AdV2 em meio de manutenção obteve como resultado $6,4 \times 10^9$ FFU/ml (dados não mostrados).

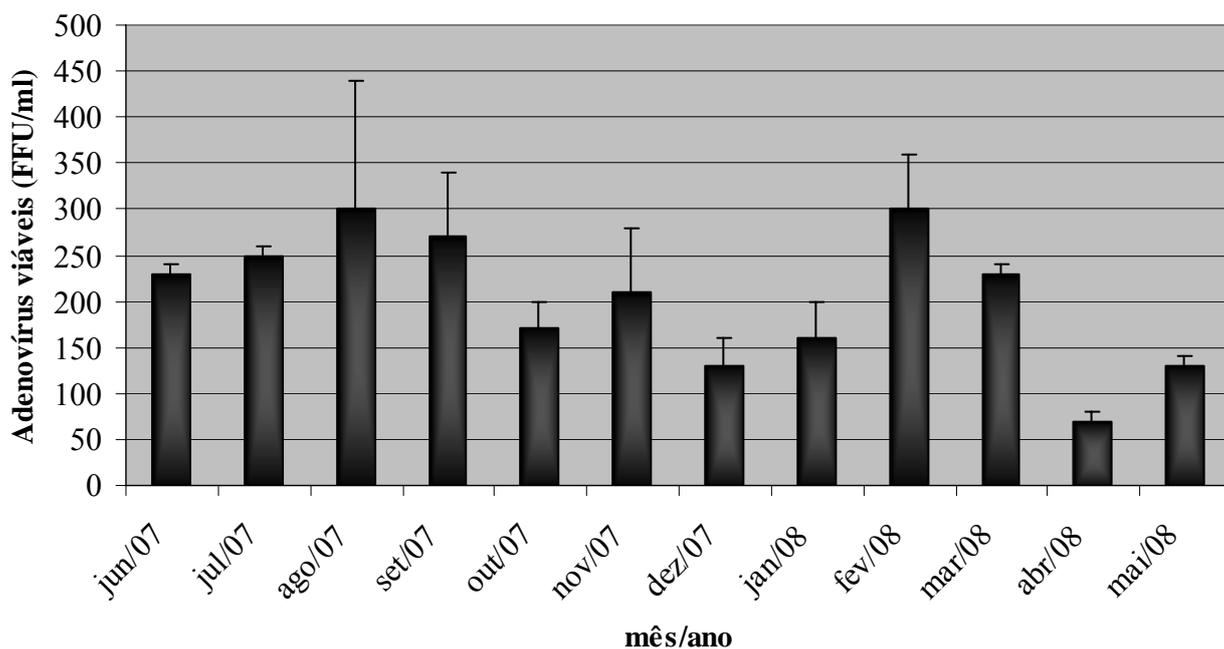


Figura 10. Resultado da quantificação de AdV viáveis presentes em amostras de campo através da IFI

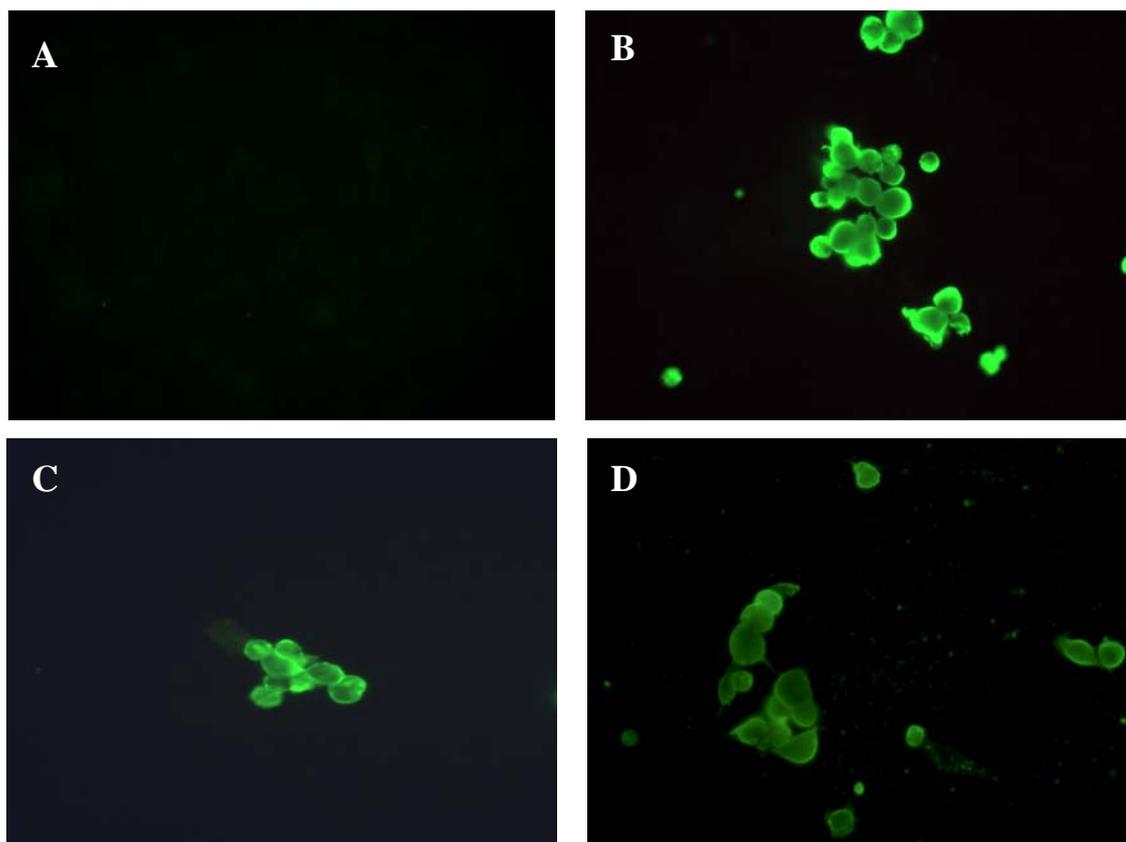


Figura 11. Células A549 infectadas com amostras de campo positivas para AdV e detectadas pelo anticorpo monoclonal MAB 8052. A: controle negativo; B: controle positivo; C e D: amostras de campo positivas. Aumento de 200 vezes.

5.7.5 Caracterização dos AdV utilizando o método PCR-RFLP

Para a distinção dos AdV entéricos (espécie F) das outras amostras foi aplicado o método de PCR-RFLP, em que é realizada a digestão do produto de 300 pb, proveniente da reação de PCR, com a endonuclease de restrição TaqI. Diferentemente dos outros AdV, quando os AdV 40 e 41 são amplificados por estes iniciadores gênicos, o produto de PCR possui um sítio de clivagem para a enzima TaqI, resultando em dois fragmentos distintos (110 e 190 pb). Portanto, as amostras contendo AdV da espécie F apresentarão os fragmentos de 110 e 190 pb, enquanto todos os demais AdV ainda manterão apenas um fragmento de 300 pb.

Na Figura 12 é possível visualizar os resultados obtidos. Concluiu-se que, de todas as amostras analisadas pela técnica de PCR-RFLP, nenhuma apresentou o perfil característico

dos AdV entéricos (espécie F).

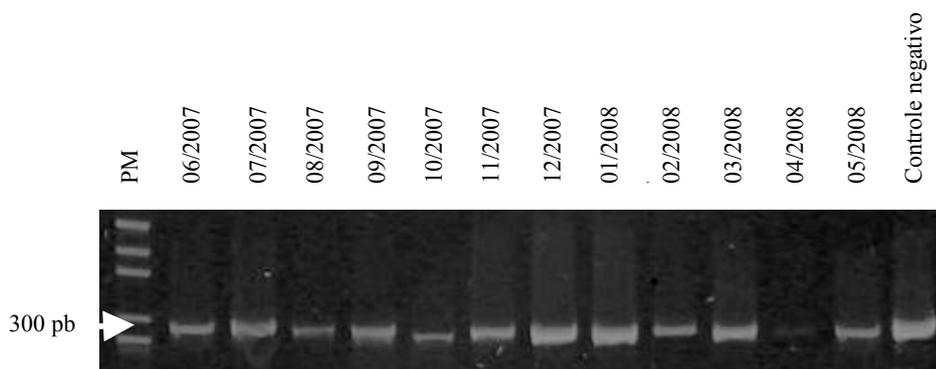


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% mostrando a caracterização dos AdV através do método PCR-RFLP. PM: peso molecular, Controle negativo: AdV5, Controle positivo: não mostrado.

5.7.6 (RT)-PCR em tempo real para quantificação de AdV e HAV

Os resultados obtidos de quantificação dos genomas virais por (RT)-PCR quantitativo estão sumarizados na Tabela 10. Na Figura 13 observa-se a quantificação dos AdV de acordo com o mês.

Tabela 10. Número de cópias de genoma/ml de AdV e HAV presentes em amostras de campo.

Mês/Ano	AdV (cópias de genoma/ml)*	HAV (cópias de genoma/ml)*
06/2007	$5,0 \times 10^5$	NR
07/2007	$1,2 \times 10^6$	NR
08/2007	$4,2 \times 10^5$	NR
09/2007	$1,3 \times 10^5$	NR
10/2007	$9,7 \times 10^4$	NR
11/2007	$2,4 \times 10^5$	NR
12/2007	$4,6 \times 10^4$	NR
01/2008	$5,6 \times 10^5$	$5,4 \times 10^2$
02/2008	$1,0 \times 10^6$	NR
03/2008	$5,7 \times 10^5$	NR
04/2008	$2,3 \times 10^5$	$3,1 \times 10^2$
05/2008	$3,3 \times 10^5$	NR

* Resultados expressos como a média das duplicatas com suas réplicas.

NR: não realizado pois não havia apresentado partículas virais viáveis de acordo com o item 4.14.

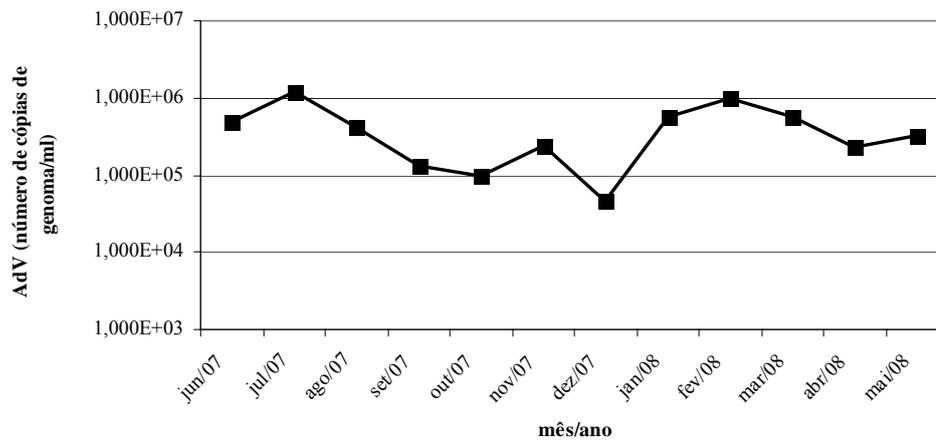


Figura 13. Quantificação dos AdV presentes em amostras de campo por PCR em tempo real

6 DISCUSSÃO

A produção de lodos de esgoto é uma característica intrínseca dos processos de tratamento de esgotos e tende a um crescimento no mínimo proporcional ao crescimento da população humana e a solução para sua disposição é medida que se impõe com urgência. O uso agrícola do lodo de esgoto é uma alternativa que apresenta vantagens ambientais quando comparado a outras práticas de destinação final e, além disso, a aplicação do lodo de esgoto na agricultura se enquadra nos princípios de reutilização de resíduos de forma ambientalmente adequada (CONAMA, 2006).

Corroborando todos estes fatores, o lodo de esgoto sanitário constitui fonte de matéria orgânica e de nutrientes para as plantas e sua aplicação no solo pode trazer benefícios à agricultura. Porém, devido a fatores naturais e acidentais, os lodos de esgotos são resíduos que podem conter metais pesados, compostos orgânicos persistentes e patógenos em concentrações nocivas à saúde e ao meio ambiente (CONAMA, 2006). Devido a todos os fatores expostos, o CONAMA publicou a Resolução 375/2006 que estabelece critérios e procedimentos para o uso, em áreas agrícolas, de lodo de esgoto gerado em ETE sanitário e seus produtos derivados, visando benefícios à agricultura e evitando riscos à saúde pública e ao ambiente.

Esta Resolução (CONAMA, 2006) estabelece entre outros assuntos, os limites máximos de concentração de patógenos que podem ser encontrados em lotes de lodo de esgoto e de produtos derivados, para o uso agrícola. O limite máximo de vírus deve ser menor que 0,25 PFU ou FFU/grama de sólidos totais. Para tal, os vírus entéricos a serem pesquisados preferencialmente serão: AdV e vírus do Gênero *Enterovirus* (PV, Echovírus, Coxsackievírus). Em situações especiais - endêmicas ou epidêmicas - (surto de diarreia, hepatite A e outras viroses de transmissão fecal-oral), deve-se pesquisar RV, HAV e outros, definidos pelo órgão ambiental, ouvindo os órgãos competentes.

Por isso se torna necessário o desenvolvimento de métodos para detecção de vírus entéricos no lodo de esgoto. O presente trabalho visou estabelecer uma metodologia sensível e eficiente para detecção de AdV, HAV, PV e RV presentes em amostras de lodo de esgoto submetidas ao processo de tratamento denominado lodo ativado. A escolha destes agentes virais foi baseada no risco que estes apresentam à saúde pública quando presentes no meio ambiente e na tentativa de desenvolver um método que possa ser aplicado na detecção de uma grande variedade de contaminantes virais.

O método de eluição utilizado neste trabalho foi o descrito pela EPA (EPA, 2003) pois este é o método recomendado pelo CONAMA (2006). Esta metodologia de eluição foi avaliada com algumas modificações na tentativa de se padronizar uma metodologia que seja reprodutível nas condições brasileiras. Além disso, vários trabalhos anteriores, entre eles os desenvolvidos por Chapron et al. (2000) e Gallagher e Margolin (2007) que utilizaram o método de concentração descrito pela EPA (1992) obtiveram bons resultados.

O método descrito por Ahmed e Sörenson (1995) tem em comum com o método recomendado pela EPA (EPA, 2003) o eluente que no caso é o extrato de carne. Em ambas as metodologias utiliza-se extrato de carne a 10%, variando, contudo as proporções entre o lodo de esgoto e o eluente.

