

Neide Dulce Pombo Aparício

Importância para a Saúde Pública da Pesquisa de Vírus em Águas Residuais e de Consumo

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Paula Cristina Luxo Maia e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A orientadora da monografia:

(Prof. Dra. Cristina Luxo)

A aluna:

(Neide Aparício)

Eu, Neide Dulce Pombo Aparício, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o número 2009009946, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na bibliografia desta monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 20 de Junho de 2014

Assinatura: _____

Importância para a saúde pública da pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo

Obrigado Cláudia pela inspiração

Obrigado Hugo pela ajuda

Obrigado Catarina pelas boleias

Obrigado Professoras Ana Miguel e Cristina Luxo pela disponibilidade!

Resumo

A virologia ambiental é uma área ainda pouco desenvolvida da virologia, nos últimos anos, no entanto, tem-se assistido a um crescente interesse pelos assuntos relacionados com a transmissão de vírus através da água e dos alimentos. São diversos os estudos que demonstram a importância da pesquisa de vírus em águas de consumo e residuais. Os vírus entéricos, principalmente, são frequentemente encontrados nas águas, estando demonstrado que diversas epidemias têm a sua origem na água consumida pelas populações. Começa-se assim a compreender que é necessário um maior controlo da qualidade microbiológica das águas, existindo já projetos que pretendem introduzir como parâmetros obrigatórios para avaliar a qualidade da água a pesquisa de determinados vírus. A presente monografia foca-se na importância da pesquisa de vírus nas águas residuais e de consumo para melhorar a saúde das populações, referindo quais os principais patógenos virais encontrados nas águas, bem como os métodos de pesquisa, e quais os principais obstáculos para que a avaliação microbiológica da qualidade das águas não inclua ainda a pesquisa de vírus.

Abstract

Environmental virology is still an underdeveloped area of study however, in the last few years we have seen an increased interest in the spreading of viruses through water and food. Several studies have shown the importance of detecting these entities, for example, enteric viruses are usually found in drinking water, with several epidemics being linked to their presence. Researchers are starting to realize that a further microbiologic control is necessary and some recent projects are starting to emerge with the intent of introducing virus detection as an obligatory indicator to include in water testing. This thesis is dedicated to explaining why virus detection is necessary to increase the quality of drinking water, mentioning the most relevant viral pathogens as well as their detection methods and the reasons why these tests aren't yet included in regular water testing.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Introdução | 8 |
| 1. História da virologia ambiental..... | 9 |
| 2. Vírus nas águas..... | 10 |
| 2.1. Vírus Entéricos | 10 |
| 2.1.1. Norovírus..... | 12 |
| 2.1.2. Rotavírus | 13 |
| 2.1.3. Enterovírus..... | 14 |
| 2.1.4. Vírus da Hepatite A | 15 |
| 2.1.5. Vírus da Hepatite E..... | 17 |
| 2.1.6. Adenovírus..... | 18 |
| 2.1.7. Poliomavírus | 19 |
| 3. Análise microbiológica das águas | 20 |
| 4. Tratamento das águas..... | 21 |
| 5. Análise virológica das águas | 21 |
| 5.1. Métodos de concentração | 22 |
| 5.2. Métodos de deteção | 23 |
| 6. Pesquisa de vírus em águas residuais | 24 |
| Conclusão | 25 |
| Bibliografia | 26 |

Lista de abreviaturas:

EUA – Estados Unidos da América

tgi – trato gastro-intestinal

PCR – polymerase chain reaction (reação de polimerização em cadeia)

qPCR – quantitative polymerase chain reaction (reação de polimerização em cadeia quantitativa)

VHA – Vírus da hepatite A

VHE – Vírus da hepatite E

JCV – John Cunningham virus

BKV – BK Virus

MCV – Merkel cell virus

AdV – Adenovírus

PyV – Poliomavírus

UV – Ultravioleta

ppm – partes por milhão

Rv- Rotavírus

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

Introdução

A pesquisa de vírus em águas e alimentos, conhecida como virologia ambiental, é uma área da virologia ainda pouco explorada mas que, nos últimos anos tem tido grandes progressos. A pesquisa de vírus nas águas, particularmente, tem suscitado grande interesse devido à demonstração da importância destes microrganismos no aparecimento de epidemias e surtos.

Atualmente ainda não existem quaisquer *guidelines* ou legislação que preconizem a pesquisa de vírus nas águas, quer residuais quer de consumo, situação esta que se torna preocupante quando diversos estudos demonstram a presença de vírus em águas consideradas bacteriologicamente aceitáveis, por cumprirem com os parâmetros microbiológicos estabelecidos.

Embora os vírus não se consigam replicar no ambiente, pelo facto de serem seres intracelulares obrigatórios, são mais resistentes que as bactérias, podendo permanecer por mais tempo no ambiente e não sendo eliminados pelos tratamentos habitualmente utilizados nas águas. Há ainda que destacar a extraordinária capacidade de adaptação dos vírus, tanto através de mutações como também de recombinações, o que lhes permite sobreviver em novos ambientes e hospedeiros (2).

