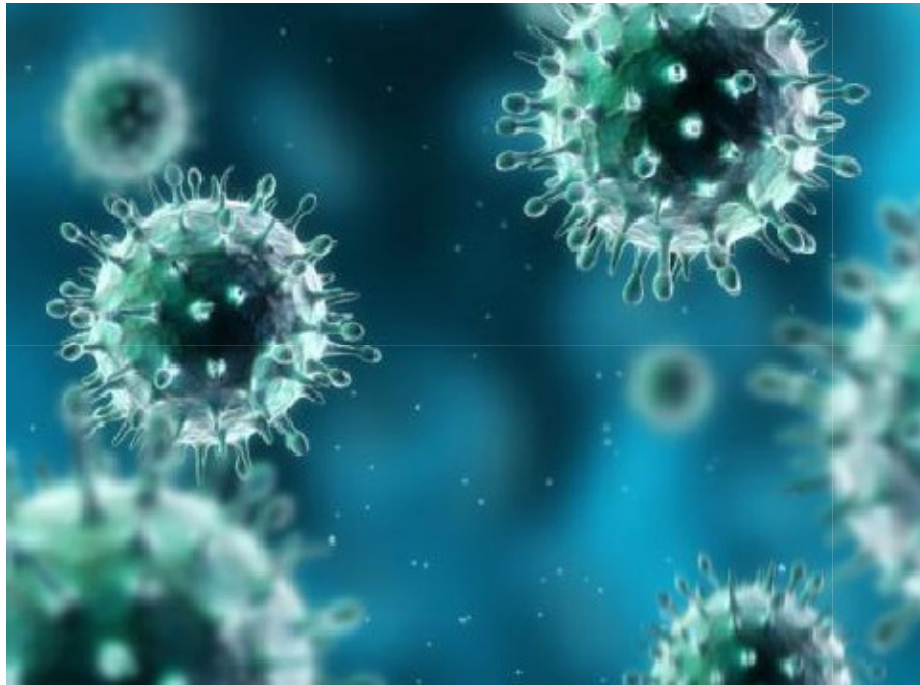




Vírus no meio ambiente:

**da importância ecológica
ao risco à saúde**

Profa. Dra. Dolores U. Mehnert
Laboratório de Vírus Entéricos Humanos e Animais



Principais constituintes dos esgotos domésticos

Água (99,9%)

Sólidos (0,1%)

Sólidos Suspensos

Sólidos Dissolvidos

Matéria Orgânica

Nutrientes (N, P)

Organismos patogênicos

Helmintos

Protozoários

Bactérias

Fungos

VÍRUS (humanos
animais, insetos,
vegetais,
bacterianos)



Consequências dos lançamentos de esgoto bruto ou tratado no ecossistema aquático

Eutrofização:

- ✓ espécies sensíveis podem ser substituídas por espécies mais tolerantes e resilientes;
- ✓ comunidades biologicamente diversas podem ser substituídas por espécies menos diversas;
- ✓ Floração de algas tóxicas.



Risco à saúde da população

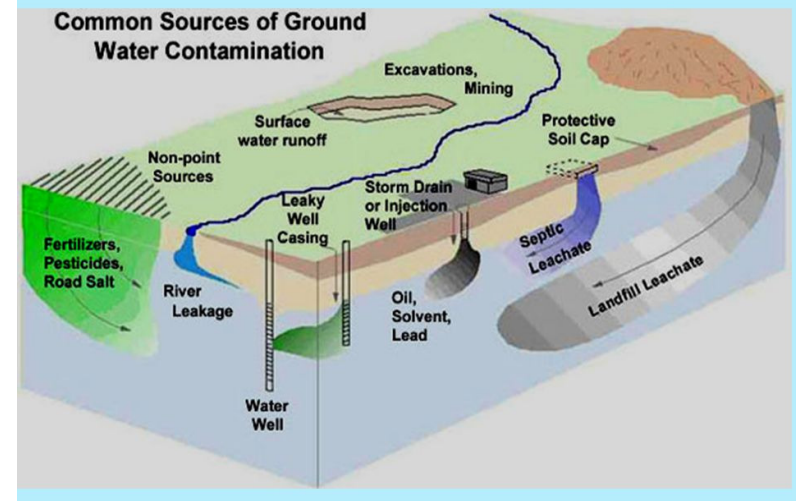
Contato com patógenos;

Contato com metais pesados e substâncias químicas tóxicas;

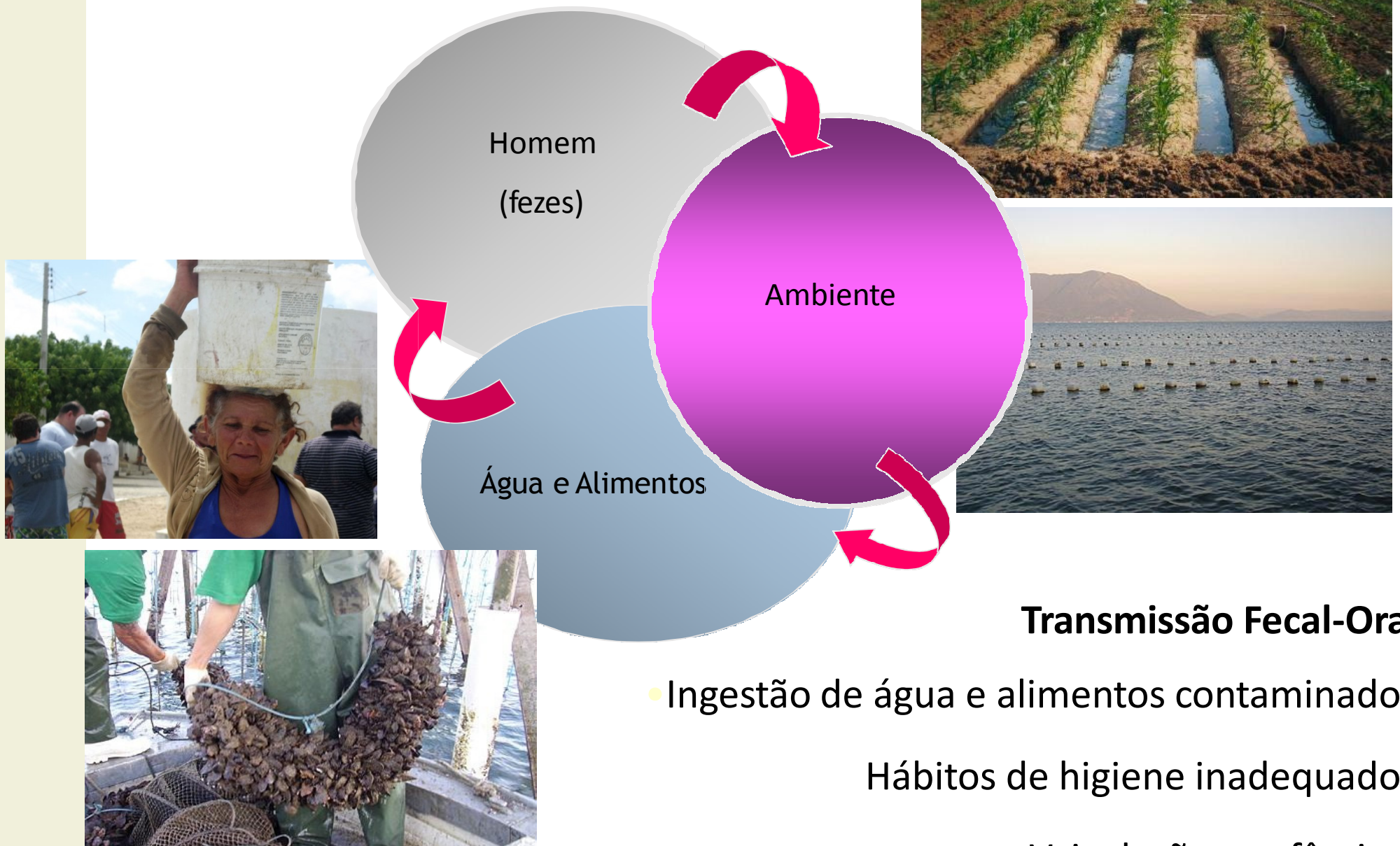
Contaminação de alimentos;