Salienta-se que a matéria utilizada neste trabalho em todos os procedimentos foi lodo de esgoto que não foi submetido ao sistema de desidratação, pré-condicionamento químico e que não passou pela prensa desaguadora. Isso se deve ao fato de que no sistema de pré-condicionamento químico de lodo adensado, utiliza-se suspensão de cal e solução de polieletrólitos que podem interferir no método de detecção, inibindo este procedimento.

Ensaio com diferentes volumes de extrato de carne para eluição são importantes e Hurst e Goyke (1986) enfatizam que provavelmente um dos fatores críticos na eluição de vírus de lodo é a razão entre os volumes do eluente e do lodo. Entretanto, a relação adequada entre o volume de extrato de carne e a amostra é bastante variável (NIELSEN; LYDHOLM, 1980). Por isso, foram introduzidas modificações nos volumes dos reagentes e da amostra utilizada e avaliou-se no presente trabalho o volume de eluente utilizado para que a sensibilidade do método não fosse prejudicada.

Padronizou-se as proporções de eluente: lodo de esgoto que foram de 3:1 e 7:1 e também o tempo de incubação adotado na concentração viral utilizando AdV5 como modelo. Quando foi utilizada a proporção 3:1 (extrato de carne: lodo), de acordo com a Tabela 6, verificou-se que não houve diferença na porcentagem de recuperação viral em função do tempo de incubação adotado na concentração viral. Porém, conforme a Tabela 7, quando adotou-se a proporção 7:1 (extrato de carne: lodo) foi possível notar um aumento na porcentagem de recuperação viral que também não difere em função do tempo de incubação adotado na concentração da amostra. Portanto, nos experimentos posteriores, optou-se por utilizar a proporção de extrato de carne: lodo de 7:1, pois esta apresentou as melhores porcentagens de recuperação viral. Como não foi observada diferença entre os tempos de incubação adotados na concentração viral, optou-se por utilizar o menor tempo (2 h) para agilizar a metodologia.

No procedimento adotado, o extrato de carne é utilizado para precipitar as partículas virais da amostra concentrada pela redução do pH a 3,5 (EPA, 1996). O uso do extrato de carne como meio de eluição tem tido aceitação mundial, e seu uso é compatível com a detecção viral por cultura celular (PAYMENT; TRUDEL, 1985; YANKO et al., 1993; DAHLING; WRIGHT, 1988; HURST et al., 1984). A interação hidrofóbica com substâncias orgânicas no extrato de carne funciona como um importante modelo de eluição de partículas virais de vários absorventes em muitos estudos (LOGAN et al., 1980; STETLER; WALTRIP; HURST, 1992).

A concentração viral foi realizada de acordo com a técnica descrita por Lewis e Metcalf (1988), que utiliza PEG para esta finalidade. O PEG é um polímero sintético, quimicamente inerte, não-tóxico, solúvel em água e amplamente utilizado na precipitação de proteínas (LEWIS; METCALF, 1988). Dois mecanismos têm sido sugeridos para justificar seu efeito. O primeiro e possível mecanismo primário discutido por Atha e Ingham (1981) sugere que o PEG atue como uma “esponja de solvente inerte” que estericamente exclui proteínas de um solvente, efetivamente aumentando sua concentração até que a solubilidade é excedida e a precipitação ocorre. A formação do precipitado pode ser afetada por alguns fatores como o tamanho da proteína, concentração, carga, e a força iônica inicial do soluto. Um segundo mecanismo que enfatiza a importância da carga protéica tem sido sugerido e é discutido por Lee e Lee (1981). Neste caso, a carga da superfície protéica produz um efeito termodinâmico desfavorável na solubilidade do PEG, causando sua exclusão da “zona protéica”; entretanto, concentrações altamente apropriadas de polímero, precipitação protéica ou cristalização ocorrem. Proteínas mais carregadas ou hidrofóbicas têm sido mais facilmente precipitadas que as com menos carga. Os três trabalhos citados anteriormente que compararam os métodos de eluição utilizaram o método descrito por Lewis e Metcalf (1988) para concentração viral.

Em seguida ao processo de eluição e concentração viral, as amostras foram submetidas ao processo de clarificação que remove bactérias e fungos contidos na amostra. Foram testados dois métodos: o descrito por Mignote, Maul e Schwartzbrod (1999) e o descrito por Croci et al. (2007). Quando submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, observou-se a presença de uma banda em 300 pb indicando a presença do genoma viral apenas quando o método de clarificação descrito por Mignote, Maul e Schwartzbrod (1999) foi adotado. Por isso, nos ensaios posteriores, este foi o método de clarificação empregado.

Posteriormente, ocorreu a extração dos ácidos nucléicos. Os métodos de extração têm como objetivo extrair e purificar os ácidos nucléicos para remover restos celulares e

inibidores antes da amplificação e detecção molecular (LIPP et al., 2001), visto que o principal desafio da aplicação dos métodos moleculares em virologia ambiental são os inibidores devido a presença de substâncias como os ácidos húmicos, polissacarídeos e produtos químicos (KINGSLEY; RICHARDS, 2001). Por isso, optou-se por utilizar a técnica de digestão com proteinase K (a fim de degradar as proteínas da amostra) e purificação com CTAB (que é um detergente catiônico utilizado na precipitação seletiva dos ácidos nucleicos e eliminação de polissacarídeos das amostras) (STRAUB et al., 1994; ARNAL et al., 1999; SHIEH; CALCI; BARIC, 1999; LEES, 2000) antes da extração dos ácidos nucleicos para purificar as amostras e remover inibidores.

Os ácidos nucleicos podem ser extraídos de amostras ambientais contaminadas por vários protocolos diferentes como extração orgânica com fenol-clorofórmio-isoamílico/Trizol®, método isotiocianato de guanidina-sílica e kits comerciais. Os métodos que não são baseados em kits são mais adequados para serem utilizados em procedimentos de rotina em todos os laboratórios pois eles são menos onerosos que os protocolos baseados em kits. O Trizol® é um reagente pronto para uso no isolamento de RNA total de células e tecidos. Ele é uma solução monofásica de Fenol e GuSCN. GuSCN é um poderoso agente de purificação e detecção de DNA e RNA pois ele tem potencial para lisar células e inativar nucleases (BOOM et al., 1990). Segundo Jiang, Noble e Chui (2001), o método isotiocianato de guanidina-sílica é rápido, fácil de utilizar e eficiente na remoção de inibidores. Adicionalmente, ele diminui a contaminação cruzada entre as amostras e é um método eficiente para recuperação de patógenos em amostras ambientais. Além disso, tem se mostrado um excelente método de detecção de AdV, HAV, enterovírus, poliomavírus e vírus da Hepatite E recuperados de água para consumo, água de rio, água do mar e esgoto (PINA et al., 1998; BOFILL-MAS et al., 2006).

Neste trabalho foi padronizado o processo de extração dos ácidos nucleicos utilizando AdV5 (genoma DNA) e RV (genoma RNA) como modelos. Os resultados mostrados na Figura 4 apontam que a sensibilidade dos métodos isotiocianato de guanidina-sílica e fenol-clorofórmio-isoamílico/Trizol® foram diferentes dependendo da técnica de extração utilizada. A eficiência dos diferentes métodos difere significativamente ($P = 0,0286$). No caso do lodo, o método mais sensível foi o método orgânico (fenol-clorofórmio-isoamílico/Trizol®) quando comparado ao método isotiocianato de guanidina-sílica para detecção de AdV5 por PCR e RV por RT-PCR. Conforme mostrado na Figura 4 para AdV5 (genoma DNA), o método orgânico foi capaz de detectar $6,3 \times 10^{-1}$ PFU nas amostras semeadas antes da eluição e $1,26 \times 10^{-1}$ PFU nas semeadas após a clarificação indicando uma perda viral de 80% enquanto com o método

da sílica a detecção foi de $5,6 \times 10^2$ PFU e $1,0 \times 10^1$ PFU indicando uma perda viral de 98,2%, respectivamente (Figura 4).

Conforme esperado, quando houve um passo a mais de amplificação gênica (nested PCR), a sensibilidade da reação aumentou consideravelmente e o limite de detecção para AdV5 por ambos os métodos antes da etapa de eluição e após a clarificação foi considerado como menos de 1 PFU. Para RV (genoma RNA), conforme a Figura 4, o método orgânico foi capaz de detectar $2,4 \times 10^1$ FFU nas amostras semeadas antes da eluição e $2,16 \times 10^1$ FFU nas semeadas após a clarificação enquanto com o método isotiocianato de guanidina-sílica a detecção foi de $1,92 \times 10^2$ FFU e $1,73 \times 10^2$ FFU, respectivamente. Para o RV, em ambas as metodologias houve uma perda viral de 10%. Os resultados de detecção obtidos para o RV diferem dos encontrados por Queiroz et al. (2001) onde o limite de detecção por RT-PCR foi de 10^3 FFU.

O método orgânico foi provavelmente o mais eficiente na remoção de substâncias inibidoras normalmente presentes em lodo derivado de esgoto devido à presença de solventes orgânicos associados com a etapa de clarificação envolvendo clorofórmio. Assim, o método mais eficiente (método orgânico) foi subsequente adotado para extração dos ácidos nucleicos dos outros vírus testados neste trabalho (Figura 5).

O método orgânico foi o método que obteve a melhor recuperação para vírus com genoma RNA como RV (90%), PV2 e HAV (ambos com 100 %) ao contrário do que ocorreu com vírus com genoma de DNA como AdV5 (20%) (Tabela 8). Isto pode ser devido a natureza dos genomas virais (DNA para AdV e RNA para HAV, PV2 e RV) e também à forte agregação dos AdV às partículas sólidas que dificulta seu isolamento de amostras ambientais. Mas isto deve ser confirmado com outros estudos envolvendo outros tipos de amostras ambientais, visto que as amostras ambientais são altamente heterogêneas devido a variações no conteúdo dos contaminantes e aos inibidores de reações moleculares presentes.

Os resultados de recuperação viral obtidos para o RV estão de acordo com os encontrados por Mehnert et al. (1997) que obteve uma média de recuperação de $81\% \pm 7,5$. Porém os resultados obtidos para o PV não corroboram com os encontrados por Hurst et al. (1978) com uma média de recuperação de 80% para o lodo sólido e também diferem dos resultados obtidos por Straub et al. (1995) que obteve uma recuperação de 38% para enterovírus.

A porcentagem de recuperação para o AdV5 foi baixa, o que corrobora com os resultados obtidos por Albiñana-Gimenez et al. (2006) que recuperou 0,72% dos AdV semeados em amostras de lodo e 43% dos semeados em esgoto.

O isolamento dos genomas virais de amostras de lodo de esgoto pelo método orgânico e subsequente detecção molecular descrita neste estudo é uma potente ferramenta de detecção rápida, amplificação e análise dos genomas virais necessária para o diagnóstico virológico. Os procedimentos de recuperação viral e extração dos ácidos nucleicos de amostras ambientais são relativamente simples e podem ser aplicados indiscriminadamente para vírus de DNA e RNA. Por isso estes foram aplicados para verificar a presença de vírus entéricos em amostras de campo de lodo de esgoto coletadas de junho de 2007 a maio de 2008.

A detecção molecular de AdV, HAV, e outros vírus entéricos quando corretamente aplicada, fornece dados confiáveis sobre a presença desses vírus no ambiente, portanto supera as limitações técnicas de isolamento desses vírus em cultura celular (PINA et al., 1998). A detecção de patógenos virais somente por cultura celular é muito complexa, e nem todos os grupos de vírus podem ser isolados com as linhagens celulares utilizadas até o momento.

Conforme observado na Figura 7, quando as amostras de campo foram analisadas por técnicas moleculares, com relação ao AdV, verificou-se positividade em todas as amostras, com exceção dos controles negativos.

A amplificação por nested PCR foi aplicada para a detecção de AdV em todas as amostras de campo para garantir a especificidade de detecção, eliminar qualquer resultado falso-positivo e aumentar o sinal de amplificação; fornecendo um método com alta sensibilidade, que permita detectar um pequeno número de contaminantes virais (PUIG et al., 1994).

Um dos mais sérios problemas relacionados ao uso da técnica de nested PCR é como evitar os resultados falso-positivos facilmente obtidos por contaminação com DNA amplificado (ERLICH; GELFAND; SNINSKY, 1991). Por isso seguiu-se cuidadosamente as precauções recomendadas como utilizar material descartável, áreas separadas e materiais para amostras amplificadas e para as não amplificadas (PUIG et al., 1994).

A alta porcentagem de amostras positivas para AdV distribuídas ao longo do período de estudo (junho de 2007 a maio de 2008) permite concluir que não há ocorrência de sazonalidade. Esses resultados condizem com os relatos de Formiga-Cruz et al. (2005) que afirma que os AdV são excretados durante todo o ano em quantidades superiores aos enterovírus e HAV. Os resultados encontrados para AdV reforçam a hipótese que os AdV constituem o melhor indicador de contaminação viral humana quando comparados aos enterovírus (PINA et al., 1998). Uma das razões é o grande número de amostras que são positivas para AdV, e negativas para enterovírus. Uma segunda razão relatada é que os AdV são mais estáveis em vários ambientes (incluindo água de esgoto, água do mar e água de

consumo) do que os enterovírus, sendo mais resistentes a alguns tratamentos de desinfecção (UV, cloro) e o genoma do AdV é bem caracterizado (MENG; GERBA, 1996; GERBA; GRAMOS; NWACHUKU, 2003; GERBA; NWACHUKU; RILEY, 2003; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003a; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003b). Estes resultados corroboram com os descritos por Puig et al. (1994); Pina et al. (1998); Vantarakis e Papapetropoulou (1998); Hernroth et al. (2002); Formiga-Cruz et al. (2002) e Formiga-Cruz et al. (2005) que mostram que os AdV são os vírus humanos mais prevalentes detectados por PCR em esgoto e em crustáceos. Girones (2006) observou que os AdV humanos foram encontrados em quase 100% das amostras de efluentes de esgoto urbano testadas, incluindo cidades na África, EUA e Europa o que está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

Verificou-se que as partículas virais com genoma de RNA (HAV, PV e RV) apresentaram baixa positividade nos meses de verão (Figura 7). Isto era esperado, pois no verão a temperatura atmosférica está mais elevada e isto pode acarretar danos aos capsídeos virais ou aos ácidos nucleicos, inativando muitas vezes enzimas requeridas para a replicação viral (FONG; LIPP, 2005).