Os vírus entéricos estão entre os mais comuns e perigosos associados a infeções com origem na água. Estes vírus após contaminarem o hospedeiro invadem o trato gastrointestinal e são eliminados em grande quantidade através das fezes e da urina. Associadas a estes vírus estão não só patologias digestivas, sendo comuns as diarreias, mas também conjuntivites, hepatites, infeções do sistema nervoso central e doenças crónicas.

Apesar de ainda não existir legislação quanto à pesquisa de vírus para avaliação da qualidade das águas, a preocupação cada vez maior em relação a este tema tem levado ao surgimento de diversos projetos, nomeadamente a “Environmental Protection Agency Contaminant Candidate List” , uma lista de contaminantes que não são avaliados (nos EUA), mas que são conhecidos por existirem nos sistemas públicos de abastecimento de águas (1). Um outro projeto, “Virobathe” , tem por objetivo desenvolver métodos para deteção de adenovírus e norovírus nas águas, por forma a impulsionar a revisão das normas comunitárias relativas à qualidade microbiológica da água.

Caminha-se desta forma em direção à revisão da legislação, por forma a incluir os vírus como elementos obrigatórios de pesquisa para avaliação da qualidade da água, o que é

Importância para a saúde pública da pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo

de crucial importância para melhorar a qualidade de vida das populações através de uma melhoria da saúde pública.

I. História da virologia ambiental

A virologia ambiental é uma área da virologia de desenvolvimento relativamente recente, mas que tem suscitado um interesse cada vez maior.

O primeiro registo de um surto viral com origem em alimentos data de 1914 concluindo-se que o número elevado de casos de poliomielite estava associado ao consumo de leite contaminado. Já em 1956 verificou-se um surto de hepatite A causado pelo consumo de moluscos bivalves na Suécia, o mesmo aconteceu em 1962 nos Estados Unidos da América. No início da década de 1970, surtos de gastroenterite não bacteriana foram registados, não tendo sido isolado nenhum agente *in vitro*. Estudos posteriores focaram-se na forma de transmissão e concluíram que a mais provável seria através de água e moluscos contaminados (15).

Em 1965 realizou-se em Cincinnati, EUA, a 1ª conferência “Transmission of Viruses by the Water Route”, cujos objetivos eram:

- Desenvolver métodos quantitativos adequados para detetar a transmissão viral através da água;
- Verificar como os vírus podem sobreviver, sem serem detetados, em condições nas quais se consegue eliminar coliformes fecais;
- Determinar quais as doses virais infecciosas para humanos;
- Estudar a persistência viral nas águas residuais;
- Intensificar esforços para conhecer o agente infeccioso da hepatite viral.

A década de 1980 trouxe novos desenvolvimentos à virologia ambiental, entre eles o reconhecimento do vírus da hepatite E como vírus entérico capaz de originar surtos; demonstração do envolvimento do rotavírus em casos de diarreia infantil; reconhecimento da responsabilidade dos adenovírus entéricos e calicivirus em quadros de gastroenterite aguda, e principalmente o reconhecimento de que os surtos de gastroenterites e hepatites podem estar associados a águas contaminadas.

Entretanto o aparecimento dos métodos moleculares na década de 1990 veio facilitar a deteção e identificação de agentes virais presentes no ambiente, entre estas técnicas há

Importância para a saúde pública da pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo

que destacar o PCR (reação de polimerização em cadeia) e mais tarde o qPCR (reação de polimerização em cadeia quantitativa), que veio permitir fazer quantificações e análises em tempo real.

2. Vírus nas águas

Os vírus de veiculação hídrica são uma causa importante de doença. Os impactos socioeconómicos e ecológicos são elevados, tanto nos países em desenvolvimento, como nos países desenvolvidos (2).

As doenças virais transmitidas através da água podem ser adquiridas principalmente pelo consumo direto de água ou alimentos contaminados, incluindo peixes e moluscos bivalves, e dos frutos e vegetais cultivados em solos irrigados com água contaminada. Os vírus podem também ser transmitidos através de águas contaminadas usadas em atividades de recreio, através de contacto direto com estas águas ou por inalação.

Mais de 100 espécies de vírus podem estar presentes nas águas, podendo causar uma ampla variedade de doenças no Homem.

Os vírus não se replicam fora do hospedeiro, conseqüentemente não se multiplicam no meio ambiente, no entanto, conseguem sobreviver por períodos extensos, maiores que aqueles que a maioria das bactérias intestinais suportam, tornando perigoso avaliar a qualidade das águas tendo por base apenas parâmetros bacteriológicos. Os vírus podem sobreviver 130 dias na água do mar, 120 na água doce e até 100 dias no solo, a temperaturas entre os 20 e os 30° C (1,4).

Apesar das baixas concentrações de vírus na água, estes microrganismos representam um risco para a saúde pois as doses infecciosas são extremamente baixas, variando entre 10 e 100 viriões (1,5).