Contaminação de águas subterrâneas.

Sources of Groundwater Contamination



Doenças de veiculação hídrica



Transmissão Fecal-Oral

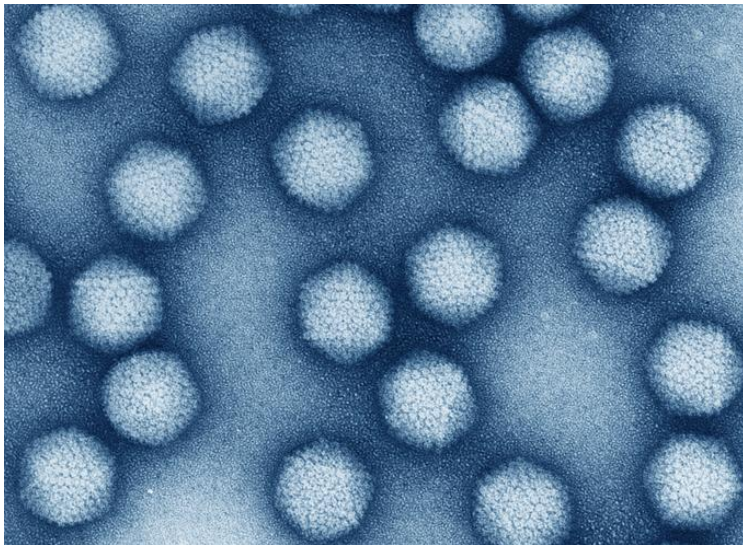
- Ingestão de água e alimentos contaminados

Hábitos de higiene inadequados

Veiculação por fômites

Patógenos virais

Vírus entéricos são todos aqueles que são capazes de infectar as células do trato gastrointestinal

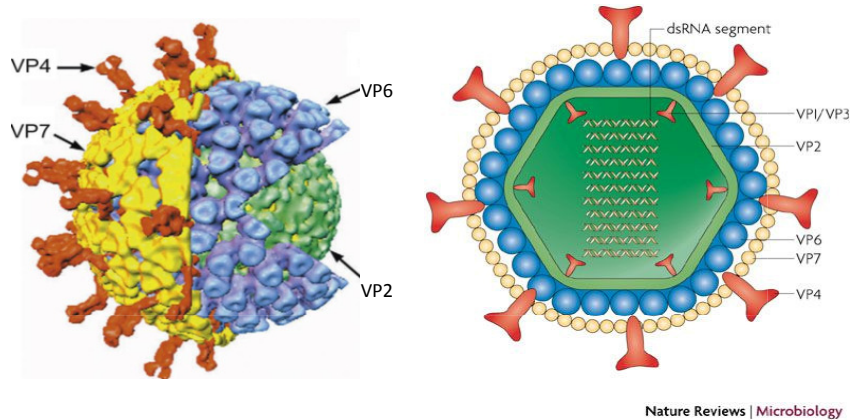


Mais importantes para a área de saneamento:

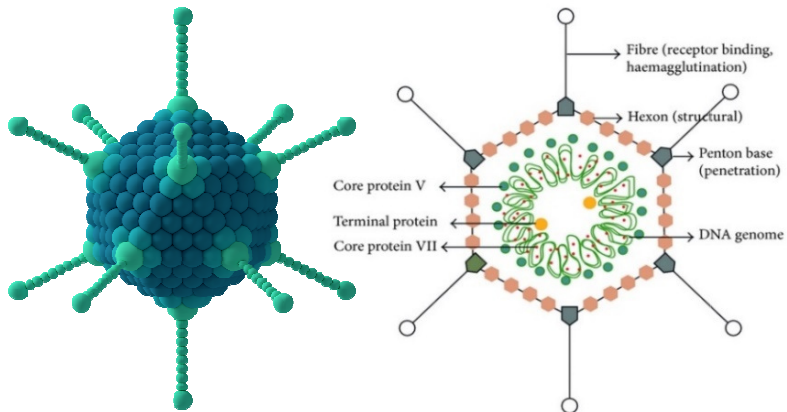
- Aproximadamente 150 tipos de vírus entéricos humanos
- Quantidade mínima de vírus (dose infectante) para causar uma infecção muito baixa (10 a 100 partículas)
- Excretados em alta concentração nas fezes de indivíduos sintomáticos e assintomáticos
- Altamente resistentes à ação de substâncias químicas e agentes físicos (temperatura, pH, radiação UV)