O genoma do PV foi encontrado em 8 das 12 amostras analisadas (Figura 7), o que corresponde a 66,7% do total de amostras analisadas. Este resultado não corrobora com o obtido por Pavlov et al. (2005) que analisou 703 placas de esgoto e 157 placas de água e encontrou apenas 49 amostras positivas para PV. Formiga-Cruz et al. (2005) encontrou 4 de 10 amostras de esgoto positivas para enterovírus.

Os RV apresentaram positividade em 4 das 12 amostras analisadas (Figura 7), o que corresponde a 33,3% do total de amostras analisadas. Mehnert e Stewien (1993) ao analisar amostras de lodo de outubro de 1987 a julho de 1988 na cidade de São Paulo, detectou RV em 6 (20,6%) das 29 amostras de esgoto. Os resultados obtidos no presente estudo são similares aos encontrados por Kittigul et al. (2005) que detectou RV em 10 (25%) das 40 amostras de água de esgoto analisadas. Além disso, indicam que não há sazonalidade, o que corrobora com os resultados também obtidos por Villena et al. (2003).

O HAV apresentou positividade em 3 das 12 amostras analisadas (Figura 7), o que corresponde a 25,0% do total de amostras analisadas. Os resultados diferem dos encontrados por Carducci et al. (2008) que detectou HAV somente em 2/40 (5%) amostras de esgoto e dos encontrados por Pintó et al. (2007) que detectou a presença do genoma do HAV em 25/35 (71%) amostras de esgoto do Cairo. Entretanto, estes resultados corroboram com os descritos por Pina et al. (1998) onde 27% das amostras de esgoto bruto foram positivas para HAV e são

similares aos obtidos por Formiga-Cruz et al. (2005) onde 20% (2/10) das amostras de esgoto foram positivas para HAV. Villar et al. (2007) detectou RNA HAV em 16/50 (32%) amostras de esgoto bruto e tratado e 8 (16%) amostras positivas foram encontradas em esgoto tratado.

Todas as amostras de lodo de esgoto analisadas que foram positivas para HAV ou PV ou RV também foram positivas para AdV humanos. Esta observação está de acordo com estudos anteriores (PINA et al., 1998; FORMIGA-CRUZ et al., 2005) e também sugere que a detecção de vírus com genoma RNA não é inibida por níveis naturais de AdV em amostras de esgoto estudadas.

A detecção de vírus por técnicas moleculares indica somente a presença do genoma viral e não permite qualquer informação sobre infectividade, que é diretamente relacionada ao risco a saúde humana (SOBSEY et al., 1998; JIANG; NOBLE; CHUI, 2001). Muitos microorganismos podem ser inativados naturalmente (luz solar, altas temperaturas e outros estresses ambientais) ou por processos tecnológicos (por exemplo, desinfetantes químicos ou UV), mas os genomas dos microorganismos inativados podem persistir por longos períodos de tempo no ambiente (SOBSEY et al., 1998). Componentes dos microorganismos inativados, particularmente os genomas, podem ser detectados por técnicas moleculares embora eles não sejam infecciosos (KO; CROMEANS; SOBSEY, 2003). A habilidade de detectar somente partículas virais infecciosas entre muitas partículas virais não infecciosas em amostras ambientais é importante para prever o risco à saúde pública na água e em outras amostras ambientais (KO; CROMEANS; SOBSEY, 2003).

Vários estudos têm combinado a cultura celular e a técnica molecular e têm reportado que este método aumenta a especificidade de detecção de vírus entéricos infecciosos em amostras ambientais (FONG; LIPP, 2005). ICC-PCR combina a rapidez e sensibilidade da PCR com o ensaio de viabilidade da cultura celular para formar um método de detecção molecular capaz de isolar baixos níveis de partículas virais infecciosas (REYNOLDS; GERBA; PEPPER, 1996). A hipótese é que depois da inoculação em uma linhagem celular, somente partículas virais infecciosas, se presentes, serão propagadas e as partículas virais poderão ser molecularmente detectadas antes da observação do CPE (FONG; LIPP, 2005). Ela também é apropriada para partículas virais que não produzem CPE, mas infectam e replicam-se em linhagens celulares (FONG; LIPP, 2005). Além disso, a cultura celular anteriormente à amplificação dos ácidos nucleicos fornece um sistema de amplificação *in vitro* que aumenta o número de cópias de partículas virais infecciosas, que leva a um aumento na sensibilidade aumentando também a probabilidade de sua detecção (REYNOLDS; GERBA; PEPPER, 1996; KO; CROMEANS; SOBSEY, 2003). A cultura celular é

considerada por muitos autores a melhor forma de isolar e detectar partículas virais infecciosas em amostras ambientais (FONG; LIPP, 2005).

Portanto, visando avaliar a viabilidade dos vírus nas amostras de campo positivas para os genomas virais de interesse, foi realizado o ensaio de ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR. Esta técnica permite a detecção do genoma dos vírus que puderam infectar células cultivadas *in vitro*, garantindo que o genoma detectado pertence a cepas virais viáveis e infecciosas (RIGOTTO et al., 2005).

Conforme observado na Figura 8, com relação ao AdV, verificou-se que todas as amostras de campo que haviam sido submetidas à reação de nested PCR foram também positivas na reação de ICC-nested PCR, indicando a presença de partículas virais viáveis em todas as amostras analisadas. Um dos fatores que contribuiu no aumento da sensibilidade e especificidade de detecção do ICC-nested PCR foi a segunda etapa de amplificação por nested PCR (GREEN et al., 1998).

As amostras positivas no ensaio de ICC-RT-nested PCR (Figura 8) para o HAV foram diferentes das que apresentaram positividade no ensaio de RT-nested PCR (Figura 7). O ensaio de ICC-RT-nested PCR apresentou partículas virais viáveis apenas em 2 (01/2008, 04/2008) dos 12 meses analisados, correspondendo a 16,7% de amostras positivas no período de estudo. Os resultados com relação ao HAV corroboram com os estudos citados anteriormente que indicam uma baixa endemicidade de Hepatite A na região Sul (ABUZWAIDA et al., 1978; PANNUTI et al., 1985; OLIVEIRA et al., 1991; FERREIRA; PEREIRA LIMA; BARROS, 1996; FOCACCIA et al., 1998; PINHO et al., 1998; SABACK et al., 2001; TRINTA et al., 2001).

O mesmo não ocorreu com o PV, que além de apresentar positividade nos mesmos meses que as amostras submetidas ao RT-PCR (Figura 7), também foi positiva nos meses de 08/2007, 01/2008 e 03/2008 (Figura 8).

VDPVs (com 1,4 % de divergência nucleotídica com a cepa vacinal) foram isolados de água de esgoto e de rio no Japão três meses após a vacinação OPV, e vários desses VDPVs isolados tipo 1 e 3 mostraram aumento na sua neurovirulência (HORIE et al., 2002; YOSHIDA et al., 2002).

Pavlov et al. (2005) ao analisar amostras de esgoto e água do rio na África do Sul, isolou 49 amostras por RT-PCR triplex específico para vacina Sabin e verificou que todas consistiam de cepas vacinais, entre elas 29 eram Sabin tipo 1 (59,2%), 8 tipo 2 (16,3%) e 12 tipo 3 (24,5%), nenhum PV selvagem foi detectado nas amostras analisadas.

Neste estudo, verificou-se que o PV detectado era viável em 11 dos 12 meses

analisados por ICC-RT-PCR, não apresentando positividade apenas no mês 12/2007 (Figura 8). Isso corresponde a 91,7% de amostras positivas no período de estudo. Seria interessante analisar se as amostras que apresentaram partículas virais viáveis para PV consistiam apenas de sorotipos vacinais ou se seriam observados outros VDPVs.

O RV apresentou partículas virais viáveis apenas em 3 (25%) dos 12 meses de estudo (Figura 8).

Análise de restrição do DNA genômico do AdV pode ser utilizada para diferenciar os sorotipos de AdV e pode fornecer mais detalhes na sua identificação (ADRIAN et al., 1986). Por isso, para as amostras de campo que apresentaram positividade para AdV, foi realizado posteriormente o PCR-RFLP para distinção dos AdV entéricos (espécie F). Nesta metodologia realizou-se a digestão do produto de 300 pb, proveniente da reação de PCR, com a endonuclease de restrição TaqI. Diferentemente dos outros sorotipos de AdV, os produtos amplificados dos AdV 40 e 41, ao serem submetidos à digestão com esta endonuclease, resultam em dois fragmentos (110 pb e 190 pb). TaqI também cliva AdV 21 e 51, entretanto os perfis de restrição são claramente distintos dos observados para os Adv do subgênero F. AdV 21 e 51, são clivados em dois fragmentos, um de 230 pb e outro de 70 pb (ALLARD; ALBINSSON; WADELL, 2001).

Assim, das 12 amostras de campo positivas para AdV e analisadas pela técnica de PCR-RFLP, todas apresentaram AdV de outras espécies, que não entéricos (espécie F) (Figura 12). Isto deve-se ao fato de que os AdV não entéricos associados com infecções de outra natureza, além de serem cultiváveis *in vitro*, são também excretados nas fezes podendo ser utilizados como modelos de contaminação ambiental (GIRONES et al., 1995; PINA et al., 1998; VANTARAKIS; PAPAPETROPOULOU, 1998).

Embora os sorotipos de AdV mais frequentemente associados a gastroenterite sejam os sorotipos 40 e 41 (espécie F), outros sorotipos como 12, 18 e 31 (espécie A) (BROWN et al., 1996), e os sorotipos 1, 2 e 5 (espécie C) também têm sido associados à doença (GOMES et al., 1989; HORWITZ, 2001; LI et al., 2005).

A resolução do CONAMA (2006) recomenda que deve-se pesquisar preferencialmente AdV e vírus do Gênero *Enterovirus* (PV, Echovírus, Cocksackievírus). Portanto, preferiu-se quantificar o vírus mais prevalente nos estudos realizados com as amostras de campo, no caso, AdV.

A imunofluorescência é um teste muito útil na detecção da replicação viral em cultura tecidual e é considerada mais confiável que o ensaio de placa de lise (BIRCH et al., 1983). Isto é basicamente porque um CPE, que é necessário no ensaio de placa, pode não ser

detectado depois de várias passagens mesmo que os vírus estejam presentes nas células (BARARDI et al., 1998). Utilizando ensaio de imunofluorescência, a infecção viral pode ser detectada até quando CPE não está presente (BIRCH et al., 1983). Por isso, todas as amostras de campo que apresentaram partículas de AdV viáveis foram submetidas a quantificação viral por IFI. Antes de analisar as amostras que apresentaram partículas virais viáveis, realizou-se a diluição do fluido viral (AdV2) em amostras de lodo de esgoto autoclavadas e estas foram submetidas a IFI. O resultado obtido foi $1,1 \times 10^9$ FFU/ml sendo que a titulação do AdV2 em meio de manutenção obteve como resultado $6,4 \times 10^9$ FFU/ml (dados não mostrados). Isto demonstra que as amostras de lodo de esgoto não são capazes de inibir a replicação viral dos AdV nas células A549. Posteriormente as amostras de campo foram submetidas à quantificação por IFI. Os resultados encontrados variam de 70 FFU/ml (04/2008) a 300 FFU/ml (08/2007 e 02/2008) (Figura 10).

A Resolução do CONAMA (2006) preconiza que os limites máximos de concentração de patógenos que podem ser encontrados em lotes de lodo de esgoto e de produtos derivados, para o uso agrícola são menores que 0,25 PFU ou FFU/grama de sólidos totais. Com base nesta informação, pode-se inferir que todas as amostras de campo que apresentaram AdV viáveis encontram-se acima do limite máximo de concentração de patógenos permitido para utilização deste tipo de amostra na agricultura e portanto, não devem ser utilizadas para este fim a não ser que recebam tratamento prévio.

As amostras que apresentaram partículas virais viáveis para AdV e HAV foram quantificadas por (RT)-PCR em tempo real. De acordo com a Tabela 10, pode-se inferir que o número de cópias de genoma/ml de AdV é constante em todos os meses analisados, variando de $4,6 \times 10^4$ a $1,2 \times 10^6$ cópias de genoma/ml. Estes resultados confirmam os obtidos por Carducci et al. (2008) que mostrou uma presença constante de AdV em amostras de esgoto. Albiñana-Gimenez et al. (2006) encontrou 100% (5/5) de positividade para o AdV nas amostras de lodo e de esgoto analisadas, sendo que a quantidade média de cópias genômicas/l de AdV nas amostras de esgoto foi de $1,4 \times 10^7$ ($4,71 \times 10^5$ – $2,52 \times 10^7$) e nas amostras de lodo foi de $1,9 \times 10^5$ ($1,3 \times 10^2$ – $7,96 \times 10^5$). Com base nestes resultados, podemos inferir que a quantidade de AdV viáveis presentes nas amostras analisadas é superior à observada neste estudo, além disso, o estudo conduzido por Albinana-Gimenez et al. (2006) quantificou os AdV, porém não verificou se estes apresentavam partículas virais viáveis ou não.

Com relação ao HAV, observou-se que o número de cópias de genoma/ml é marcadamente inferior ao observado para o AdV. O HAV apresentou partículas virais viáveis apenas no mês 01/2008 e 04/2008 e conforme podemos observar de acordo com a Tabela 10,

o número de cópias de genoma/ml foi de $5,4 \times 10^2$ e $3,1 \times 10^2$, respectivamente. Estes resultados corroboram com os obtidos por Villar et al. (2007) onde o número de cópias de genoma/ml sazonalmente variou de $1,7 \times 10^2$ (primavera) a $3,8 \times 10^2$ (outono) em amostras de esgoto tratado.

Amostras ambientais, especialmente lodo urbano, contêm numerosos compostos orgânicos e inorgânicos (ácidos húmicos, polifenóis, metais pesados) que são tóxicos e causam lise em cultura celular. Esses compostos são também responsáveis por formar complexos com os ácidos nucleicos e inibir a amplificação enzimática (MULLER-WEGENER, 1988; HIGUCHI, 1992; STAUB; POLIVKA; GROSS, 1995).

O desenvolvimento da técnica de PCR, que permite a detecção de seqüências gênicas de microrganismos pela sua amplificação, aprimorou a possibilidade de avaliação da presença de vírus entéricos no meio ambiente. Entretanto, um dos principais problemas enfrentados por esta técnica é a frequência com que as amostras ambientais apresentam substâncias inibidoras, capazes de interferir no sistema enzimático utilizado na reação, inibindo o processo de amplificação (ARNAL, 1999; LEES, 2000). Os resultados das análises de cultura celular e PCR portanto dependem da eficácia com que as técnicas de extração utilizadas removem esses componentes (MONPOEHO et al., 2001).