2.1. Vírus entéricos

Os vírus entéricos são encontrados com frequência no ambiente. Entre os mais comuns nas águas estão: norovírus, enterovírus, rotavírus, vírus da hepatite A, vírus da hepatite E, adenovírus e poliomavírus. O termo “vírus entérico” compreende todos os

Importância para a saúde pública da pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo

grupos de vírus que estão presentes no trato gastrointestinal humano. Estes vírus são excretados na urina e nas fezes dos hospedeiros.

Os vírus entéricos podem estar naturalmente presentes nos ambientes aquáticos, ou, mais frequentemente, serem introduzidos pelas atividades humanas. Estes vírus são tradicionalmente transmitidos por via fecal-oral e primariamente infetam e replicam no tgi do hospedeiro.

Embora as infeções por vírus entéricos estejam primariamente associadas a diarreia e gastroenterites autolimitadas (são os principais causadores de gastroenterites não bacterianas) podem também causar infeções respiratórias, conjuntivites, hepatites e outras patologias com elevados níveis de mortalidade, como meningites assépticas, encefalites e paralisias. Estas situações mais graves ocorrem principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Alguns vírus entéricos estão ainda associados a doenças crónicas, como diabetes mellitus e miocardites (4).

A tabela seguinte apresenta os vírus entéricos mais frequentes e resume algumas das suas características.

| Vírus | Família | Género | Genoma | Presença de envelope |
|--------------|-----------------------|-----------------------|----------|-----------------------|
| Norovirus | <i>Caliciviridae</i> | <i>Norovirus</i> | ss(+)RNA | Vírus não envelopados |
| Rotavírus | <i>Reoviridae</i> | <i>Rotavírus</i> | dsRNA | |
| Enterovirus | <i>Picornaviridae</i> | <i>Enterovirus</i> | ss(+)RNA | |
| VHA | <i>Picornaviridae</i> | <i>Hepatovirus</i> | ss(+)RNA | |
| VHE | <i>Hepeviridae</i> | <i>Hepevirus</i> | ss(+)RNA | |
| AdV | <i>Adenoviridae</i> | <i>Mastadenovirus</i> | dsDNA | |
| Polyomavirus | <i>Polyomaviridae</i> | <i>Polyomavirus</i> | dsDNA | |

Tabela I: Vírus entéricos: classificação taxonómica, tipo de genoma e presença de envelope

2.1.1. Norovírus

Os norovírus são vírus não envelopados, com genoma de RNA de cadeia simples de polaridade positiva, ss(+)RNA. Pertence à família *Caliciviridae* e apresenta 5 genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV), nos quais se englobam 40 genótipos. Os genótipos que infetam o Homem pertencem aos genogrupos GI, GII e GIV. Têm 20 a 40nm de diâmetro.

Os norovírus são uma das principais causas de gastroenterite, sendo responsáveis por cerca de 90% das gastroenterites não bacterianas (18). Afeta tanto crianças como adultos. A seroprevalência aumenta progressivamente durante a infância e mais de 90% dos jovens adultos são seropositivos. A imunidade não é duradora, ou seja, pode ocorrer reinfeção ao longo da vida.

O período de incubação varia entre 24 e 48 horas, e os sintomas podem manifestar-se durante 12 a 60 horas, no entanto, 30% das infeções são assintomáticas. Os sintomas incluem vômitos, diarreia, febre, dores abdominais e náuseas. Apesar de ser uma infeção tipicamente autolimitada e de curta duração, têm surgido evidências de casos de doença severa e por vezes fatal, especialmente entre as populações consideradas mais vulneráveis – crianças, idosos e imunocomprometidos.

Têm sido reportados surtos em instituições como hospitais e lares, onde o norovírus é especialmente difícil de controlar devido à transmissão pessoa-a-pessoa, e à resistência aos agentes de limpeza.

O modo de transmissão primário é a via fecal-oral, pela ingestão de água e alimentos contaminados, ou pelo contato direto com superfícies e pessoas contaminadas. A dose necessária para a contaminação é muito baixa sendo necessárias apenas entre 10 e 100 partículas virais (3).

Muitos surtos têm origem em águas poluídas, tanto de consumo como de recreio. Os norovírus pertencentes ao genogrupo GI têm significativamente maior probabilidade de serem transmitidos pela água que por outras vias, sendo mais estáveis no meio aquático que os pertencentes aos genogrupos GII e GIII.

Os norovírus têm sido detetados numa diversidade de ambientes aquáticos desde rios, a águas de consumo e recreativas. Pensa-se que o norovírus seja o principal causador de surtos com origem em águas de recreio.

Importância para a saúde pública da pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo

São vírus muito resistentes a condições ambientais adversas. Podem sobreviver a concentrações de cloro superiores a 10 ppm e a grandes amplitudes térmicas (entre 0 e 60°) (1).

O genoma do norovírus pode persistir 1 a 3 meses em diferentes tipos de águas, pode também resistir nas superfícies até 2 semanas. (3) Norovírus pertencentes a GI foram capazes de provocar infecção após 2 meses da contaminação da água e o seu RNA foi detetado por RT-PCR após 588 dias.

Nos países em desenvolvimento verificam-se aproximadamente 200 000 mortes/ano em crianças com idade inferior a 5 anos (1).