Vírus entéricos

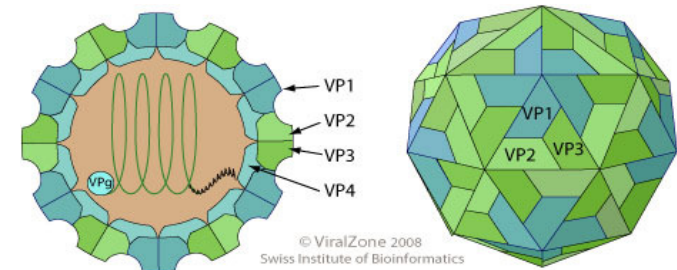
Rotavírus



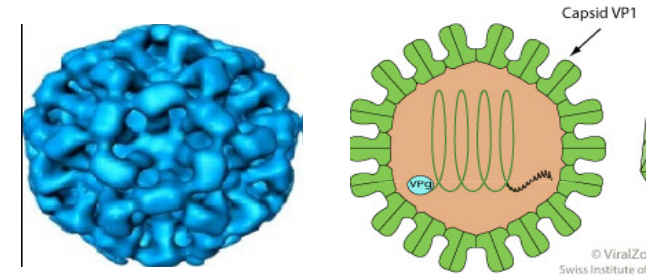
Adenovírus



Picornavírus



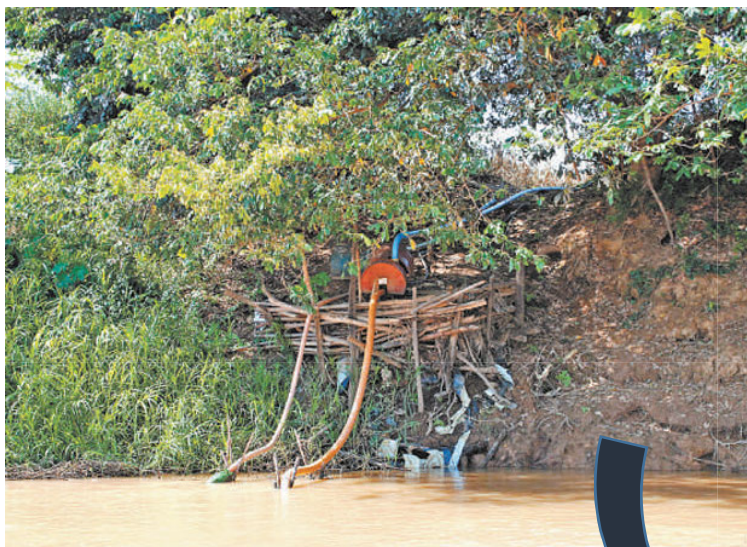
Norovírus



- ✓ Genoma (DNA ou RNA)
- ✓ Capsídeo icosaédrico ou esférico
- ✓ Sem envoltório

Fontes de contaminação por vírus

Manejo agrícola de resíduos: irrigação, adubação

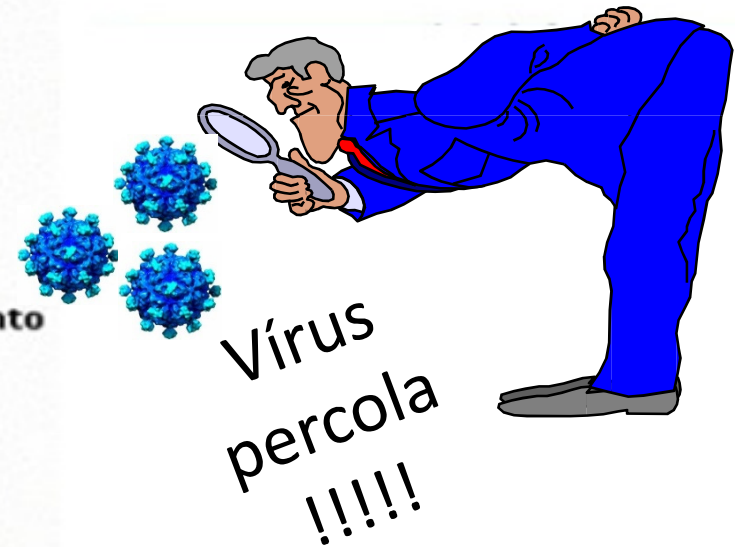
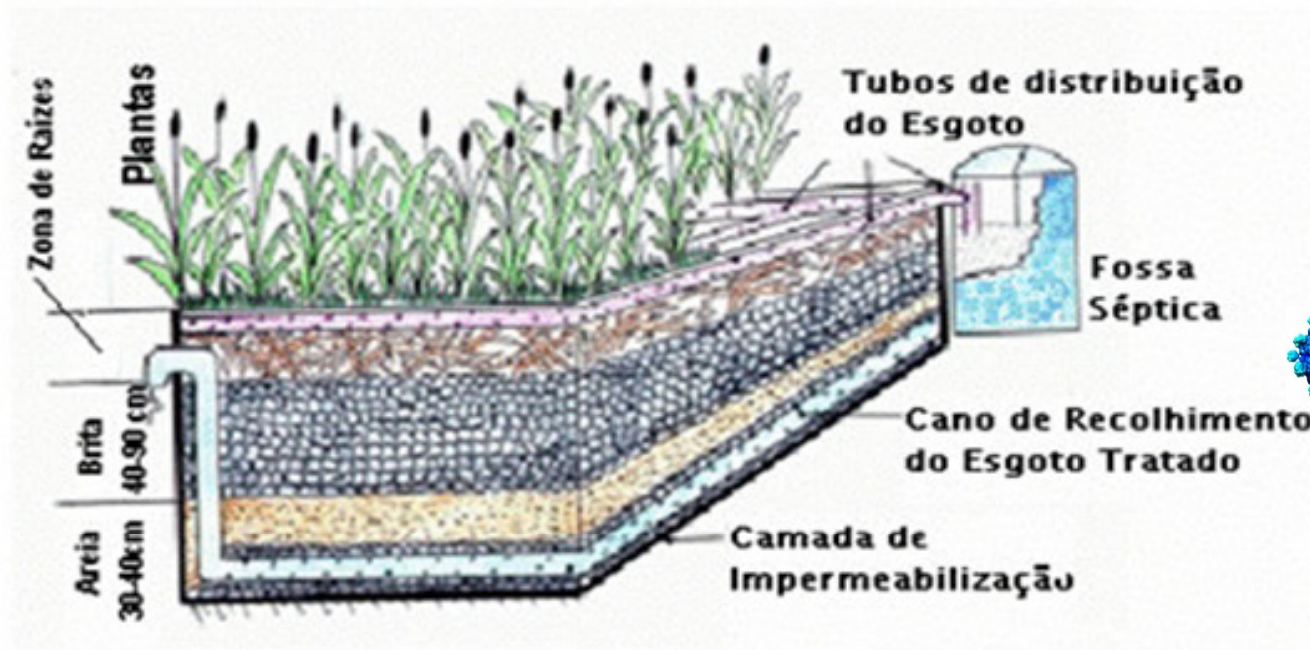


Lodo de ETE
(Resolução CONAMA No.375
de 29 de agosto de 2006)
Biossólido classe A e classe B



Compostagem
Calagem
Tratamento térmico

Filtro por Leitos Cultivados para tratamento de Esgoto Doméstico com água Negra



REUSO DE EFLUENTE DOMÉSTICO NA AGRICULTURA E A CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR VÍRUS ENTÉRICOS HUMANOS

Plantas usadas: Papiro, Capim elefante, etc



Papiro anão

Thalia/Napier

Palmeira Anã

Íris spp.