Os resultados do presente estudo indicam que as técnicas utilizadas foram capazes de remover os inibidores presentes neste tipo de amostra e foram capazes de recuperar e detectar vírus entéricos presentes em amostras de lodo de esgoto.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- A metodologia proposta foi capaz de recuperar vírus entéricos humanos em amostras de lodo de esgoto;
- Quando comparado ao método isotiocianato de guanidina-sílica, o método orgânico de extração dos ácidos nucleicos se mostrou mais sensível;
- Com a metodologia proposta, foi possível recuperar 20% dos AdV5 artificialmente semeados, 90% RV e 100% do HAV e PV2;
- Pelos ensaios moleculares, foi detectado a presença de AdV em 100% das amostras de campo analisadas coletadas de junho de 2007 a maio de 2008. O HAV apresentou-se positivo em 25% das amostras, PV foi positivo em 66,7% e RV foi positivo em 33,3% das amostras;
- Pelas técnicas de ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR/ICC-RT-nested PCR pode-se verificar a viabilidade das amostras de campo detectadas por técnicas moleculares e além disso, esta técnica demonstrou maior sensibilidade na detecção de vírus entéricos em amostras de lodo de esgoto;
- Com a técnica de ICC-nested PCR ou ICC-RT-PCR, foi possível verificar que todas as amostras positivas para AdV e PV por técnicas moleculares apresentam partículas virais viáveis. Com relação ao PV observou-se ainda um aumento na sensibilidade de detecção quando esta metodologia foi adotada;
- Para o HAV e para o RV, com a técnica de ICC-RT-nested PCR/ICC-RT-PCR foi observado que as amostras positivas por técnicas moleculares não apresentavam partículas virais viáveis com exceção da amostra 09/2007, que confirmou a presença de partículas virais viáveis para o RV;
- Entre os AdV detectados nas amostras de campo, nenhum pertencia a cepa entérica (espécie F);
- As amostras de campo que foram positivas para AdV por IFI e ICC-nested PCR, quando quantificadas por PCR em tempo real, apresentaram um número de cópias de genoma/ml constante em todos os meses analisados;
- As amostras de campo que foram positivas para HAV por ICC-RT-nested PCR, quando quantificadas por RT-PCR em tempo real, apresentaram um número de cópias de genoma/ml inferior ao observado para os AdV;
- Todas as amostras de campo que apresentavam partículas virais viáveis para o AdV,

quando quantificadas por IFI, encontravam-se acima da concentração de patógenos preconizada pela Resolução 375/2006 (CONAMA) que define os requisitos mínimos de qualidade do lodo de esgoto destinado a agricultura.

8 PERSPECTIVAS

A continuidade do presente trabalho será:

- Quantificar os genomas virais de PV e RV detectados nas amostras de campo utilizando RT-PCR em tempo real;
- Sequenciar as amostras de campo positivas para o PV para verificar se consistem apenas de sorotipos vacinais ou se há também a presença de PV selvagens;
- Realizar cinética de tratamento do lodo artificialmente semeado com AdV5 com UV para estudar a inativação viral através deste processo;
- Sequenciar os produtos de PCR das amostras de campo positivas por técnicas moleculares para confirmar a natureza dos genomas virais detectados.

9 REFERÊNCIAS

ABBASZADEGAN, M.; STEWART, P.; LE CHEVALIER, M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 444-449, 1999.

ABRAHAM, R.; MINOR, P. D.; DUNN, G.; MODLIN, J. F.; OGRA, P. L. Shedding of virulent poliovirus revertants during immunization with oral poliovirus vaccine after prior immunization with inactivated poliovirus vaccine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 1105–1109, 1993.

ABUZWAIDA, A. R. N.; SIDONI, M.; YOSHIDA, C. F. T.; SCHATZMAYR, H. G. Seroepidemiology of hepatitis A and B in two urban communities of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, p. 219-223, 1978.

ADRIAN, T. H.; WADELL, G.; HIERHOLZER, J. C.; WIGAND, R. DNA restriction analysis of adenovirus prototypes 1 to 41. **Archives of Virology**, v. 91, p. 277-290, 1986.

ADRIAN, T.; WIGAND, R. Genome type analysis of adenovirus 31, a potential causative agent of infant's enteritis. **Archives of Virology**, v. 105, p. 81–87, 1989.

AHMED, A. U.; SORENSEN, D. L. Kinetics of pathogen destruction during storage of dewatered biosolids. **Water Environmental Research**, v. 67, p. 143–150, 1995.

AITKEN, C; JEFFRIES, D. J. Nosocomial spread of viral disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 528-546, 2001.

ALBERT, M.; SCHWARTZBROD, L. Recovery of enterovirus from primary sludge using three elution concentration procedures. **Water Science & Technology**, v. 24, p. 225–228, 1991.

ALBINANA-GIMENEZ, N.; CASARES, P. C.; BOFILL-MAS, S.; HUNDESA, A.; RIBAS, F.; GIRONES, R. Distribution of Human Polyomaviruses, Adenoviruses, and Hepatitis E Virus in the Environment and in a Drinking-Water Treatment Plant. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 7416-7422, 2006.

ALLARD, A.; GIRONES, R.; JUTO, P.; WADELL, G. Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 2659-2667, 1990.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v. 37, p. 149–157, 1992.

ALLARD, A.; KAJON, A.; WADELL, G. Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polimerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 250-257, 1994.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR combined with Restriction Endonuclease Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 498-505, 2001.

ALOUINI, M. D.; SOBSEY, S. Evaluation of an extraction-precipitation method for recovering hepatitis A virus and poliovirus from hardshell clams (*Mercenaria mercenaria*). **Water Science & Technology**, v. 5–6, p. 465–469, 1995.

ANDREOLI, C. V. **Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura e sua influência em características ambientais no agrossistema**. 1999. 288 p. Tese (Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

ANDREOLI, C. V.; BONNET, B. R. P. **Manual de métodos para análises microbiológicas e parasitológicas em reciclagem agrícola de lodo de esgoto**. Curitiba: Sanepar, 1998, p. 7-9.

ANDREOLI, C. V.; FERNANDES, F. Aspectos metodológicos. In: ANDREOLI, C. V.; LARA, A. I.; FERNANDES, F. **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções**. Curitiba: Sanepar, 1999, p. 21-47.

ANDREOLI, C. V.; FERREIRA, A. C.; CHERUBIN, C.; TELES, C. R.; CARNEIRO, C.; FERNANDES, F. Higienização do lodo de esgoto. In: **Resíduos sólidos do saneamento: processamento, reciclagem e disposição final**. Rio de Janeiro: ABES, 2001.

ANGEL, J.; FRANCO, M. A.; GREENBERG, H. B. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 529–539, 2007.

APAIRE-MARCHAIS, V.; ROBERTSON, B. H.; AUBINEAU-FERRE, V.; LE ROUX, M. G.; LEVEQUE, F.; SCHWARTZBROD, L.; BILLAUDEL, S. Direct sequencing of hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 3977-3980, 1995.

ARIAS, C. F.; ISA, P.; GUERRERO, C. A.; MÈNDEZ, E.; ZÁRATE, S.; LÓPEZ, T.; ESPINOSA, R.; ROMERO, P.; LÓPEZ, S. Molecular biology of rotavirus cell entry. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 356-361, 2002.

ARITA, I. Is polio eradication realistic?. **Science**, v. 312, p. 852-854, 2006.

ARNAL, C.; FERRE-AUBINEAU, V.; MIGNOTE, B.; IMBERT-MARCILLE, B. M.; BILLAUDELL, S. Quantification of hepatitis A virus in shellfish by competitive reverse transcription-PCR with coextraction of standard RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 322-326, 1999.

ARRAJ, A.; BOHATIER, J.; LAVERAN, H.; TRAORE, O. Comparison of bacteriophage and enteric virus removal in pilot scale activated sludge plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 516-524, 2005.

ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and diseases outcomes in developing regions. **Toxicology**, v. 198, p. 229-238, 2004.

ASSAAD, F.; COCKBURN, W. C. The relation between acute persisting spinal paralysis and poliomyelitis vaccine—results of a ten year enquiry. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 60, p. 231-242, 1982.

ASSIS, S. B.; SOUTO, F. D. S.; FONTES, C. J. F.; GASPAR, A. M. C. Prevalência da infecção pelos vírus das hepatites A e E em escolares de município da Amazônia Matogrossense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 155-158, 2002.

ATHA, D. H.; INGHAM, K. C. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols: analysis in terms of excluded volumes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 12108-12117, 1981.

ATMAR, R. L.; METCALF, T. G.; NEILL, F. H.; ESTES, M. K. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 631-635, 1993.

AVELLÓN, A.; PÉREZ, P.; AGUILAR, J. C.; LEJARAZU, R. O.; ECHAVARRÍA, J. E. Rapid and sensitive diagnosis of human adenoviruses infections by generic polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 92, p. 113-120, 2001.

BARARDI, C. R. M.; YIP, H.; EMSLIE, K. R., VESEY, G. SHANKER, S. R.; WILLIAMS, K. L. Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 49, p. 9-18, 1998.

BEARD, M. R.; ABELL, G.; HONDA, M.; CARROLL, A.; GARTLAND, M.; CLARKE, B.; SUZUKI, K.; LANFORD, R.; SANGAR, D. V.; LEMON, S. M. An infectious molecular clone of a Japanese genotype 1b hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 30, n. 1, p. 316- 324, 1999.

BELGUTH, K.; HASSEN, A.; AOUNI, M. Comparative study of four extraction methods for enterovirus recovery from wastewater and sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 414-419, 2006.

BERMAN, D. G. B.; SAFFERMAN, R. S. A method for recovering viruses from sludge. **Journal of Virological Methods**, v. 3, p. 283-291, 1981.

BERG, G.; SAFFERMAN, R. S.; DHALING, D. R.; BERMAN, D.; HURST, C. J. U.S. EPA Manual of Methods for Virology. **EPA-600/ 4-84-013**. Cincinnati, OH: U.S. Environmental Protection Agency, 1984.

BIRCH, C. J.; RODGER, S. M.; MARSHALL, J. A.; GUST, I. D. Replication of human rotavirus in cell culture. **Journal of Medical Virology**, v. 11, p. 241–250, 1983.

BITTON, D. Pathogens and parasites in domestic wastewater. In: **Wastewater microbiology**. 2nd. ed. New York: Wiley-Liss, 1997. Chapter 4.

BLACKMER, F.; REYNOLDS, K. A.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Use of integrated cell culture-PCR to evaluate the effectiveness of inactivation by chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2267–2268, 2000.

BOFILL-MAS, S.; ALBINA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GIRONES, R. Quantification and stability of human Adenovirus and Polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7894-7896, 2006.

BONNET, B. R. P.; LARA, A. I.; DOMASZAK, S. C. Indicadores biológicos de qualidade sanitária do lodo de esgoto. In: ANDREOLI, C. V.; BONNET, B. R. P. **Manual de métodos para análises microbiológicas e parasitológicas em reciclagem agrícola de lodo de esgoto**. Curitiba: Sanepar, 1998, 80 p.

BONNET, M. C.; DUTTA, A. World wide experience with inactivated poliovirus vaccine. **Vaccine**, v. 26, p. 4978–4983, 2008.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; NOORDAA, J. VAN DER. Rapid and Simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BORCHARDT, M. A.; BERTZ, P. D.; SPENCER, S. K.; BATTIGELLI, D. A. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1172-1180, 2003.

BOSCH, A.; PINTO, R. M.; ABAD, P. X. Differential accumulation and depuration of human enteric viruses by mussels. **Water Science & Technology**, v. 31, n. 5-6, p. 447-451, 1995.

BÖTTIGER, M.; HERRSTRÖM, E. Isolation of polioviruses from sewage and their characteristics: experience over two decades in Sweden. **Scand. Journal Infections Disease**, v. 24, p. 151-155, 1992.

BRASHEAR, D. A.; WARD, R. L. Comparison of methods for recovering indigenous viruses from raw wastewater sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1413-1418, 1982.

BROWN, M. Laboratory identification of adenoviruses associated with gastroenteritis in Canada from 1983 to 1986. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1525–1529, 1990.

BROWN, E. A.; DAY, S. P.; JANSEN, R. W.; LEMON, S. M. Genetic variability within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA. Implications for secondary structure and function. **Journal of Hepatology**, v. 13, Suppl. 4, p. S138-143, 1991.

BROWN, E. A.; ZAJAC, A. J.; LEMON, S. M. In vitro characterization of an internal ribosomal entry sites (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. **The Journal of Virology**, v. 68, n. 2, p. 1066-1074, 1994.

BROWN, M.; GRYSDUK, J. D.; FORTSAS, E.; PETRIC, M. Structural features unique to enteric adenoviruses. **Archives of Virology Supplementum**, v. 12, p. 301–307, 1996.

BURLENSON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. Plaque assay. In: **Virology: a laboratory manual**. San Diego: Academic press, 1992, p. 74-84.

BURTON, A.; DUDDING, M.; STANLEY, C.; WAGNER, M. D.; ZELLER, J. A.; GMELICH, J. T.; FRENCH, G. R.; TOP, F. H. Jr. Fatal pneumonia associated with adenovirus type 7 in three military trainees. **The New England Journal of Medicine**, v. 286, p. 1289-1291, 1972.

CAMMACK, N.; PHILLIPS, A.; DUNN, G.; PATEL, V.; MINOR, P. D. Intertypic genomic rearrangements of poliovirus strains in vaccinees. **Virology**, v. 167, p. 507–514, 1988.

CARDUCCI, A.; MORICI, P.; PIZZI, F.; BATTISTINI, R.; ROVINI, E.; VERANI, M. Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. **Water Science & Technology**, p. 893-897, 2008.

CASAN – Companhia Catarinense de Águas e Saneamento. **ETE - Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários**, 2005. Disponível em: <www.casan.com.br>. Acesso em: 10 junho 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Poliomyelitis prevention in the United States: introduction of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral polovirus vaccine; Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control**, v. 46, p. 1–25, 1997.

CHAGAS, W. F. **Estudo de patógenos e metais em lodo digerido bruto e higienizado para fins agrícolas, das estações de tratamento de esgotos da Ilha do Governador e da Penha no estado do Rio de Janeiro**. 2000. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz/Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2000.

CHAN, M. The World Health Organization. **The case for completing polio eradication**, 2008. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/caseforpolioeradication.asp>>. Acesso em: 26 junho 2008.