A explosão de dados relativos a surtos de norovírus nos anos mais recentes é razão para preocupação. Não é no entanto claro se isto se deve a um aumento dos relatos, da vigilância e deteção, ou a um aumento da incidência.

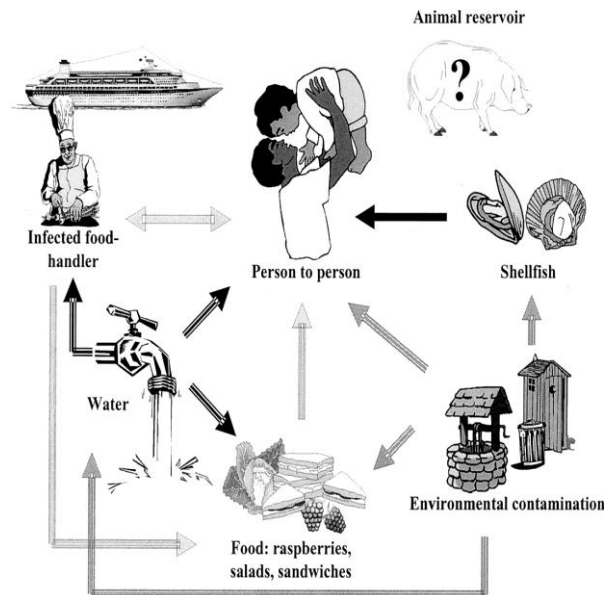


Imagem 1: vias de transmissão do norovírus e outros vírus entéricos (23).

2.1.2. Rotavírus

Os rotavírus são vírus relativamente grandes (~70nm), não envelopados e com cápside icosaédrica, o seu genoma é de RNA de cadeia dupla. Pertencem à família *Reoviridae* e ao género *Rotavirus*. Este género divide-se em grupos, subgrupos e serotipos, sendo esta divisão feita com base nas proteínas da cápside. Consideram-se sete grupos (A-G), sendo o grupo A aquele que é em geral associado às infeções humanas, engloba dois genótipos, o G com 14 serotipos e o P com 20.

Importância para a saúde pública da pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo

Os rotavírus são considerados a principal causa de gastroenterite aguda em crianças pequenas, estimando-se que sejam responsáveis por 25-35% de todos os casos de diarreia severa (3). Para além de diarreia os sintomas das infeções causadas por estes vírus incluem febre e vômitos.

Após replicar no tgi, estes vírus são excretados em quantidades elevadas nas fezes dos indivíduos infetados. São vírus facilmente transmitidos pessoa-a-pessoa, ou indiretamente através da comida ou da água, sendo necessárias apenas 10 partículas virais para causar infeção (10).

A infeção por rotavírus é sazonal, tendo início em Novembro com um pico entre Fevereiro e Março.

A estabilidade do RV nas águas e a sua resistência aos tratamentos normalmente utilizados facilitam a sua transmissão. RV foram detetados em águas superficiais na Alemanha, Itália e Holanda. O grupo A tem sido encontrado nas águas mesmo após tratamento (3).

A comparação de estudos realizados entre 1986-1999 e entre 2000 e 2004 revelou uma diminuição no número de casos de hospitalização por diarreia atribuídos ao rotavírus. Esta redução deve-se, provavelmente à melhoria das condições de higiene e ao aparecimento de vacinas contra estes vírus, sendo que estas desempenham um papel importante na imunização das crianças.

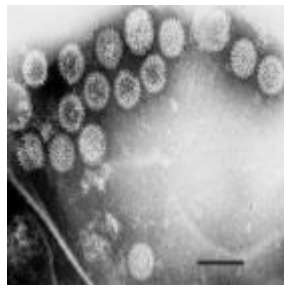


Imagem 2: Rotavírus, microscopia eletrónica (15).

2.1.3. Enterovírus

Os enterovírus são vírus nus, pertencentes à família *Picornaviridae*, com um genoma de RNA de cadeia simples de polaridade positiva (ss(+)RNA) constituído por aproximadamente 7500 nucleótidos. Apresentam uma cápside icosaédrica. Existem mais de 100 serótipos agrupados em 100 espécies.

Os humanos são os únicos reservatórios conhecidos deste vírus (3).

A doença causada por enterovírus é comum, mas em geral não tem consequências graves. Os sintomas são variados, sendo os mais comuns febre, vômitos, erupção cutânea, problemas do trato respiratório superior e de forma menos comum gastroenterite aguda. Podem, no entanto, verificar-se situações mais graves. Pode ocorrer virémia com disseminação do vírus por vários órgãos, originando complicações que incluem meningite, encefalite, poliomielite, miocardite, entre outras. Foram ainda associados a doenças crônicas como a miosite inflamatória, cardiomiopatia dilatada, esclerose amiotrófica lateral, síndrome da fadiga crônica e diabetes mellitus. Estes vírus são responsáveis por cerca de 85% das meningites assépticas.