Taioba

Dolores Ursula Mehnert
Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas II
Departamento de Microbiologia
Laboratório de Vírus Entéricos Humanos e Animais

http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v65_1_2/mehnert.pdf

Consumo de frutos-do-mar
crús ou mal-cozidos

- animais filtradores
- vírus retidos nos tecidos

Fontes de contaminação por vírus



Fatores ambientais que influenciam a infectividade viral

Temperatura do meio ambiente

- 20 a 26°C ➤ 2,5 a 28 dias (mar)
- 3 a 5°C ➤ 36 a 130 dias
- 10°C ➤ 300 dias (2 log₁₀ - água subterrânea)
- verão 2/3 dias, inverno 2 meses (no solo)

Composição do solo

adsorção e inativação - óxidos Mn, Al, Cu

resistência à sílica e ferro

Índice pluviométrico

Porosidade (1-60%)



Processos de Tratamento de Esgoto

Esgoto bruto
(afluente)



Esgoto tratado

- Preliminar: sólidos grosseiros em suspensão, óleos, graxas e gorduras;
- Primário: sólidos em suspensão, parte matéria orgânica e inorgânica;
- Secundário: sólidos dissolvidos (carboidratos, proteínas e lipídeos) e sólidos suspensos finos.

Água de reúso

Tratamento Avançado e desinfecção:

- remoção de microrganismos patogênicos por ozônio, UV, cloração e ácido peracético
- remoção de compostos orgânicos de alto peso molecular e salinidade por membrana de nanofiltração e membrana de osmose reversa e troca iônica

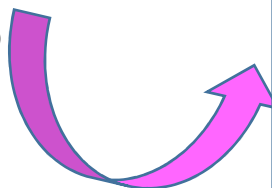
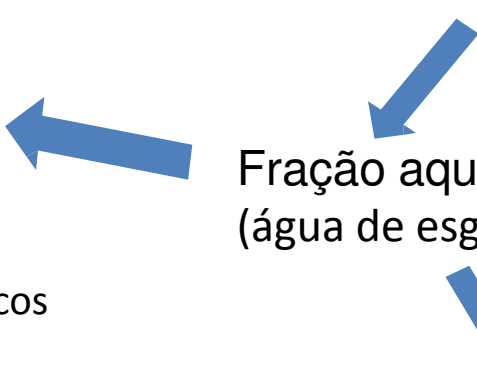
Fração aquosa
(água de esgoto tratada)

Fração dos sólidos (lodo)



Aterro sanitário

Devolução ao
meio ambiente



Remoção de patógenos por processos de tratamento de esgoto

	Número de patógenos por 100 mL de efluente				
Efluente	Coliformes fecais NMP	Salmonela	Vírus Entéricos UFP	Ovos de helmintos	Cistos de <i>Giardia lamblia</i>
Bruto	1×10^9	8×10^3	5×10^4	800	1×10^4
Primário	1×10^7	8×10^2	$1,5 \times 10^4$	80	5×10^3
Secundário	1×10^6	8	$1,5 \times 10^3$	0,08	2.5×10^3
Terciário	<2	<2	0,0002	<0,08	3

PATHOGENS IN RECLAIMED WATER
M. V. Yates
University of California Riverside

**Dose mínima infecciosa para vírus entéricos
10 a 100 partículas virais**

Agentes físicos e químicos para inativação viral

Como posso destruir estes vírus pensando na composição química dos componentes estruturais?



Temperatura :



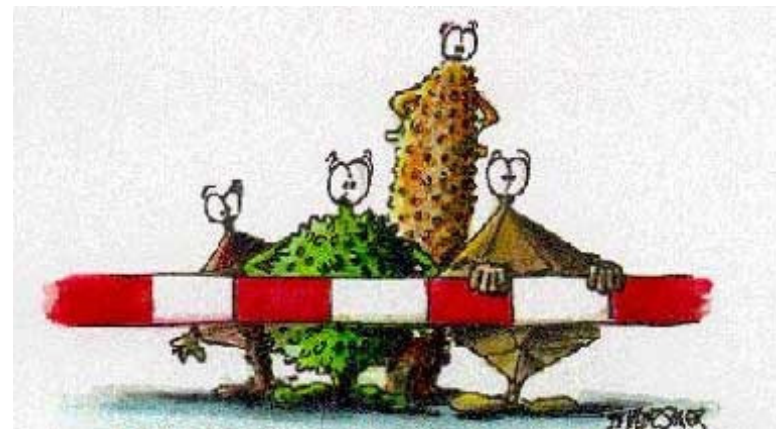
- Inativação: acima de 56°C por 30 min.



- Preservação da capacidade de infecção
Temperatura ambiente (alguns tipos - por horas, dias, semanas)
4°C e abaixo (preservação por anos)

Radiação gama, X, UV

Compostos clorados e fenólicos



Métodos para desinfecção de água *versus* inativação dos vírus

Ozônização (ozônio) - mais forte desinfetante e oxidante indicado para o tratamento da água: desinfecção da água engarrafada, da água de produção e de lavagem nas indústrias de alimentos, bebidas ou cosmética, tratamento de água potável, água de piscinas e zoológicos, e nos circuitos de resfriamento.

Desnatura capsídeo protéico e genoma

Cloração: compostos clorados, necessário um período de reação de no mínimo 20 minutos, formação de sub-produtos.