CHANY, C.; LEPINE, P.; LELONG, M.; VIN, L. T.; STAGE, P. Severe and fatal pneumonia in infants and young children associated with adenovirus infections. **American Journal of Hygiene**, v. 67, p. 367-378, 1958.

CHAPRON, C. D.; BALLESTER, N. A.; FONTAINE, J. H.; FRADES, C. N.; MARGOLIN, A. B. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenoviruses types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2520-2525, 2000.

CHAPRON, C. D.; BALLESTER, N. A.; MARGOLIN, A. B. The detection of astrovirus in sludge biosolids using an integrated cell culture nested PCR technique. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 11-15, 2000.

CHO, H. B.; LEE, S.; CHO, J.; KIM, S. Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 417-424, 2000.

CHUMAKOV, K. M.; VOROSHILOVA, M.; SHINDAROV, L.; LAVROVA, I.; GRACHEVA, L.; KOROLEVA, G.; VASILENKO, S.; BRODVAROVA, I.; NIKOLOVA, M.; GYUROVA, S.; GACHEVA, M.; MITOV, G.; NINOV, N.; TSYLKA, E.; ROBINSON, I.; FROLOVA, M.; BASHKIRTSEV, V.; MARTIYANOVA, L.; RODIN, V. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. **Archives of Virology**, v. 60, p. 329-340, 1979.

CHUNG, H.; JAYKUS, L. A.; SOBSEY, M. D. Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3772-3778, 1996.

CLEMENS, S. A. C.; FONSECA, J. C.; AZEVEDO, T.; CAVALCANTI, A.; SILVEIRA, T. R.; CASTILHO, M. C.; CLEMENS, R. Soroprevalência para hepatite A e B em quatro centros no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 1-10, 2000.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Resolução n. 375, de 29 de agosto de 2006. **Ministério do Meio Ambiente**: Conselho Nacional do Meio Ambiente, Diário Oficial da União, p. 141-146, 30 agosto 2006.

CONYN-VAN SPAENDONCK, M. A. E.; OOSTVOGEL, P. M.; VAN LOON, A. M.; VAN WIJNGAARDEN, J. K.; KROMHOUT, D. Circulation of poliovirus during the poliomyelitis outbreak in the Netherlands in 1992-1993. **American Journal of Epidemiology**, v. 143, p. 929-935, 1996.

COSTA, A. N.; RODRIGUES, C.; TELES, C. R.; KROHLING, B. Reciclagem agrícola do lodo de lagoas de estabilização. In: GONÇALVES, R. F. **Gerenciamento do lodo de lagoas de estabilização não mecanizadas**. Rio de Janeiro: ABES, 1999, p. 69-76.

COSTA-MATTIOLI, M.; FERRE, V.; CASANE, D.; PEREZ-BERCOFF, R.; COSTE-BUREL, M.; IMBERT-MARCILLE, B. M.; ANDRE, E. C.; BRESSOLLETTE-BODIN, C.; BILLAUDEL, S.; CRISTINA, J. Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. **Virology**, v. 311, n. 1, p. 51-59, 2003.

CRABTREE, K. D.; GERBA, C. P.; ROSE, J. B.; HAAS, C.N. Waterborne adenovirus: a risk assessment. **Water Science & Technology**, v.35, n. 11-12, p. 1-6, 1997.

CROCI, L.; LOSIO, M. N.; SUFFREDINI, E.; PAVONI, E.; PASQUALE, S.; FALLACARA, F.; ARCANGELI, G. Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 252–257, 2007.

CROMEANS, T. L.; NAINAN, O. V.; MARGOLIS, H. S. Detection of Hepatitis A Virus RNA in Oyster Meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2460-2463, 1997.

CUTHBERT, J. A. Hepatitis A: old and new. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p. 38-58, 2001.

DAHLING, D. R.; WRIGHT, B. A. A comparison of recovery of virus from wastewaters by beef extract-celite, ferric chloride, and filter concentration procedures. **Journal of Virological Methods**, v. 22, p. 337–346, 1988.

DAMASCENO, S; CAMPOS, J. R. Caracterização de lodo de estação de tratamento de esgotos sanitários para uso agrícola. In: ASOCIACION PERUANA DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, GESTIÓN AMBIENTAL EN EL SIGLO XXI, AIDIS, 26, 1998, LIMA. **Anais Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental**. Lima: 1-5 nov. 1998, p.1-8.

DE JONG, J. C.; WERMENBOL, A. G.; VERWEIJ-UIJTERWAAL, M. W.; SLATERUS, K. W.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.; VAN DOORNUM, G. J.; KHOO, S. H.; HIERHOLZER, J. C. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3940–3945, 1999.

DE PAULA, V. S.; ARRUDA, M. E.; VITRAL, C. L.; GASPAR, A. M. C. Seroprevalence of viral hepatitis in Riverine Communities from the Western Region of the Brazilian Amazon Basin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1123-1128, 2001.

DE PAULA, V. S.; VILAR, L. M.; MORAIS, L. M.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; NIEL, C.; GASPAR, A. M. C. Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 29, p. 254-259, 2004.

DEDEPSIDIS, E.; KYRIAKOPOULOU, Z.; PLIAKA, V.; KOTTARIDI, C.; BOLANAKI, E.; LEVIDIOTOU-STEFANOY, S.; KOMIOTIS, D.; MARKOULATOS, P. Retrospective Characterization of a Vaccine-Derived Poliovirus Type 1 Isolate from Sewage in Greece. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 6697-6704, 2007.

DIETZ, V.; ANDRUS, J.; OLIVE, J. M.; COCHI, S.; DEQUADROS, C. Epidemiology and clinical characteristics of acute flaccid paralysis associated with non-polio enterovirus isolation—the experience in the Americas. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 73, p. 597-603, 1995.

ELNIFRO, E.; COOPER, R.; KLAPPER, P.; BAYLEY, A. PCR and restriction endonuclease analysis for rapid identification of human adenovirus subgenera. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2055-2061, 2000.

ENRIQUEZ, C. E.; HURST, C. J.; GERBA, C. P. Survival of enteric adenovirus 40 and 41 in Tap, sea, and was water. **Water Research**, v. 29, p. 2548-2553, 1995.

EPA-Environmental Protection Agency. **Standards for the disposal of sewage sludge**. Washington, DC: Federal Register, 1992, part 503, p. 9387-9404.

EPA-Environmental Protection Agency. **ICR microbial laboratory manual**. EPA 600R95178. Washington, DC: Federal Register, 1996. Disponível em: <<http://www.epa.gov/nerlcwww/icrmicro.pdf>>. Acesso em: 20 outubro 2008.

EPA-Environmental Protection Agency. **Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge**. Washington, DC: Federal Register, 2003, 625, R-92, part 503, appendix H, p. 150-165.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v. 252, p. 1643-1651, 1991.

ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiology Reviews**, v. 53, n. 4, p. 410 - 449, 1989.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds.). **Fields Virology**. 4th. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, cap. 54, v. 2, p. 1747-1785.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds.). **Fields Virology**. 4th. ed. Philadelphia: Lippincotti Williams & Wilkins, 2007.

FARRAH, S. R. Methods for concentration and recovery of viruses from wastewater sludges. In: RAO, V. C.; MELNICK, J. L. **Human viruses in sediments, sludges and soils**. Florida: CRC Press, 1987, chapter 7.

FEINSTONE, S. M.; GUST, I. D. Hepatitis A virus. In: MANDELL, G. L.; BENNET, J. E.; DOLIN, R. (eds.). **Principles and Practice of Infections Diseases**. 5th. ed. Churchill Livingstone, 2000, p. 1920-1940.

FERREIRA, C. T.; PEREIRA LIMA, J.; BARROS, F. C. Serum epidemiology Hepatitis A virus in two socioeconomically distinct populations groups of Porto Alegre. **Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva**, v. 15, p. 85-90. 1996.

FERREIRA, A. C.; ANDREOLI, C. V.; JÜRGENSEN, D. Destino final do lodo. In: ANDREOLI, C. V. **Uso e manejo de esgotos na agricultura**. Rio de Janeiro: ABES, 1999, p. 26-28.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. Adenoviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds.). **Fields Virology**. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 1996, p. 2149-2171.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H.; WOODE, G. N.; BRIDEGER, J. C.; DERRICK, J. M. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet**, v. 2, p. 61-63, 1974.

FLINT, S. J.; ENQUIST, L. W.; KRUG, R. M.; RACANIELLO, V. R.; SKALKA, A. M. Virus structure. In: FLINT, S. J.; ENQUIST, L. W.; KRUG, R. M.; RACANIELLO, V. R.; SKALKA, A. M. **Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington D.C.: ASM Press, 2000, p. 59-97.

FOCACCIA, R.; CONCEIÇÃO, O. J. G.; SETTE, J. R. H.; SABINO, E.; BASSIT, L.; NITRINI, D. R.; LOMAR, A. V.; LORENÇO, R.; SOUZA, F. V.; KIFFER, C. R. V.; SANTOS, E. B.; GONZALES, M. P.; SAÉZ-AQUEZAR, A.; RISCAL, J. R.; FISCHER, D. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 2, p. 269-284, 1998.

FORMIGA-CRUZ, M.; TOFIÑO-QUESADA, G.; BOFILL-MAS, S.; LEES, D.N.; HENSHILWOOD, K.; ALLARD, A. K.; CONDIN-HANSSON, A.-C.; HERNROTH, B. E.; VANTARAKIS, A.; TSIBOUXI, A.; PAPAPETROPOULOU, M.; FURONES, M. D.; GIRONES, R. Distribution of human viral contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden and the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5990–5998, 2002.

FORMIGA-CRUZ, M.; HUNDESA, A.; CASARES, P. C.; ALBIÑANA-GIMENEZ, N.; ALLARD, A.; GIRONES, R. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. **Journal of Virological Methods**, v. 125, p. 111-118, 2005.

FONG, T. T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2005.

FOY, H.M. Adenoviruses. In: EVANS, A. S.; KASLOW, R. A. (eds). 4th ed. **Viral infections of humans: epidemiology and control**. New York: Plenum Medical Book Company, 1997, p.119-138.

FRIEDRICH, F. Molecular evolution of oral poliovirus vaccine strains during multiplication in human and possible implications for global eradication of poliovirus. **Acta Virologica**, v. 44, p. 109-117, 2000.

FROST, F. J.; KUNDE, T. R.; CRAUN, G. F. Is contaminated groundwater an important cause of viral gastroenteritis in the United States? **Journal of Environmental Health**, v. 65, p. 9-14, 2002.

FURIONE, M.; GUILLOT, S.; OTELEA, D.; BALANANT, J.; CANDREA, A.; CRAINIC, R. Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine associated paralytic poliomyelitis. **Virology**, v. 196, p. 199–208, 1993.

GABUTTI, G.; DE DONNO, A.; BAGORDO, F.; MONTAGNA, M. T. Comparative survival of faecal and human contaminants and use of *Staphylococcus aureus* as an effective indicator of human pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 697-700, 2000.

GALLAGHER, E. M.; MARGOLIN, A. B. Development of an integrated cell culture—Real-time RT-PCR assay for detection of reovirus in biosolids. **Journal of Virological Methods**, v. 139, p. 195-202, 2007.

GAUSS-MULLER, V.; LOTTSPREICH, F.; DEINHARDT, F. Characterization of hepatitis A virus structural proteins. **Virology**, v. 155, p. 732–736, 1986.

GAVRILIN, G. V.; CHERKASOVA, E. A.; LIPSKAYA, G. Y.; KEW, O. M.; AGOL, V. I. Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. **Journal of Virology**, v. 74, p. 7381– 7390, 2000.

GAYOTTO, L. C.; QUARENTEI, A. A.; CABRAL, G. L. Soroepidemiologia das hepatites A e B nas regiões dos rios Biá e Alto Juruá, Amazônia Ocidental. **Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva**, v. 3, p. 106-112, 1984.

GERBA, C. P. Virus survival in wastewater treatment. In: GODDARD, M.; BUTLER, M. (eds.). **Viruses and waste water treatment**. United Kingdom: Pergamon Press, 1981, p. 39-48.

GERBA, C. P.; ROSE, J. B. Viruses in source and drinking water. In: **Drinking Water Microbiology**. New York: Springer-Verlag, 1990, p. 380-395.

GERBA, C. P.; NWACHUKU, N.; RILEY, K. R. Disinfection resistance of waterborne pathogens on the United States Environmental Protection Agency's Contaminate Candidate List (CCL). **Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua**, v. 52, p. 81- 94, 2003.

GERBA, C. P.; GRAMOS, D. M.; NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenoviruses 2 by UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5167-5169, 2003.

GERBA, C. P.; NWACHUKU, N.; RILEY, K. R. Disinfection resistance of waterborne pathogens on the United States Environmental Protection Agency's Contaminate Candidate List (CCL). **Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA**, v. 52, p. 81–94, 2003.

GIRONES, R.; PUIG, M.; ALLARD, A.; LUCENA, F.; WADELL, G.; JOFRE, J. Detection of adenovirus and enterovirus by PCR amplification in polluted waters. **Water Science & Technology**, v. 31, p. 351–357, 1995.

GIRONES, R. Tracking Viruses That Contaminate Environments. **Microbe**, v. 1, n. 1, p. 19-25, 2006.

GLASS, R. I.; KILGORE, P. E.; HOLMAN, R. C.; JIN, S.; SMITH, J. C.; WOODS, P. A.; CLARKE, M. J.; MEI SHANG H.; GENTSCH, J. The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden. **Journal Infections Disease**, v. 174, p. S5-S11, 1996.

GOFTI-LAROCHE, L.; GRATACAP-CAVALLIER, B.; GENOULAZ, O.; JORET, J. C.; HARTEMAN, P. H.; SEIGNEURIN, J. M.; ZMIROU, D. A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study). **Water Science & Technology**, v. 43, p. 39-48, 2001.

GOMES, S. A.; CANDEIAS, J. A.; MONTEIRO, S. P.; PEREIRA, H. G.; NIEL, C. New genome types of adenovirus types 1, 3, and 5 isolated from stools of children in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1022–1026, 1989.

GONÇALVES, R. F. Introdução ao gerenciamento do lodo das lagoas de estabilização. In: GONÇALVES, R. F. **Gerenciamento do lodo de lagoas de estabilização não mecanizadas**. Rio de Janeiro: ABES, 1999a, p. 2-5.

_____. Formação de lodos em lagoas de estabilização anaeróbias ou facultativas primárias. In: GONÇALVES, R. F. **Gerenciamento do lodo de lagoas de estabilização não mecanizadas**. Rio de Janeiro: ABES, 1999b, p. 7-24.