A maioria dos enterovírus são inativados a 42°C, contudo alguns agentes redutores e cátions de magnésio podem estabilizar estes vírus, podendo por isso resistir a temperaturas na ordem dos 50°C (3). São capazes de suportar mudanças drásticas de temperatura e pH. Encontram-se nas águas, mesmo com elevados níveis de salinidade e após tratamento, sendo mais resistentes aos tratamentos normalmente usados que outros vírus entéricos. O facto de poderem ser encontrados em águas mesmo após tratamento demonstra o potencial perigo para a saúde pública. Tem sido documentada a existência destes vírus na água do mar um pouco por todo o mundo.

Apesar da ampla distribuição, foram relatados poucos casos de surtos relacionados com a água de consumo. O conhecimento limitado do papel da água na transmissão de enterovírus pode ser relacionado com numerosos fatores, incluindo a diversidade de sintomas, as infeções assintomáticas, que são frequentes, a diversidade de serotipos e a predominância da transmissão pessoa-a-pessoa.

A técnica de diagnóstico convencional é a cultura celular, esta é no entanto uma técnica demorada e, alguns enterovírus têm uma reduzida replicação em cultura celular. Desta forma o desenvolvimento da técnica de PCR foi uma mais-valia.

2.1.4. Vírus da hepatite A

O vírus da hepatite A é um vírus não envelopado, com genoma de RNA de cadeia simples de polaridade positiva (ss(+)RNA), pertencente à família *Picornaviridae* e ao género

Importância para a saúde pública da pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo

Hepatovirus. É um vírus esférico, com cápside icosaédrica e com cerca de 27nm de diâmetro. Existe um único serótipo que compreende 6 genótipos, dos quais o I e o II são predominantes (3).

O VHA tem um período de incubação que pode variar entre os 15 e os 50 dias, sendo a média de 28 dias. Os sintomas de infecção são os característicos das hepatites, como icterícia, urina escura e fezes acólicas. Para além destes pode ocorrer febre, anorexia, náuseas e dores abdominais. A hepatite fulminante é uma complicação rara, aumentando a incidência com o avançar da idade e em doentes com doença hepática crónicos. A infecção pelo VHA nunca evolui para doença crónica. Os sintomas surgem quando começa a diminuir a excreção, devendo-se os sintomas à resposta imune do hospedeiro. A transmissão ocorre desde o início do período de incubação até, aproximadamente uma semana após surgir icterícia. A via principal de transmissão é a via fecal-oral. A dose infecciosa é baixa e varia entre 10 e 100 viriões, desta forma mesmo reduzidos níveis de contaminação podem causar infecção. O vírus é excretado na urina e fezes dos indivíduos infetados.

A incidência da infecção pelo VHA varia com a região do mundo, sendo maior nos países em desenvolvimento onde o tratamento dos esgotos e as práticas de higiene são mais deficientes. O número de casos de infecção pelo VHA tem vindo a diminuir nos países onde foram implementados planos de imunização.

Este vírus consegue sobreviver 60 dias na água canalizada, 6 semanas na água dos rios, mais de 8 semanas nas águas subterrâneas e até 30 semanas na água do mar. É resistente a concentrações de cloro que variam entre 0.5 e 1.5ml/l durante 1 hora e a temperatura entre os 60 e os 80°C durante o mesmo período de tempo. Resiste a pHs tão baixos como 1 durante duas horas à temperatura ambiente, esta resistência pode explicar a capacidade para manter a virulência mesmo após sofrer a ação dos sucos gástricos (7).

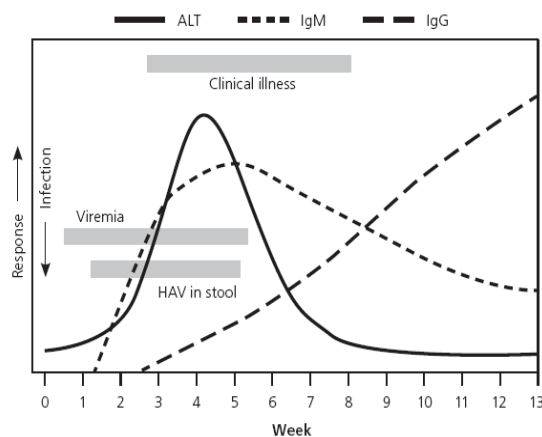


Imagem 3 : *Timeline* das manifestações do VHA (7)

2.1.5. Vírus da hepatite E

O vírus da hepatite E é um vírus nu, com genoma de RNA de cadeia simples e polaridade positiva (ss(+)RNA), esférico e com cápside icosaédrica. Pertence ao gênero *Hepevirus*, e apresenta 4 genótipos principais, sendo os genótipos GI e GII humanos, enquanto os genótipos GIII e GIV são zoonóticos.

A severidade da doença aumenta com a idade. Os sintomas incluem icterícia, urina escura e fezes acólicas, no entanto, a maioria dos casos é assintomática (98%) (8). O período de incubação do VHE varia entre 14 e 63 dias, tendo como média os 40 dias. A infecção resolve-se normalmente em 1 a 6 semanas. A taxa de mortalidade na população em geral é baixa (0.5 – 3%), aumentando quando se trata de mulheres grávidas (20 – 25%)(1). A imunidade conferida pela IgG não é duradoura.