Desnatura capsídeo protéico

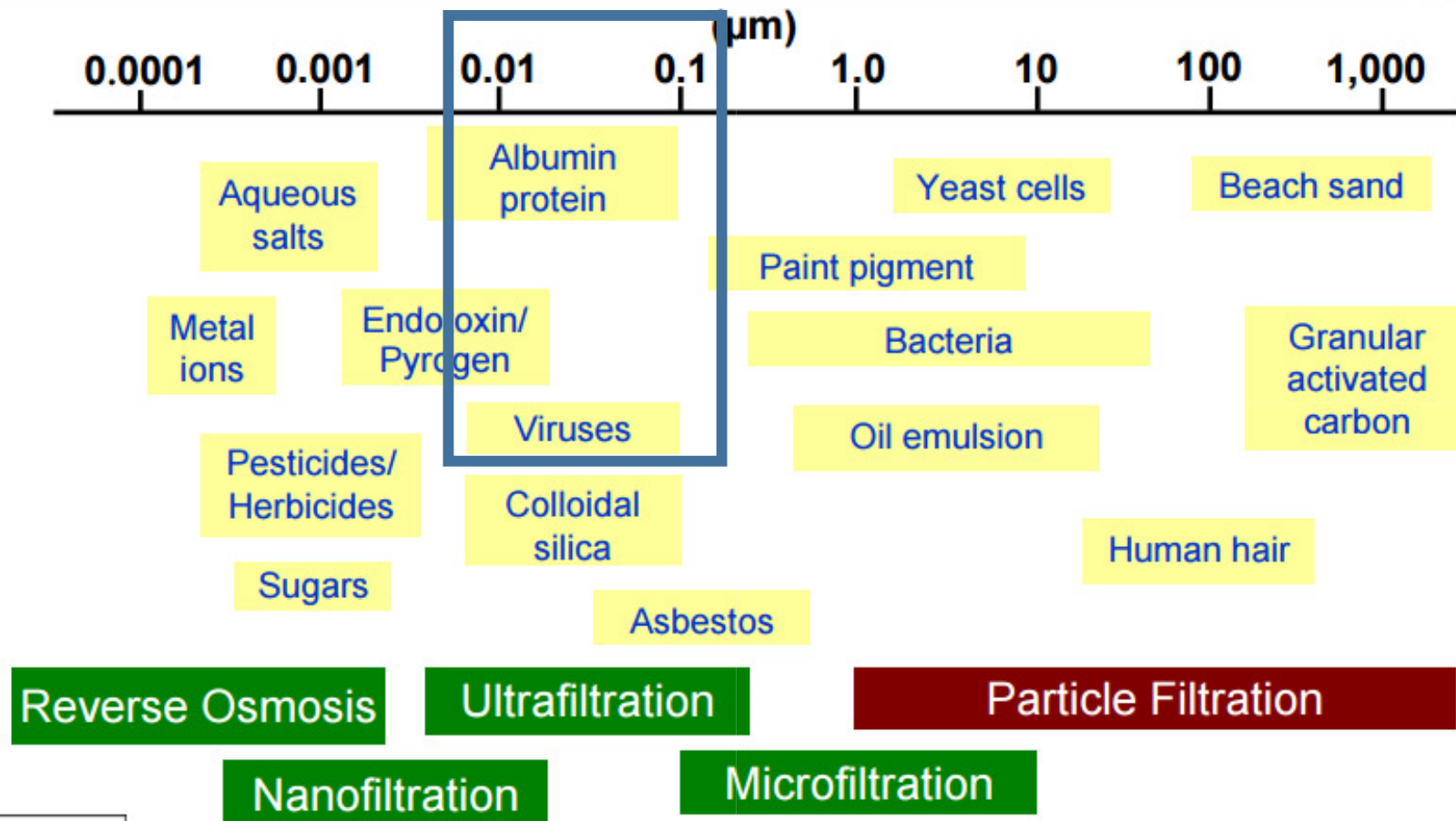
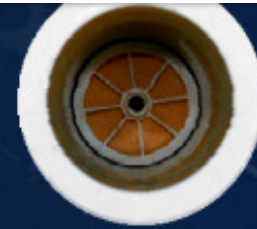
Desinfecção por luz ultravioleta - tratar água potável e residual assim como para o tratamento da água de produto e de produção em aplicações industriais

Desestrutura genoma

Desinfecção térmica – aquecimento mínimo a 75°C, combater a Legionella nos circuitos de água quente, para desinfecção de tubulações na indústria farmacêutica e de alimentação, e para desinfetar águas residuais de laboratórios microbiológicos e de áreas críticas em clínicas.

Desnatura capsídeo protéico, envoltório e genoma

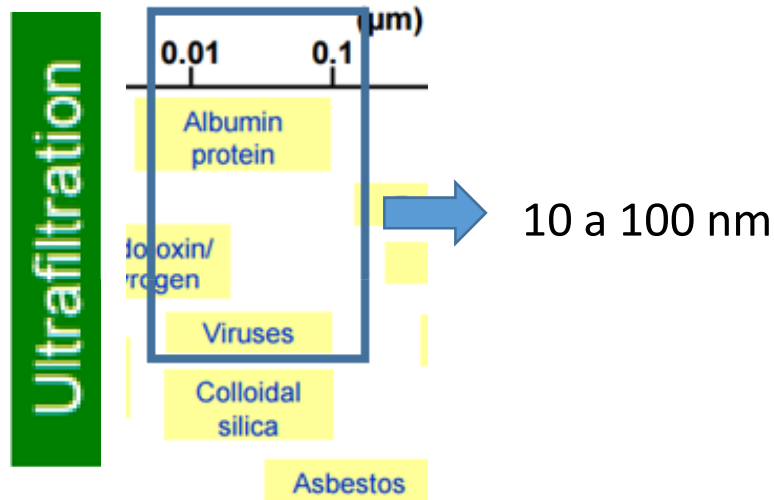
Membrane Separation Processes and Characteristics



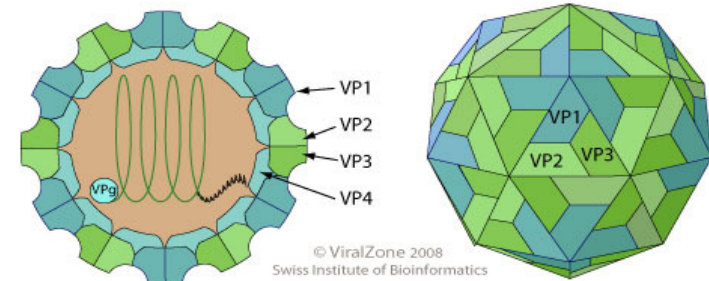
Tamanho das partículas virais

versus

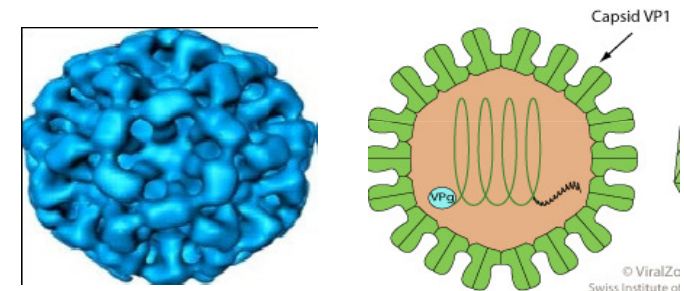
Porosidade de membranas para tratamento de água ou esgoto