GONÇALVES, R. F.; LIMA, M. R. P.; PASSAMANI, F. R. F. Características físico-químicas e microbiológicas do lodo de lagoas. In: GONÇALVES, R. F. **Gerenciamento do lodo de lagoas de estabilização não mecanizadas**. Rio de Janeiro: ABES, 1999, p. 25-37.

GREEN, J.; HENSILWOOD, K.; GALLIMORE, C. I.; BROWN, D. W. G.; LEES, D. N. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small roundstructured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 858–863, 1998.

GREENING, G. E.; HEWITT, J.; LEWIS, G. D. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 745–750, 2002.

GRIFFIN, D. W.; DONALDSON, K. A.; PAUL, J. H.; ROSE, J. B. Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clinical Microbiological Review**, v. 16, p. 129–143, 2003.

GU, Z.; BELZER, S. W.; GIBSON, C. S.; BANKOWSKI, M. J.; HAYDEN, R. T. Multiplexed, real-time PCR for quantitative detection of human adenovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4636–4641, 2003.

GUEDES, M. C. **Ciclagem de nutrientes após aplicação de lodo de esgoto (biossólido) sobre latossolo cultivado com *Eucalyptus Grandis***. 2005. 154 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2005.

HÄFLIGER, D.; HÜBNER, P. H.; LÜTHY, J. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 123-126, 1999.

HALLEY, E.; MILLER, G. A "backward" approach to sludge management. **Water Engineering & Management**, v. 9, p. 36-39, 1991.

HALSEY, N. A.; PINTO, J.; ESPINOSA-ROSALES, F.; FAURE-FONTENLA, M. A.; DA SILVA, E.; KHAN, A. J.; WEBSTER, A. D.; MINOR, P.; DUNN, G.; ASTURIAS, E.; HUSSAIN, H.; PALLANSCH, M. A.; KEW, O. M.; WINKELSTEIN, J.; SUTTER, R. Search for poliovirus carriers among people with primary immune deficiency diseases in the United States, Mexico, Brazil and the United Kingdom. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 1, p. 3-8, 2004.

HEIM, A.; EBNET, C.; HARSTE, G.; PRING-AKERBLOM, P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. **Journal of Medical Virology**, v. 70, n. 2, p. 228–239, 2003.

HERNROTH, B. E.; CONDÉN-HANSSON, A. C.; REHNSTAM-HOLM, A. S.; GIRONES, R.; ALLARD, A. K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4523-4533, 2002.

HIERHOLZER, J. Adenoviruses. In: LENNETTE, E. H.; LENNETTE, D. A.; LENNETTE, E. T. (eds). **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. 7th. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995, p. 169-188.

HIGUCHI, R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: ERLICH, H. A. (ed.). **PCR technology**. New York: W. H. Freeman and Co., 1992, p. 31-38.

HOLLINGER, F. B.; TICEHURST, J. Hepatitis A virus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (eds.). **Virology**. 3rd. ed. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven, 1996, v.1, p. 735-782.

HONG, B. C.; SEUNG-HOON, L.; JANG-CHEON, C.; SANG-JONG, K. Detection of adenovirus and enterovirus in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 417-424. 2000.

HORIE, H.; YOSHIDA, H.; MATSUURA, K.; MIYAZAWA, M.; WAKABAYASHI, K.; NOMOTO, A.; HASHIZUME, S. Isolation of vaccine-derived type 1 polioviruses displaying similar properties to virulent wild strain Mahoney from sewage in Japan. **Journal of Medical Virology**, v. 68, p. 445–451, 2002.

HORWITZ, M.S. Adenoviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds.). **Virology**. 3rd. ed. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven, 1996, v. 2, p. 2149-2171.

HORWITZ, M. S. Adenoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, R. M. (eds). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, p. 2301–2326, 2001.

HOVI, T.; CANTELL, K.; HUOVILAINEN, A.; KINNUNEN, E.; KURONEN, T.; LAPINLEIMU, K.; PÖYRY, T.; ROIVAINEN, M.; SALAMA, N.; STENVIK, M.; SILANDER, A.; THODEN, C.-J.; SALAMINEN, S.; WECKSTRÖM, P. Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population. **Lancet**, p. 1427–1432, 1986.

HUNDESA, A.; DE MOTES, C. M.; BOFILL-MAS, S.; ALBIÑANA-GIMENEZ, N.; GIRONES, R. Identification of Human and Animal Adenoviruses and Polyomaviruses for Determination of Sources of Fecal Contamination in the Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 7886-7893, 2006.

HURST, C. J.; FARRAH, S. R.; GERBA, C. P.; MELNICK, J. L. Development of quantitative methods for the detection of enteroviruses in sewage sludges during activation and following land disposal. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 81-89, 1978.

HURST, C. J.; DAHLING, D. R.; SAFFERMAN, R. S.; GOYKE, T. Comparison of commercial beef extracts and similar materials for recovering viruses from environmental samples. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 1253–1263, 1984.

HURST, C. J.; GOYKE, T. Improved method to recovery of enteric viruses from wastewater sludges. **Water Research**, v. 20, p. 1321-1324, 1986.

HURST, C.J. Detection of viruses in environmental waters, sewage and sewage sludges. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNY, M. J.; STETZENBACH, L. D; WALTER, M. V (eds.) **Manual of Environmental Microbiology**. Washington DC: ASM Press, p. 168-175, 1991.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional de saneamento básico 2000**, 2002, p. 1 – 397.

ILHENFELD, R. G. K.; PEGORINI, E. S.; ANDREOLI, C. V. Fatores limitantes. In: ANDREOLI, C. V. **Uso e manejo de esgotos na agricultura**. Rio de Janeiro: ABES, 1999, p. 46-63.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segretation. **Journal of Virology**, v. 76, n. 13, p. 6596-6601, 2002.

JAKUBOWSKI, W.; HOFF, J. C.; ANTHONY, N. C.; HILL, W. F. Jr. Epoxy-fiberglass adsorbent for concentrating viruses from large volumes of potable water. **Applied Microbiology**, v. 28, p. 501-502, 1974.

JAYKUS, L. A.; DE LEON, R.; SOBSEY, M. D. Human enteric pathogenic viruses. In: HACKNEY, C. R.; PIERSON, M. D. **Environmental indicators of shellfish safety**. New York: Chapman & Hall, 1994. p. 92-153.

JIANG, S.; NOBLE, R.; CHUI, W. P. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 179–184, 2001.

JIANG, Y. -J.; LIAO, G. Y.; ZHAO, W.; SUN, M.-B.; QIAN, Y.; BIAN, C.-X.; JIANG, S. D. Detection of infectious Hepatitis A virus by integrated cell culture/strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1105–1112, 2004.

JOFRE, J.; BLASI, M.; BOSCH, A.; LUCENA, F. Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* and other viruses in polluted marine sediments. **Water Science & Technology**, v. 21, p. 15–19, 1989.

JOHNSON, R. A.; ELLENDER, R. D.; TSAI, S. Elution of enteric viruses from mississippi estuarine sediment with lecithin-supplemented eluents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 581-585, 1984.

JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T. L.; SOBSEY, M. D.; ROBERTSON, H. Development and Evaluation of a Broadly Reactive TaqMan Assay for Rapid Detection of Hepatitis A Virus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3359–3363, 2005.

KAPIKIAN, A. Z.; WYATT, R.G. **Textbook of pediatric infectious diseases**. 3rd. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1992, v. 1, p. 667-676.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds). **Fields Virology**. 4th. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p. 1787-1833.

KATZENELSON, E.; FATTAL, B.; HOSTOVESKY, T. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, p. 638–639, 1976.

KEW, O. M.; WRIGHT, P. F.; AGOL, V. I.; DELPEYROUX, F.; SHIMIZU, H.; NATHANSON, N.; PALLANSCH, M. A. Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, p. 16-23, 2004.

KEW, O. M.; SUTTER, R. W.; DE GOURVILLE, E. M.; DOWDLE, W. R.; PALLANSCH, M. A. Vaccine-derived poliovirus and the endgame strategy for global polio eradication. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, p. 587–635, 2005.

KHUROO, M. S. Viral hepatitis in international travellers: risks and prevention. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 2, p. 143-52, 2003.

KIDD, A. H.; JONSSON, M.; GARWICZ, D.; KAJON, A. E.; WERMENBOL, A. G.; VERWEIJ, N. W.; JONG, J. C. Rapid subgenus identification of human adenovirus isolates by a general PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 662-627, 1996.

KINCHINGTON, D.; KANGRO, H.; JEFFRIES, D. J. Design and testing of antiviral compounds. In: DESSELBERGER, U. **Medical Virology: a practical approach**. New York: OIRL Press, 1995, p. 153-154.

KINGSLEY, D. H.; RICHARDS, G. P. Rapid and efficient extraction method for reverse transcriptase-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-Like viruses in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4152–4154, 2001.

KITTIGUL, L.; EKCHALOEMKIET, S.; UTRARACHKIJ, F.; SIRIPANICHGON, K.; SUJIRARAT, D.; PUNGCHITTON, S.; BOONTHUM, A. An efficient virus concentration method and RT-nested PCR for detection of rotaviruses in environmental water samples. **Journal of Virological Methods**, v. 124, p. 117–122, 2005.

KO, G.; CROMEANS, T. L.; SOBSEY, M. D. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcriptase-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 7377–7384, 2003.

KOCWA-HALUCH, R. Waterborne enteroviruses as a hazard for human health. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 10, p. 485–487, 2001.

KWOK, S.; EHRLICH, G.; POIESZ, B.; KALISH, R.; SNINSKY, J. Enzymatic amplification of HTLV-I viral sequences from peripheral blood mononuclear cells and infected tissues. **Blood**, v. 72, p. 1117–1123, 1988.

LARA, I. A. Antecedentes. In: ANDREOLI, C. V.; LARA, A. I.; FERNANDES, F. **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções**. Curitiba: Sanepar, 1999, 288 p.

LARRANAGA, C.; KAJON, A.; VILLAGRA, E.; AVENDANO, L. F. Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower respiratory infections in Chile (1988-1996). **Journal of Medical Virology**, v. 60, p. 342-346, 2000.

LARZUL, D.; GUIGUE, F.; SNINSKY, J.; MACK, D.; BREHOT, C.; GUESDON, J. Detection of hepatitis B virus sequences in serum by using in vitro enzymatic amplification. **Journal of Virological Methods**, v. 20, p. 227–237, 1988.

LAURE, F.; COURGNAUD, V.; ROUZIOUX, C.; BLANCHE, S.; VEBER, F.; BURGARD, M.; JACOMET, C.; GRISCELLI, C.; BREHOT, C. Detection of HIV1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. **Lancet**, v. 2, n. 8610, p. 538–541, 1988.

LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; MIOSSEC, L.; DUBOIS, E.; POMMEPUY, M. Three-Year study to assess human enteric viruses in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3241-3248, 2000.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 371-409, 2002.

LEE, H. K.; JEONG, Y. S. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3632-3636, 2004.

LEE, J. C.; LEE, L. L. Y. Referential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 625-631, 1981.

LEE, S.-H.; LEE, C.; LEE, K. W.; CHO, H. B.; KIM, S.-J. The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture-multiplex-nested PCR procedure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1020-1029, 2005.

LESS, D. N. Viruses and bivalve shellfish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 81-116, 2000.

LEWIS, G. D.; METCALF, T. G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A and human rotavirus from oyster, water and sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1983-1988, 1988.

LI, J.; ZHANG, L. B.; YONEYAMA, T.; YOSHIDA, H.; SHIMIZU, H.; YOSHII, K.; HARA, M.; NOMURA, T.; YOSHIKURA, H.; MIYAMURA, T.; HAGIWARA, A. Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients. **Archives of Virology**, v. 141, p. 1047-1054, 1996.

LI, L.; PHAN, T. G.; NGUYEN, T. A.; KIM, K. S.; SEO, J. K.; SHIMIZU, H.; SUZUKI, E.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Molecular epidemiology of Adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 2, p. 121-128, 2005.

LIPP, E. K.; KURZ, R.; VINCENT, R.; RODRIGUEZ-PALACIOS, C.; FARRAH, S. R.; ROSE, J. B. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. **Estuaries**, v. 24, p. 266-276, 2001.

LOGAN, K. B.; REES, G. E.; SEELY, N. D.; PRIMROSE, S. B. Rapid concentration of bacteriophages from large volumes of freshwater: Evaluation of positively charged, microporous filters. **Journal of Virological Methods**, v. 1, p. 87-97, 1980.

MACADAM, A. J.; FERGUSON, G.; ARNOLD, C.; MINOR, P. D. An assembly defect as a result of an attenuating mutation in the capsid proteins of poliovirus type 3 vaccine strain. **Journal of Virology**, v. 65, p. 5225–5231, 1991.

MACLENNAN, C.; DUNN, G.; HUISSOON, A. P.; KUMARARATNE, D. S.; MARTIN, J.; O'LEARY, P.; THOMPSON, R. A.; OSMAN, H.; WOOD, P.; MINOR, P.; WOOD, D. J.; PILLAY, D. Failure to clear persistent vaccine-derived neurovirulent poliovirus infection in an immunodeficient man. **Lancet**, v. 363, n. 9420, p. 1509-1513, 2004.

MARGOLIS, H. S. Viral hepatitis. In: WALLACE, R. B.; DOEBBELING, B. N. (eds.). **Maxcy-Rosenau-Last Public Health and Preventive Medicine**. 14th. ed. Stamford: Appleton & Lange, 2000, p. 174-188.

MATSUI, S. M.; GREENBERG, H. B. Astroviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds). **Fields Virology**. 3rd. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 1996, v. 2, p. 811-824.

MARTIN, J.; DUNN, G.; HULL, R.; PATEL, V.; MINOR, P. D. Evolution of the Sabin strain of type 3 poliovirus in an immunodeficient patient during the entire 637-day period of virus excretion. **Journal of Virology**, v. 74, p. 3001–3010, 2000.

MATTHEWS, P. J. Sewage sludge disposal in the UK: a new challenge for the next twenty years. **Journal of the Institution of Water Environmental Management**, v. 6, p. 551-559, 1992.

_____. Sustainability in biosolids management. **Water Science Technology**, Oxford, v. 38, p. 97-102, 1998.

MATTION, N. M.; MITCHELL, D. B. ; BOT, G. W. ; ESTES, M. K. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. **Virology**, v. 181, p. 295-304, 1991.