Este vírus é transmitido por via fecal-oral, sendo facilmente disseminado através da água contaminada com matéria fecal. A transmissão pessoa-a-pessoa é rara.

A doença associada ao VHE é rara nos países industrializados, com a maioria dos casos a estar associada a viagens. Apesar disto o VHE tem sido detetado em diversos ambientes aquáticos, incluindo águas residuais em Espanha, Itália, França e EUA. O VHE tem ainda sido detetado em bivalves (1,8).

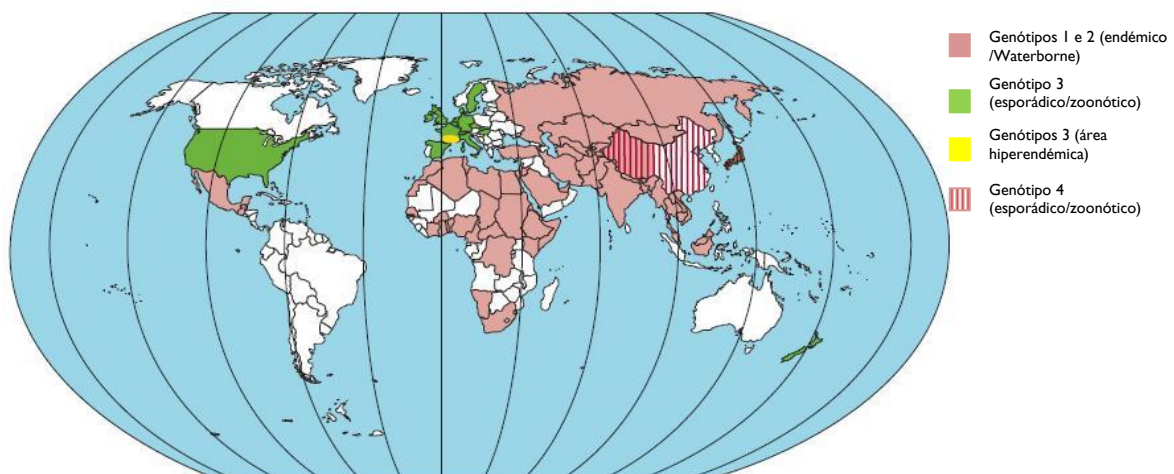


Imagem 4: distribuição geográfica dos casos de doença clínica por VHE (8).

2.1.6. Adenovírus

Os adenovírus são vírus não envelopados, com cápside icosaédrica e genoma de DNA de cadeia dupla linear (dsDNA). Pertencem à família *Adenoviridae* e ao gênero *Mastadenovirus*. São conhecidos 51 serótipos, englobando 6 espécies (A-F), sendo que os serótipos 40 e 41 são os mais associados a casos de diarreia aguda, particularmente em crianças (2).

As manifestações clínicas de infecção por adenovírus são muito heterogêneas variando de infecções respiratórias até gastroenterites, infecções do trato urinário, conjuntivites, hepatites, miocardites e encefalites. Os adenovírus podem causar doença severa particularmente em crianças, idosos e imunocomprometidos.

Estes vírus têm sido detetados em águas residuais, antes e após tratamento, demonstrando grande resistência aos tratamentos utilizados. Estes vírus são muito resistentes à luz UV, e podem sobreviver mais tempo que as bactérias utilizadas como indicadores da qualidade das águas. São frequentemente detetados nas águas superficiais.

Estudos realizados na Europa identificaram adenovírus em 36.4% das amostras. Os dados quantitativos indicam 3.2×10^2 cópias de genoma por 100 ml de água (1). Foi possível detetar adenovírus em amostras de água para consumo tratadas de forma convencional.

Os AdV são capazes de sobreviver meses na água, especialmente a baixas temperaturas. A sua grande estabilidade pode ser, em parte, atribuída ao seu genoma de DNA de cadeia dupla e à sua capacidade para reparar danos através da ativação de enzimas reparadoras do DNA. Estas características contribuem também para a sua grande resistência à radiação UV.

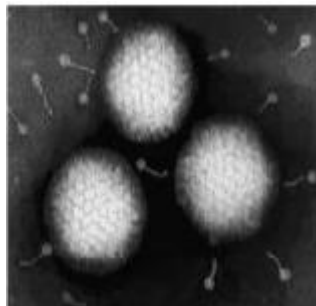


Imagem 5: Adenovírus, microscopia eletrônica (15)

2.1.7. Poliomavírus

Os poliomavírus são vírus pertencentes à família *Polyomaviridae*, e apresentam genoma de DNA de cadeia dupla, o que contribui para a sua estabilidade. Os três principais vírus pertencentes a esta família são o JCV, BKV e MCV.

Os vírus BK e JC são ubíquos na população humana, com cerca de 90% de população adulta seropositiva. A exposição aos PyV ocorre cedo, normalmente durante a infância (entre os 5 e os 10 anos).