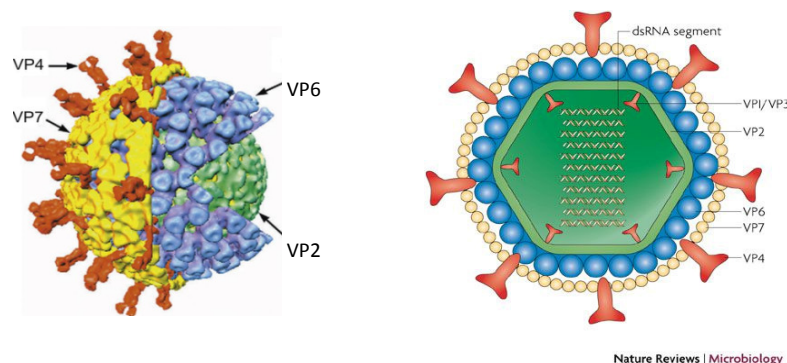
Picornavírus - 20 a 30 nm



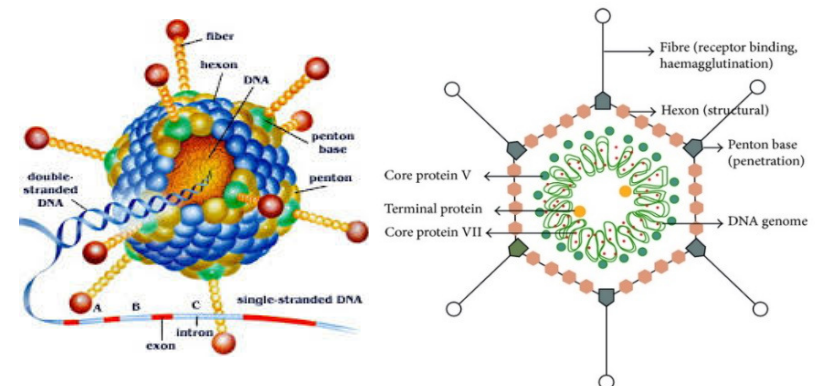
Norovírus – 23 nm



Rotavírus – 80 nm

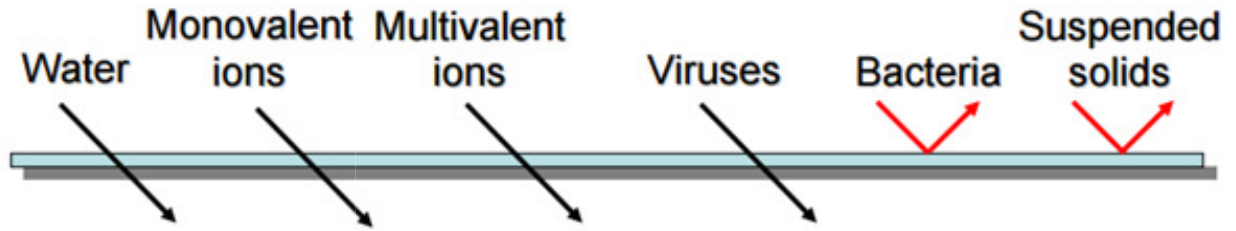
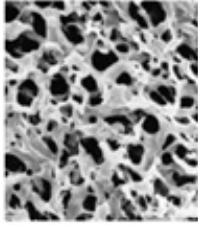


Adenovírus – 90 a 100 nm

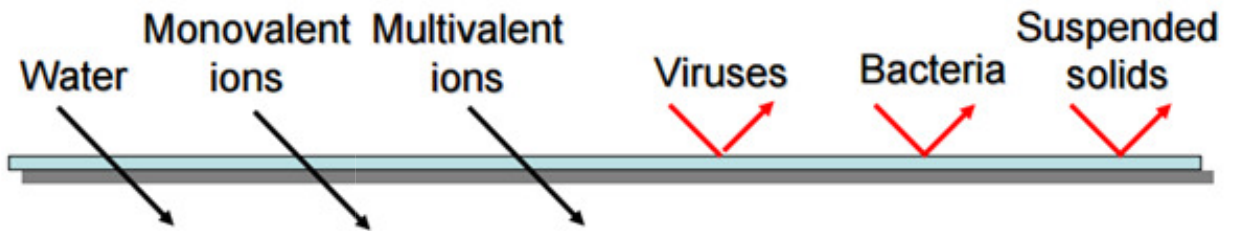


Membranas para tratamento de água

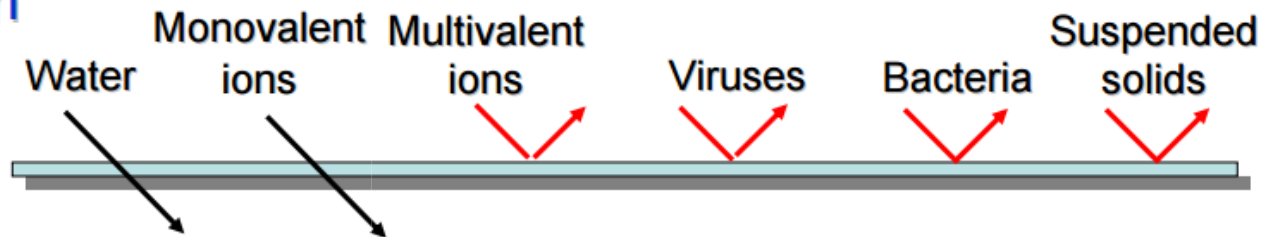
Microfiltration



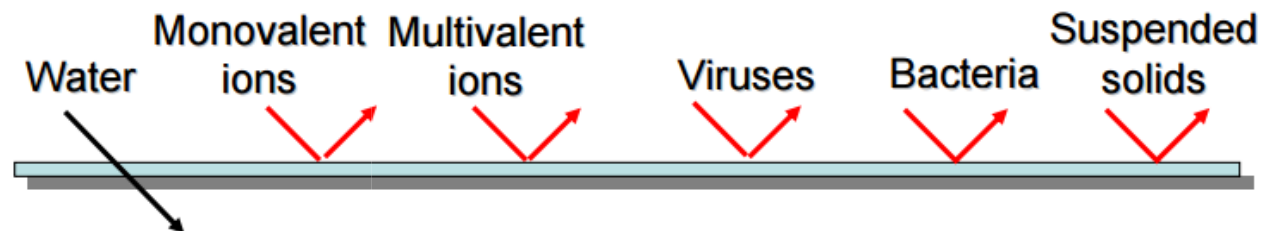
Ultrafiltration



Nanofiltration



Reverse Osmosis



Inativação por agentes físicos e químicos

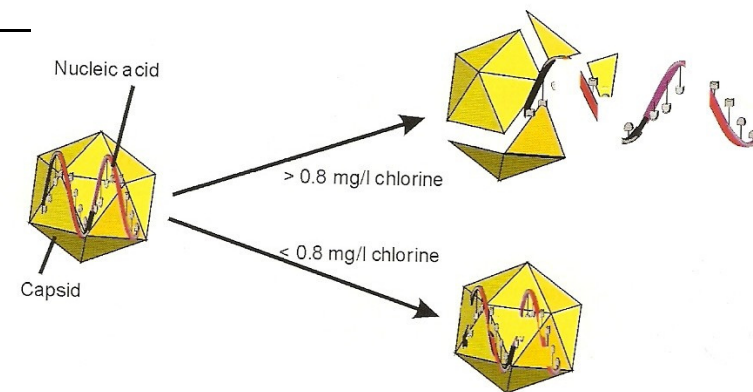
Patógeno	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Referência
<i>Escherichia coli</i>	65	1	Bandres et al, 1998
Legionella	66	0,45	Sanden et al, 1989
<i>Mycobacterium sp</i>	70	2	Robbecke & Buchholtz, 1992
<i>Cryptosporidium parvum</i>	72,4	1	Fayer, 1994
Poliovírus	60	25	Larkin & Fossolitis, 1979
Hepatite A	70	10	Siegl et al., 1984
Rotavírus	50	30	Estes et al., 1979