MEDEIROS, M. L. B.; SOCCOL, V. T.; CASTRO, E. A.; TOLEDO, E. B. S.; BORGES, J. C.; PAULINO, R. C.; SILVA, S. M. C. P.; ANDRAUS, S. Aspectos sanitários. In: ANDREOLI, C. V.; LARA, A. I.; FERNANDES, F. **Reciclagem de biosólidos: transformando problemas em soluções**. Curitiba: Sanepar, 1999, p. 120-179.

MEDEIROS, M. I. C.; NEME, S. N.; SILVA, P.; CAPUANO, D. M.; ERRERA, M. C.; FERNANDEZ, S. A.; VALLE, G. R.; AVILA, F. A. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 21-24, 2001.

MEHNERT, D. U.; STEWIEN, K. E. Detection and Distribution of Rotavirus in Raw Sewage and Creeks in Sao Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 140-143, 1993.

MEHNERT, D. U.; STEWIEN, K. E.; HÁRSI, C. M.; QUEIROZ, A. P. S.; CANDEIAS, J. M. G.; CANDEIAS, J. A. N. Detection of Rotavirus in Sewage and Creek Water: Efficiency of the Concentration Method. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 97-100, 1997.

MELNICK, J. L. Enterovirus type 71 infections: a varied clinical pattern sometimes mimicking paralytic poliomyelitis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, p. S387-S390, 1984.

_____. History and Epidemiology of hepatitis A vírus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, p. S2-S8, 1995.

_____. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds). **Fields Virology**. 3rd. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 1996, p. 655-712.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O.; MELO, V. P. O uso agrícola do biossólido e as propriedades do solo. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, M. O. **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001, p. 289-363.

MENG, Q. S.; GERBA, C. P. Comparative inactivation of enteric adenovirus, poliovirus and coliphages by ultraviolet irradiation. **Water Research**, v. 30, p. 2665-2668, 1996.

METCALF, T.G.; MELNICK, J. L.; ESTES, M. K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – a trip of over 50 years. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 461-487, 1995.

MIGNOTTE, B.; MAUL, A.; SCHWARTZBROD, L. Comparative study of techniques used to recover viruses from residual urban sludge. **Journal of Virological Methods**, v. 78, p. 71-80, 1999.

MIKI, K.; ANDRIGUETI, E. J.; SOBRINHO, P. A. Tratamento da fase sólida em estações de tratamento de esgotos. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, M. O. **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001, p. 41-87.

MINOR, P. D. Picornaviridae. In: FRANKI, R. I. B.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D. L.; BROWN, F. (eds). **Classification and Nomenclature of Viruses: the Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Vienna: Springer Verlag, 1991, p. 320-326.

_____. The molecular biology of poliovaccines. **The Journal of General Virology**, v. 73, p. 3065-3077, 1992.

_____. Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelites. **Molecular Medicine**, 1999. Disponível em: <www.freemedicaljournals.com>. Acesso em: 30 junho 2007.

MIYAMURA, K.; YAMASHITA, K.; YAMADERA, S.; KATO, N.; AKATSUKA, M.; HARA, M.; INOUE, S.; YAMAZAKI, S. Poliovirus surveillance: isolation of polioviruses in Japan, 1980–1991. A report of the National Epidemiological Surveillance of Infectious Agents in Japan. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, v. 45, p. 203-214, 1992.

MODLIN, J. F. Introduction. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. (eds.). **Principles and practice of infectious diseases**. 4th. ed. New York : Churchill Livingstone, 1995, p. 1606-1613.

MONPOEHO, S.; MAUL, A.; MIGNOTTE, 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2484-2488, 2001.

MONPOEHO, S.; COSTE-BUREL, M.; COSTA-MATTIOLI, M.; BESSE, B.; CHOMEL, J. J.; BILLAUDEL, S.; FERRE, V. Application of a real-time polymerase chain reaction with internal positive control for detection and quantification of enterovirus in cerebrospinal fluid. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 7, p. 532–536, 2002.

MONPOEHO, S.; MAUL, A.; BONNIN, C.; PATRIA, L.; RANARIJAONA, S.; BILLAUDEL, S.; FERRÉ, V. Clearance of Human-Pathogenic Viruses from Sludge: Study of Four Stabilization Processes by Real-Time Reverse Transcription-PCR and Cell Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5434-5440, 2004.

MONTGOMERY, M. A.; ELIMELECH, M. Water and sanitation in developing countries: including health in the equation. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 17-24, 2007.

MUIR, P.; KAMMERER, U.; KORN, K.; MULDER, M. N.; POYRY, T.; WEISSBRICH, B.; KANDOLF, R.; CLEATOR, G. M.; VAN LOON, A. N. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 202-227, 1998.

MULLER-WEGENER, U. Interaction of humic substances with biota. In: FRIMMEL, F. H.; CHRISTMAN, R. F. (eds.). **Humic substances and their role in the environment**. New York: John Wiley & Sons, p. 179-192, 1988.

MUNIAIN-MUJICA, J.; GIRONES, R.; TOFINO-QUESADA, G.; CALVO, M.; LUCENA, F. Depuration dynamics of viruses in shellfish. **Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 125-133, 2002.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. (eds.). **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. 6th. ed. Austria: Springer-Verlag, p. 128-133, 1995.

NAINAN, O.V.; XIA, G.; VAUGHAN, G.; MARGOLIS, H. S. Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 63-79, 2006.

NEIVA, M. R. Reciclagem agrícola de biossólidos da ETE Cetrel – uma experiência ambientalmente correta. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA AMBIENTAL, 20, 1999, Rio de Janeiro. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 477-479.

NEWMAN, J. F. E.; BROWN, F.; JANICE, C.; BRIDGER, J. C.; WOODE, G. N. Characterization of a rotavirus. **Nature**, v. 258, p. 631-633, 1975.

NIELSEN, A. I.; LYDHOLM, B. Methods for the isolation of virus from raw and digested wastewater sludge. **Water Research**, v. 14, p. 175-178, 1980.

NORRBY, E. The structural and functional diversity of Adenovirus capsid components. **The Journal of General Virology**, v. 5, p. 221-236, 1969.

NUANUALSUWAN, S.; CLIVER, D. O. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 104, p. 217–225, 2002.

OLIVEIRA, L. H. S.; YOSHIDA, C. F. T.; MONTEIRO, S. S.; CÂMARA, F. P. Seroepidemiologic survey for hepatitis A and B markers in health care students from Public University of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Microbiologia de São Paulo**, v. 22, p. 226–231, 1991.

OOSTVOGEL, P. M.; VAN WIJNGAARDEN, J. K.; VAN DER AVOORT, H. G.; MULDER, M. N.; CONYN-VAN SPAENDONCK, M. A.; RUMKE, H. C.; VAN STEENIS, G.; VAN LOON, A. M. Poliomyelitis outbreak in an unvaccinated community in The Netherlands, 1992–93. **Lancet**, v. 344, p. 665–670, 1994.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Las condiciones de la salud en las américas**. Washington: OPAS, 1994, v. 1, p. 55-152.

OTAWA, K.; LEE, S. H.; YAMAZOE, A.; ONUKI, M.; SATOH, H.; MINO, T. Abundance, Diversity, and Dynamics of Viruses on Microorganisms in Activated Sludge Processes. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 143–152, 2007.

PALLANSCH, M. A.; SANDHU, H. S. The eradication of polio—progress and challenges. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 2508-2511, 2006.

PANNUTI, C. S.; MENDONÇA, J. S.; CARVALHO, M. J. M.; OSELKA, G. W.; AMATO NETO, V. Hepatitis antibodies in two socio-economically distinct populations of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, p. 162-164, 1985.

PARASHAR, U. D.; HUMMELMAN, E. G.; BRESEE, J. S.; MILLER, M. A.; GLASS, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 565, 2003.

PAVLOV, D. N.; VAN ZYL, W. B.; VAN HEERDEN, J.; GRABOW, W. O. K.; EHLERS, M. M. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in sewage and river water in South Africa. **Water Research**, v. 39, p. 3309–3319, 2005.

PAYMENT, P.; TRUDEL, M. Detection and health risk associated with low virus concentration in drinking water. **Water Science & Technology**, v. 17, p. 97–103, 1985.

PEREIRA, F. E. L.; GONÇALVES, C. S. Hepatite A. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 387-400, 2003.

PINA, S.; PUIG, M.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRONES, R. Viral pollution in the environmental and shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3376-3382, 1998.

PINHO, J. R. R.; SUMITA, L. M.; MOREIRA, R. C.; SOUZA, V. A. F.; SARACENI, C. P.; OBA, I. T.; CARVALHO, M. C. S.; PANNUTI, C. S. Duality of patterns in hepatitis A epidemiology: a study involving two socioeconomically distinct populations in Campinas, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 105-106, 1998.

PINTÓ, R. M.; GAJARDO, R.; ABAD, F. X.; BOSCH, A. Detection of fastidious infectious enteric viruses in water. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 2636-2638, 1995.

PINTÓ, R. M.; ALEGRE, D.; DOMÍNGUEZ, A.; EL-SENOUSY, W. M.; SÁNCHEZ, G.; VILLENA, C.; COSTAFREDA, M. I.; ARAGONÈS, L.; BOSCH, A. Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. **Epidemiology and Infection**, v. 135, p. 270-273, 2007.

PÖYRY, T.; STENVIK, M.; HOVI, T. Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 371–374, 1988.

PRASAD, B. V. V.; CHIU, W. Structure of rotavirus. In: RAMIG, R. F. (ed.). **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1994, v. 185, p. 1-27.

PROBST, C.; JECHT, M.; GAUSS-MULLER, V. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles: role of structural proteins VP4 and 2A. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 4527-4531, 1999.

PUIG, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; ALLARD, A.; WADELL, G.; GIRONES, R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 2963-2970, 1994.

QUEIRÓZ, D. A. O.; CARDOSO, D. D. P.; MARTELLI, C. M. T.; MARTINS, R. M. B.; PORTO, S. O. B.; AZEVEDO, M. S. P.; BORGES, A. M. T.; DAHER, R. R. "Risk factor and prevalence of antibodies against hepatitis A virus (HAV) in children from day-care centers, in Goiania, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 427-433, 1995a.

QUEIRÓZ, D. A. O.; CARDOSO, D. D. P.; MARTELLI, C. M. T.; MARTINS, R. M. B.; PORTO, S. O. B.; AZEVEDO, M. S. P.; BORGES, A. M. T.; DAHER, R. R. “Soroepidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite A em “Meninos de/na Rua” de Goiânia-Goiás”. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, p. 199-203, 1995b.

QUEIROZ, A. P. S.; SANTOS, F. M.; SASSAROLI, A.; HÁRSI, C. M.; MONEZI, T. A.; MEHNERT, D. U. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4614-4618, 2001.

REYNOLDS, K. A.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1424-1427, 1996.

REYNOLDS, K. S.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Rapid PCR-based monitoring of infectious enteroviruses in drinking water. **Water Science & Technology**, v. 35, p. 423-427, 1997.

REYNOLDS, K. A.; GERBA, C. P.; ABBASZADEGAN, M.; PEPPER, I. L. ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A in environmental samples. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p. 153-157, 2001.

REYNOLDS, K. A. Integrated cell culture/PCR for detection of enteric viruses in environmental samples. **Methods in Molecular Biology**, v. 268, p. 69-78, 2004.

RICHARDS, G. P. Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 6, p. 691-697, 1999.

RIGOTTO, C.; SINCERO, T. C. M.; BARARDI, C. R. M. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC-PCR). **Water Research**, v. 39, p. 297-304, 2005.

ROBERTS, R. J.; SHARP, P. A. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine**, 1993. Disponível em: < www.nobel.se/medicine/education/poster/1993/genes-in-pieces.html>. Acesso em: 06 novembro 2008.

ROBERTSON, B. H.; JANSEN, R. W.; KHANNA, B.; TOTSUKA, A.; NAINAN, O. V.; SIEGL, G.; WIDELL, A.; MARGOLIS, H. S.; ISOMURA, S.; ITO, K.; ISHIZU, T.; MORITSUGU, Y.; LEMON, S. M. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. **The Journal of General Virology**, v. 73, p. 1365-1377, 1992.

ROCHA, G. N.; GONÇALVES, J. L. M.; MOURA, I. M. Mudanças da fertilidade do solo e crescimento de um povoamento de *Eucalyptus grandis* fertilizado com biossólido. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 623-639, 2004.

ROMERO, R. J.; ROTBART, A. H. Detection of the human enteroviruses. In: PERSHING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. C. **Diagnostic Molecular Microbiology: principles and applications**. Washington DC: American Society for Microbiology, 1993, p. 401-406.

ROTBART, H. A. Nucleic acid detection system for enteroviruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 2, p. 156-158, 1991.

RUSIN, P.; ENRIQUEZ, C. E.; JOHNSON, D.; GERBA, C. P. Environmentally transmitted pathogens. In: MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. (eds.). **Environmental Microbiology**. San Diego: Academic Press, 2000, p. 447-85.

SABACK, F. L.; PALMER, T. E.; SABINO, R. R.; CARVALHO, S. M.; AMORIM, L. M.; GASPAR, A. M.; OLIVEIRA, M. L.; YOSHIDA, C. F.; NIEL, C. Infection with hepatitis A and TT viruses and socioeconomic status in Rio de Janeiro, Brazil. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 33, p. 121-125, 2001.

SAFFERMAN, R. S.; ROHR, M. E.; GOYKE, T. Assessment of recovery efficiency of beef extract reagents for concentrating viruses from municipal wastewater sludge solids by the organic flocculation procedure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 309-316, 1988.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; HA, E. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. (eds.). 2. ed. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, v. 1-3, 372 p.

SANEPAR. Companhia de Saneamento do Paraná. **Manual Técnico para Utilização Agrícola do lodo de esgoto no Paraná**, 1997. 96 p.

SANO, D.; FUKUSHI, K.; YOSHIDA, Y.; OMURA, T. Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. **Water Research**, v. 37, p. 3490–3498, 2003.

SANTOS, A. C. P.; KRESPKY, K. (eds.). **Saneamento básico**. Gazeta Mercantil, 1998.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Reviews in Medical Virology**, v. 15, p. 29-56, 2005.

SATTAR, S. A. Viral survival in receiving waters. In: GODDARD, M.; BUTLER, M. (eds.). **Viruses and waste water treatment**. United Kingdom: Pergamon Press, 1981, p. 91-108.

SCHMITZ, H.; WIGAND, R.; HEINRICH, W. Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. **American Journal of Epidemiology**, v. 117, p. 455–466, 1983.