As infeções por JCV são em geral assintomáticas e crónicas. Não existe consenso relativamente aos órgãos nos quais o vírus se instala, contudo, é praticamente unanime considerar-se o rim como um desses órgãos. Em indivíduos imunodeprimidos o vírus arquétipo, ou seja, não patogénico, tem a capacidade de se tornar patogénico e, através dos linfócitos transpor a barreira hematoencefálica. No cérebro o vírus vai destruir os oligodendrócitos, células responsáveis pela produção de mielina e como esta não é sintetizada o impulso nervoso deixa de ser transmitido. Os sintomas dependem da área do cérebro infetada. Desenvolve-se uma patologia designada “leucoencefalopatia multifocal progressiva”.

O vírus arquétipo é excretado de forma contínua na urina dos indivíduos portadores, sendo desta forma possível detetá-lo nas águas residuais.

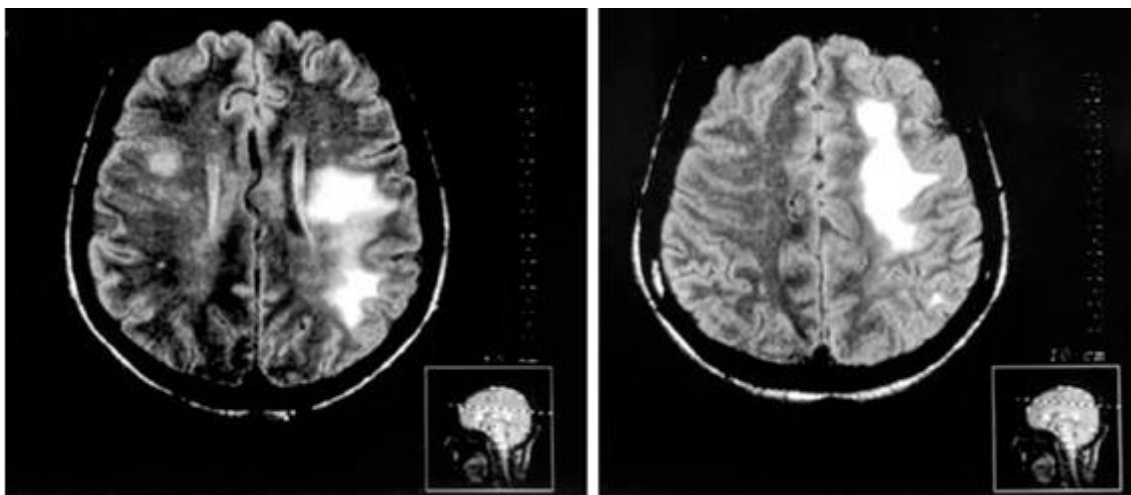


Imagem 6: Cérebro de doente com leucoencefalopatia multifocal progressiva

3. Análise microbiológica das águas

O controlo da qualidade das águas destinadas ao consumo humano divide-se em dois tipos: o controlo de rotina e o controlo de inspeção, ambos analisam a qualidade microbiológica das águas tendo apenas em consideração parâmetros bacteriológicos, nenhum dos controlos referidos inclui a pesquisa de vírus.

| Parâmetros bacteriológicos | Limites paramétricos | |
|-------------------------------|--|---|
| <i>E. coli</i> | 0 (número/100ml)*1 0 (número/250ml)*2 | *1 – Valores paramétricos para a água destinada a consumo humano fornecida por redes de distribuição. |
| Enterococos | 0 (número/100ml)*1 0 (número/250ml)*2 | *2 – Valores paramétricos para as águas colocadas à venda em garrafas ou outros recipientes. |
| Nº de colónias a 22°C | 100 (número/ml)*2 | |
| Nº de colónias a 37°C | 20 (número/ml)*2 | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0 (número/250ml)*2 | |

Tabela 2: parâmetros microbiológicos avaliados nas águas de consumo de acordo com o decreto-lei 306/2007

Estudos comparativos de deteção de enterovírus, adenovírus, rotavírus, vírus da hepatite A e norovírus com coliformes fecais mostram que não há qualquer correlação entre estes agentes nas diversas amostras de água consideradas.

A não realização da pesquisa de vírus para determinação da qualidade da água, pode dever-se, em parte, a dificuldades tecnológicas e aos custos elevados das análises. São necessários métodos eficientes e rápidos para concentração e deteção de vírus em amostras de águas com diferentes origens. Alguns autores têm sugerido a pesquisa de bacteriófagos como bons indicadores para monitorizar a qualidade virológica da água, pois estes podem estar presentes em fezes humanas e de animais, apresentam tamanho e morfologia semelhantes às dos grupos de vírus entéricos patogénicos, além de possuírem características de sobrevivência e de transporte similares. No entanto, os estudos realizados demonstram uma baixa ocorrência destes organismos nas águas analisadas (12).

Estudos mais recentes sugerem o uso de adenovírus como indicadores de poluição viral humana, pois são mais estáveis no meio ambiente, podem ocorrer em todas as estações do ano, são detetados mais facilmente e não apresentam nenhuma correlação quantitativa estatisticamente significativa com os indicadores bacterianos.