Vírus entéricos

Inativação por agentes físicos e químicos

Patógeno	Dose UV ($\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$)	Cloro livre (mg/L)
<i>Escherichia coli</i>	1.300 - 3.000	0,3 - 0,8
Legionella	920 - 2.500	0,35 - 0,5
Poliovírus	5.000 - 12.000	0,4 - 14,3
Hepatite A	3.700 - 7.300	0,14 - 0,23
Rotavírus	8.000 - 9.900	0,5 - 1,0
Adenovírus	23.000 - 30.000	ND

Roessler & Severin (1996)



Estratégia de pesquisa de vírus entéricos humanos presentes em amostras de água

Recomendações para coleta de amostras

- deve ser realizada sempre antes de outras coletas;
- não coletar amostras compostas;
- fechar o frasco imediatamente após a coleta;
- após a coleta, manter e transportar sob refrigeração;
- não congelar.



- coletar a amostra em recipiente esterilizado;
- água com cloro: 0,1 ml de tiosulfato a 10%;
- água bruta que contenha metais pesados: 0,3 ml EDTA a 15%.

<http://www.cetesb.sp.gov.br/servicos/normas-tecnicas-cetesb/normas-tecnicas-vigentes/>

Estratégia de pesquisa de vírus presentes em amostras de água

- ✓ Concentração dos vírus presentes nas matrizes
- ✓ Purificação dos concentrados virais
- ✓ Ensaio de detecção viral
 - Clássicos
 - Moleculares
- ✓ Ensaio de infectividade e quantificação do no. de partículas
- ✓ Avaliação de risco

Métodos de concentração viral

(Fonte: Bosch et al., 2008; Wyn-Jones et al., 2001 adaptada por Garrafa 2009)

Técnica	Método	Tipo de água	Volume inicial (L)	Recuperação	Custo	2ª etapa	Comentário
	Membrana eletronegativa	Todas	1-1000	50-60% com prática	Médio	Sim	Para grandes volumes de água
Adsorção /Eluição (VIRADEL)	Membrana eletropositiva	Todas	1-1000	50 – 60% com prática	Médio	Sim	Não necessita de pré requisito
	Cartuchos eletronegativos	Baixa turbidez	1 – 50	Variável: alta em águas limpas	Baixo	Sim	Obstrução rápida dos poros
	Cartuchos eletropositivos	Todas	1 – 1000	Variável	Médio	Sim	Ampla gama de vírus
	Membranas de alginato	Limpa	Baixa	Baixa	Baixo	Não	Muito lento. Obstrução rápida com amostras de alta turbidez
Ultrafiltração	Membrana simples	Limpa	Baixa	Variável	Médio	Não	Lento
	Fluxo tangencial e fibras ocas	Efluente tratado	Alto	Variável	Alto	Não	Necessita de pré filtros para águas turbas
Ultra-centrifugação		Limpo	Baixa	Média	Alto	Não	Vasta gama de vírus, boa recuperação, alto custo
Imunoafinidade	Imunoafinidade e esferas magnéticas	Desconhecido	Baixa	Boa recuperação para volumes pequenos	Alto	Não	Requer ensaio específico para cada vírus. resultados falso-positivos em caso de alterações nos sítios de interação viral

Método para concentração de vírus (*two-step*) de águas de esgoto, superfície e subterrâneas.

(*Memórias do Inst. Oswaldo Cruz*, 92: 97, 1997)

1. Concentração da amostra: Filtração
através de membranas eletropositivas
Zeta Plus 60S



2. Reconcentração do concentrado viral:
ultracentrifugação



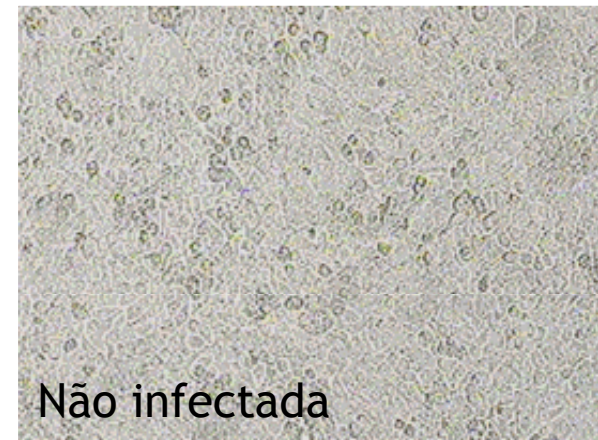
- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)
- Cultivo Celular
 - Observação de efeito citopático(ECP)
 - Plaqueamento viral
 - Reações de imufluorescência e imunoperoxidase
- Métodos moleculares (PCR, RT-PCR e sequenciamento gênico e sequenciamento de alta performance)
- ICC-PCR (cultivo celular + PCR)
- Real-Time PCR

Inoculação em Culturas de células

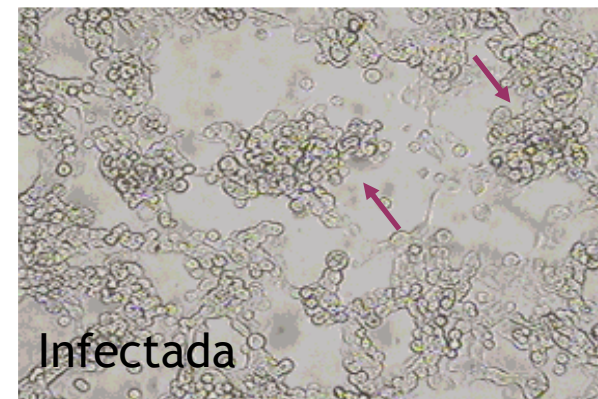
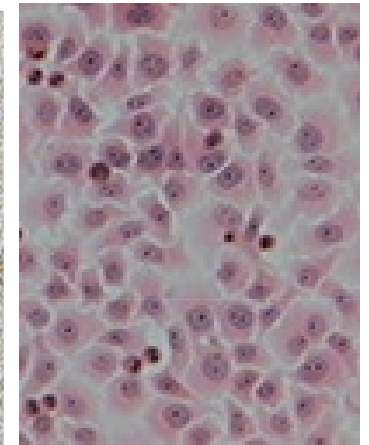


Download from
Dreamstime.com
This watermark comp image is for previewing purpose only.