SCHOLZ, E.; HEINRICH, U.; FLEHMIG, B. Acid stability of hepatitis A virus. **The Journal of General Virology**, v. 70, p. 2481-2485, 1989.

SCHWARTZBROD, L. Virus humains et santé publique: Conséquence de l'utilisation des eaux usées et des boues en agriculture et conchyliculture. **Organisation Mondiale de la Santé, Genève**, v. 175, 1995.

SCHEUERMANN, P.; FARRAH, S. R.; BITTON, G. Development of a method for the recovery of enteroviruses from aerobically digested wastewater sludges. **Water Research**, v. 1, p. 15–19, 1986.

SCIPIONI, A.; DAUBE, G.; THIRY, E. Contamination of food and water by human pathogenic viruses. **Annales de Medecine Veterinaire**, v. 144, n. 4, p. 207-221, 2000.

SEYMOUR, I. J.; APPLETON, H. Foodborne viruses and fresh produce. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 759-773, 2001.

SHAW, R. D.; VO, P. T.; OFFIT, P. A.; COULSON, B. S.; GREENBERG, H. B. Antigenic mapping of the surface proteins of *Rhesus* rotavirus. **Virology**, v. 155, p. 434–451, 1986.

SHENK, T. Adenoviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds). **Fields Virology**. 3rd. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 1996, v. 2, p. 2111-2148.

SHIEH, Y. S. C.; CALCI, K. R.; BARIC, R. S. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4709-4714, 1999.

SILVA, C. J. C. da; LIMA, M. G. de S.; PEDROZA, M. M.; GOMES, L. de A.; SILVA, M. A. N. da. Estudo da viabilidade do uso de lodo em estações de despejos de curtume, como adubo orgânico, no cultivo do milho. In: XI SIMPÓSIO LUSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2004. **Anais do XI Simpósio Luso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Natal: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária, 2004.

SKRABER, S.; GASSILLOUD, B.; SCHWARTZBROD, L.; GANTZER, C. Survival of infectious poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and poliovirus-1 genome. **Water Research**, v. 38, p. 2927-2933, 2004.

SLATER, P. E.; ORENSTEIN, W. A.; MORAG, A.; AVNI, A.; HANDSHER, R.; GREEN, M. S.; COSTIN, C.; YARROW, A.; RISHPON, S.; HAVKIN, O.; BEN-ZVI, T.; KEW, O. M.; REY, M.; EPSTEIN, I.; SWARTZ, T. A.; MELNICK, J. L. Poliomyelitis outbreak in Israel in 1988: a report and two commentaries. **Lancet**, v. 335, p. 1192-1198, 1990.

SOARES, A. C.; STRAUB, T. M.; PEPPER, L. L.; GERBA, C. P. Effect of anaerobic digestion on the occurrence of enteroviruses and Giardia cysts in sewage sludge. **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control**, v. 29, p. 1887-1897, 1994.

SOARES, C. C.; VOLOTÃO, E. M.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; SILVA, F. M.; CARVALHO, T. R. B.; NOZAWA, C. M.; LINHARES, R. E.; SANTOS, N. Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. **Journal Clinical Virology**, v. 23, p. 171-177, 2002.

SOBRINHO, P. A. Tratamento de esgoto e geração de lodo. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, M. O. **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001, p. 7-40.

SOBSEY, M. D.; WARIS, C.; HENDERSON, M.; MELNICK, J. L. Concentration of enterovirus from large volumes of water. **Applied Microbiology**, v. 26, p.529-534, 1973.

SOBSEY, M. D.; BATTIGELLI, D. A.; SHIN, G. A.; NEWLAND, S. RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. **Water Science & Technology**, v. 38, p. 91-94, 1998.

SOCCOL, V. T.; PAULINO, R. C.; CASTRO, E. A. Metodologia de análise parasitológica em lodo de esgoto. In: ANDREOLI, C. V.; BONNET, B. R. P. **Manual de métodos para análises microbiológicas e parasitológicas em reciclagem agrícola de lodo de esgoto**. Curitiba: Sanepar, 1998, p. 27-35.

SOULE, H.; GENOULAZ, O.; GRATACAP-CAVILLIER, B.; CHEVALLIER, P.; JING-XING, L.; SEIGNEURIN, J. M. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. **Water Research**, v. 34, n. 3, p.1063-1067, 2000.

SPERLING, V. M. (ed.). **Lodos ativados: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: UFMG, 1997, 416 p.

STAUB, U.; POLIVKA, H.; GROSS, H. J. Two rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves rich in polyphenols and polysaccharides: application for sensitive detection of grapevine viroids. **Journal of Virological Methods**, v.52, p. 209–218, 1995.

STETLER, R. E.; MORRIS, M. E.; SAFFERMAN, R. S. Processing procedures for recovering enteric viruses from wastewater sludge. **Journal of Virological Methods**, v. 40, p. 67–75, 1992.

STETLER, R. E.; WALTRIP, S. C.; HURST, C. J. Virus removal and recovery in the drinking water treatment train. **Water Research**, v. 26, p. 727– 731, 1992.

STRAUB, T. M.; PEPPER, J. L.; ABBASZADEGAN, M.; GERBA, C. P. A method to detect enteroviruses in sewage sludge-amended soil using PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 1014-1017, 1994.

STRAUB, T. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Comparison of PCR and Cell Culture for Detection of Enteroviruses in Sludge-Amended Field Soils and Determination of Their Transport. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 2066–2068, 1995.

STRAZYNSKI, M.; KRAMER, J.; BECKER, B. Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 73– 78, 2002.

SWIERKOSZ, E. M. Nosocomial Viral Infections Revisited. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 23, n. 6, p. 43-48, 2001.

TAMBINI, G.; ANDRUS, J. K.; MARQUES, E.; BOSHELL, J.; PALLANSCH, M.; DE QUADROS, C. A.; KEW, O. Direct detection of wild poliovirus circulation by stool surveys of healthy children and analysis of community waste water. **Journal Infectious Diseases**, v. 168, p. 1510–1514, 1993.

TANO, Y.; SHIMIZU, H.; MARTIN, J.; NISHIMURA, Y.; SIMIZU, B.; MIYAMURA, T. Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live-attenuated Sabin strains. **Vaccine**, v. 25, p. 7041–7046, 2007.

TARTERA, C.; JOFRE, J. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1632–1637, 1987.

THOMPSON, K. M.; TEBBENS, R. J. Eradication versus control for poliomyelitis: an economic analysis. **Lancet**, v. 369, p. 1363-1374, 2007.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; HAAS, C. N.; JACANGELO, J.; GERBA, C. P. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 577-582, 2003a.

_____. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3979-3985, 2003b.

TRABELSI, A.; GRATTARD, F.; NEJMEDDINE, M.; BOURLET, T.; POZZETO, B. Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2454-2457, 1995.

TREE, J. A.; ADAMS, M. R.; LEES, D. N. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2083-2043, 2003.

TRINTA, K. S.; LIBERTO, M. I. M.; PAULA, V. S.; YOSHIDA, C. F. T.; GASPAR, A. M. C. Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 25-29, 2001.

TSUTIYA, M. T. Tecnologias emergentes para a disposição final de biossólidos das estações de tratamento de esgotos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 20, 1999, Rio de Janeiro. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1999, p.762-770.

TSUTIYA, M. T. Características de biossólidos gerados em estações de tratamento de esgotos. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, M. O. **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001a, p. 89-131.

_____. Alternativas de disposição final de biossólidos. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, M. O. **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001b, p. 133-180.

UEHARA, M. Y.; VIDAL, W. L. (eds.). **Operação e manutenção de lagoas anaeróbias e facultativas**. São Paulo: CETESB, 1989, 91 p.

UHNOO, I.; WADELL, G.; SVENSSON, L.; JOHANSSON, M. E. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, p. 365-372, 1984.

UNESCO. Facts and figures, water and health. **International Year of freshwater**, 2003. Disponível em: < www.wateryear2003.org >. Acesso em: 17 novembro 2007.

VAN DER AVOORT, H. G. A. M.; REIMERINK, J. H. J.; RAS, A.; MULDER, M. N.; VAN LOON, A. M. Isolation of epidemic poliovirus from sewage during the 1992–3 type 3 outbreak in the Netherlands. **Epidemiology and Infection**, v. 114, p. 481–491, 1995.

VAN VOORNEBURG, F.; VAN VEEN, H. J. Treatment and disposal of municipal sludge in the Netherlands. **Journal of the Institution of Water and Environmental Management**, v.7, p. 117-121, 1993.

VANTARAKIS, A. C.; PAPAPETROPOULOU, M. Detection of enteroviruses and adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction. **Water Research**, v. 32, p. 2365–2372, 1998.

VANZO, J. E. Horizonte histórico da reciclagem. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, M. O. **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001, p. 1-5.

VANZO, J. E.; MACEDO, L. S.; TSUTIYA, M. J. Registros de produção de biossólidos. O caso da ETE França. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, M. O. **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001, p. 227-242.

VIDELA, C.; CARBALLAL, G.; MISIRLIAN, A.; AGUILAR, M. Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalized children from Argentina. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 10, p. 17–23, 1998.

VILLAR, L. M.; MORAIS, L. M.; ALOISEL, R.; MELO, M. M. M.; CALADO, I. A.; LAMPE, E.; GASPAR, A. M. C. Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. HAV genotypes IA and IB in Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 873-881, 2006.

VILLAR, L.M.; DE PAULA, V. S.; DINIZ-MENDES, L.; GUIMARÃES, F. R.; FERREIRA, F. F. M.; SHUBO, T. C.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPEL, E.; GASPAR, A. M. C. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 168-173, 2007.

VILLENA, C.; EL-SENOUSY, W. M.; ABAD, F. X.; PINTÓ, R. M.; BOSH, A. Group A Rotavirus in Sewage Samples from Barcelona and Cairo: Emergence of Unusual Genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3919-3923, 2003.

VITRAL, C. L.; YOSHIDA, C. F. T.; LEMOS, E. R. S.; TEIXEIRA, C. S.; GASPAR, A. M. C. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A in children and adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of prevalence to environmental factors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 1-5, 1998.

WADELL, G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 110, p. 191-220, 1984.

WADELL, G.; ALLARD, A.; JOHANSSON, M.; SVENSSON, L.; UHNOO, I. Enteric adenoviruses. In: KAPIKIAN, A. Z. (ed.). **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract**. New York: Marcel Dekker, 1994, p. 519-547.

WALLIS, C.; HENDERSON, M.; MELNICK, J. L. Enterovirus concentration on cellulose membranes. **Applied Microbiology**, v. 23, p. 476-480, 1972.

WEBER, D. J.; BARBEE, S. L.; SOBSEY, M. D.; RUTALA, W. A. The effect of blood on the antiviral activity of sodium hypochlorite, a phenolic, and a quaternary ammonium compound. **Infection Control and Hospital Epidemiology : The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America**, v. 20, p. 821–827, 1999.

WHITE, D. O.; FENNER, F. J. **Medical Virology**. 4th. ed. San Diego: Academic, 1994, 603 p.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis A. Geneva: WHO, 2000, 38 p. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 25 maio de 2007.

WIEDBRAUK, D. L.; SHERYL, L. G. J. **Manual of clinical virology**. New York: Rave, 1992, 275 p.

WINOKUR, P. L.; STAPLETON, J. T. Immunoglobulin prophylaxis for hepatitis A. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 580-586, 1992.

WYN-JONES, A. P.; SELLWOOD J. A review: Enteric viruses in aquatic environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 945-962, 2001.

YANKO, K.; YOSHIDA, Y.; SHINKAI, T.; KANEKO, M. A practical method for the concentration of viruses from water using fibriform cellulose and organic coagulant. **Water Science & Technology**, v. 27, p. 295–298, 1993.

YOSHIDA, H.; HORIE, H.; MATSUURA, K.; KITAMURA, T.; HASHIZUME, S.; MIYAMURA, T. Prevalence of vaccine derived polioviruses in the environment. **The Journal of General Virology**, v. 83, p. 1107–1111, 2002.

YOTSUYANAGI, H.; KOIKE, K.; YASUDA, K.; MORIYA, K.; SHINTANI, Y.; FUJIE, H.; KUROKAWA, K.; IINO, S. Prolonged fecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polimerase chain reaction. **Hepatology**, v. 24, p. 10-13, 1996.

**ANEXO A-AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE AMOSTRAS NA CASAN, ETE
INSULAR**

AUTORIZAÇÃO DE ENTRADA
COLETA DE AMOSTRAS

Florianópolis, 22 de Maio de 2007.

De : Eng. José Luciano Soares
Laboratório de Análises de Esgoto - SESIT

Para: Vigia da ETE Insular - Florianópolis/SC.

Venho por meio desta, autorizar a entrada de **Aline Daiane Schlindwein**, aluna do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia sob matrícula 2007 04761 da UFSC, a coletar amostras de lodo ativado da ETE Insular – Casan, vinculada ao Sistema Integrado da Grande Florianópolis, com o objetivo de padronizar metodologias para detecção de vírus entéricos humanos por técnicas moleculares e de cultura celular. Tais coletas serão mensais durante o ano de 2007, sendo assim, a aluna está pré-autorizada a entrar na estação para realizar suas coletas neste período.

Atenciosamente,



José Luciano Soares
Engenheiro Químico



Companhia Catarinense
de Águas e Saneamento

AUTORIZAÇÃO DE ENTRADA COLETA DE AMOSTRAS

Florianópolis, 18 de Janeiro de 2008.

De : Eng. José Luciano Soares, Dr.

Laboratório de Análises de Esgoto - SESIT

Para: Vigia da ETE Insular - Florianópolis/SC.

Venho por meio desta, autorizar a entrada de **Aline Daiane Schlindwein**, aluna do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia sob matrícula 2007 04761 da UFSC, a coletar amostras de lodo ativado da ETE Insular – Casan, vinculada ao Sistema Integrado da Grande Florianópolis, com o objetivo de padronizar metodologias para detecção de vírus entéricos humanos por técnicas moleculares e de cultura celular. Tais coletas serão mensais durante o ano de 2008, sendo assim, a aluna está pré-autorizada a entrar na estação para realizar suas coletas neste período.

Atenciosamente,


José Luciano Soares
Engenheiro Químico

Matriz
Rua Emílio Blum Nº 83 - Centro - Florianópolis - SC
INSC. EST.: 251.835.880 - CNPJ: 82.508.433/0001-17
PABX GERAL: (48) 221-5000 - FAX GERAL: (48) 221-5044
CEP: 88020-010

MCP-004

