

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

ETEs do Estado de São Paulo:

estabelecimento de metodologia para recuperação e
detecção viral.

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

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Dolores Ursula
Mehnert.

São Paulo
2008

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Saneamento básico e saúde

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Em 1989, o volume de esgoto coletado era de quase 11 milhões de m³/dia, dos quais apenas 2 milhões eram tratados; em 2000 o volume coletado passou a ser de aproximadamente 14 milhões de m³/dia, com tratamento de aproximadamente 5 milhões de m³/dia (IBGE, 2004). O diagnóstico dos serviços de água e esgoto realizado em 2005 pelo Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento - Snis, verificou que apenas 31,7% dos esgotos gerados na área urbana são tratados (Snis, 2006).

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

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

1.2 Esgoto doméstico

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

A composição química dos excretas é bastante complexa e fazem parte da composição cálcio, carbono, nitrogênio, matéria orgânica, fósforo (como P₂O₅) e potássio (como K₂O) (Feachem et al., 1983; Bitton, 1997).

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

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

Tabela 1: Patógenos detectados no esgoto

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Gastroenterite aguda

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

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

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

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