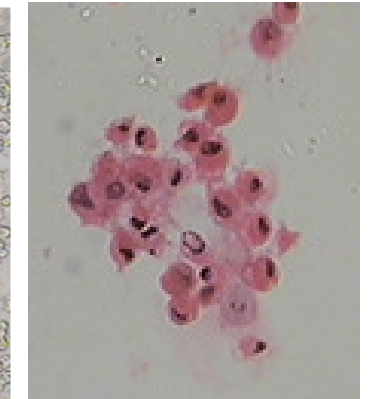
13007562
Eugene Sim Junyong | Dreamstime.com



Não infectada



Infectada



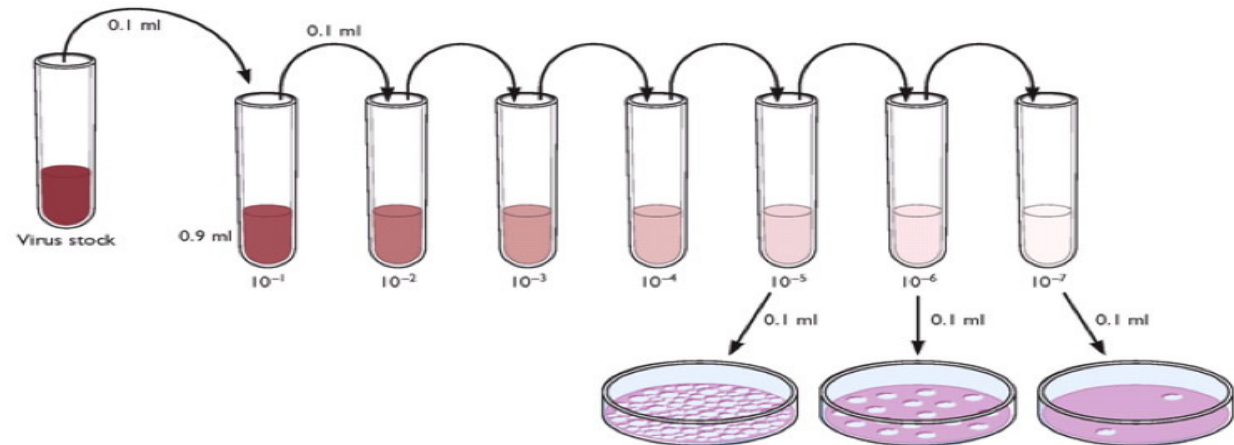
Deteccção de vírus cultiváveis

Quantificação viral ($\text{DICT}_{50}/\text{vol}$)

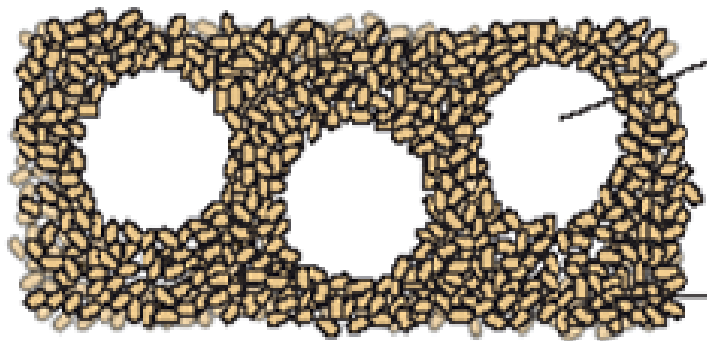
Métodos para detecção de vírus

Método de plaqueamento

- ✓ Detecção
- ✓ Isolamento
- ✓ Quantificação



(b) Lytic plaques



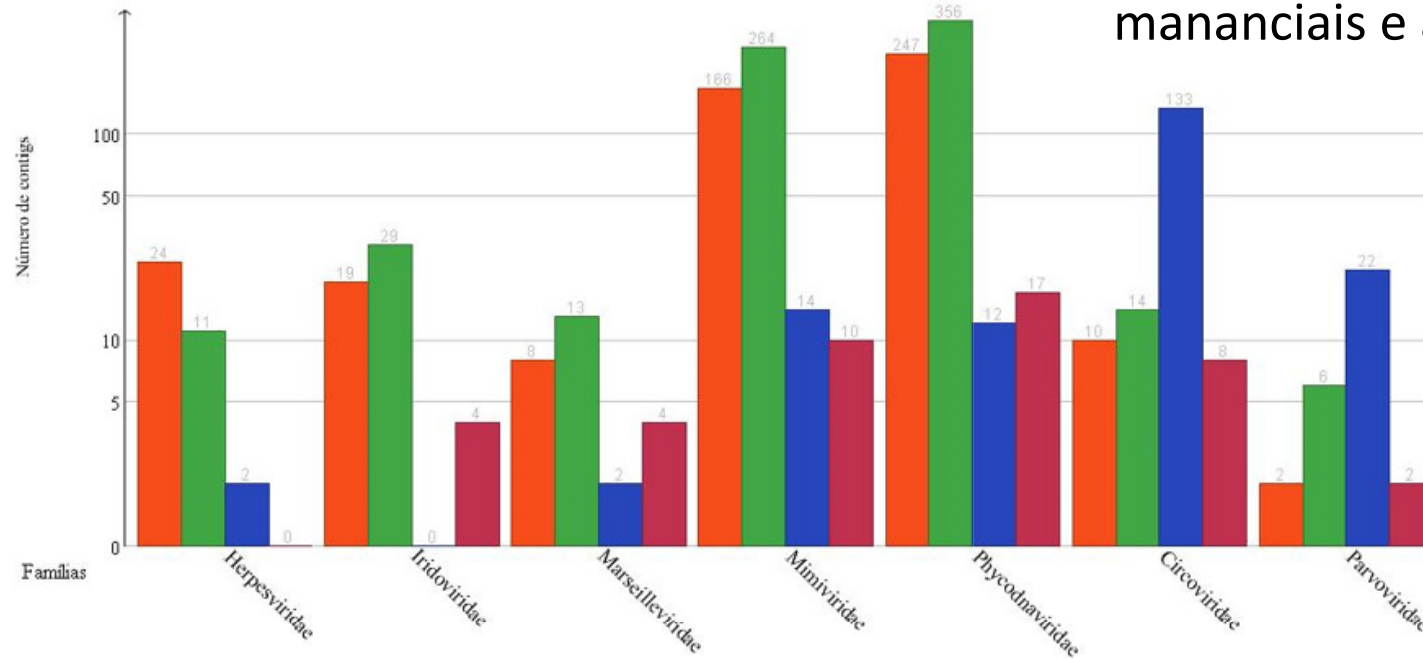
No. Unidades formadoras de placa
(UFP/mL)



Legend (Ponto de Coleta):

Gua_Manancial SL_Esgoto TS_Esgoto

Análise metagenômica de vírus presentes em mananciais e água de esgoto da RMSP.



Extração de DNA viral total

Sequenciamento de alta performance (Hiseq)

Análise por bioinformática