4. Tratamento das águas

O tratamento convencional completo da água para consumo inclui os seguintes passos: armazenamento, arejamento, coagulação, filtração, correção química e desinfecção.

Na etapa de filtração, na qual as partículas e microrganismos ficam retidos em membranas e filtros, normalmente obtém-se água bacteriologicamente segura para consumo humano, no entanto, a remoção viral é em geral ineficiente, uma vez que os vírus apresentam menores dimensões que as bactérias e dificilmente ficam retidos nos filtros utilizados.

A etapa de desinfecção é um processo normalmente eficaz contra algumas bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes. Esta, porém, não é adequada para eliminação de enterovírus, adenovírus e rotavírus, sendo extremamente ineficiente na remoção de HAV e norovírus.

Os norovírus são mesmo os mais resistentes à inativação por cloro, suportando concentrações de 6,26mg/L, estas concentrações são por norma eficientes na inativação de poliomavírus e rotavírus.

O HAV é também muito resistente, pois consegue persistir em águas com concentrações de cloro livre a variar entre 0,5mg/L e 1,5mg/L. Contudo estes vírus perdem a sua infecciosidade após tratamento com cloro na concentração de 5mg/L (12).

Estes dados demonstram a necessidade de desenvolver tratamentos mais eficazes e adequados para as águas destinadas a consumo humano, pois estes vírus apresentam enorme resistência aos tratamentos convencionais o que conjugado com a ausência de análises virológicas regulares constitui um perigo para a saúde pública.

5. Análise virológica de águas

Os passos básicos para uma análise virológica de águas são: amostragem, concentração, purificação e deteção.

5.1 Métodos de concentração

A concentração de vírus neste tipo de amostras é baixa, sendo conseqüentemente difícil a sua detecção direta. As técnicas de concentração viral têm associada alguma perda de vírus podendo ocorrer também a sua inativação como resultado de alterações de pH e adição de agentes quelantes. O maior problema destas técnicas é a introdução de inibidores de PCR e a concentração de inibidores pré-existentes. Para contornar estes problemas têm sido desenvolvidas diversas técnicas de purificação dos ácidos nucleicos.

Uma boa técnica de concentração viral tem de cumprir alguns requisitos: ser simples, rápida, providenciar uma elevada percentagem de recuperação de vírus, servir para um amplo leque de vírus, proporcionar um reduzido volume de concentrado, não ser dispendiosa, ser capaz de processar grandes volumes de água e, ainda, ser reprodutível. Não há, no entanto, nenhum método que cumpra todos estes requisitos.

Existem vários métodos de concentração de vírus a partir de amostras de água. Estes incluem – eluição, ultracentrifugação, liofilização, ultrafiltração. A escolha da técnica tem de ter em consideração o volume total do concentrado e as características da amostra. Usualmente estes métodos não são utilizados de forma isolada, sendo associados dois.

A ultracentrifugação tem demonstrado ser o melhor método. A população viral não é alterada, o pH não é modificado, é rápida, simples e, com um reduzido volume de amostra é possível obter elevadas recuperações. A principal desvantagem prende-se com o facto de equipamento ser dispendioso (ultracentrifuga).

| Método | Vantagens | Desvantagens |
|----------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Adsorção | | |
| Filtros carregados negativamente | Boas recuperações | Requer pré-tratamento da amostra. |
| Filtros carregados positivamente | Boas recuperações. | Dispendiosa. |
| Pó de vidro | Barato, boas recuperações. | Equipamento frágil. |
| Lã de vidro | Boas recuperações. | Variações de acordo com o fornecedor. |

| Precipitação | | |
|---------------------------|--|--|
| Floculação orgânica | Eficiente para amostras sujas ou como método de concentração secundário. | Possível extração de inibidores de RT-PCR. |
| Sulfato de amónio | | Elevada citotoxicidade. Inibição das enzimas usadas para a RT-PCR. |
| Polietilenoglicol | | Variabilidade intra-ensaio. |
| Ultracentrifugação | Rápido, simples, boas recuperações. | Dispendiosa. |
| Liofilização | Eficiente em amostras sujas ou como método de concentração secundário. | Dispendiosa e demorada. |
| Ultrafiltração | Boas recuperações em amostras limpas. | Dispendiosa e demorada. |

Tabela3: Métodos de concentração de vírus em amostras de água (10,16)

5.2. Métodos de deteção

Os vírus podem ser detetados por cultura celular, deteção de antigénios ou ácidos nucleicos. A eficiência da deteção de vírus depende de dois fatores: da eficiência da recuperação da técnica de concentração e da pureza dos vírus recuperados.

Atualmente as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (PCR, RT-PCR e qPCR) são as mais utilizadas para detetar vírus na água. As técnicas moleculares são sensíveis, específicas, rápidas e custo-efetivas, no entanto, não avaliam a viabilidade das partículas virais, ao contrário da cultura celular, porém esta técnica é demorada, trabalhosa e dispendiosa. Para além disso alguns vírus não são cultiváveis e outros são-no dificilmente. O PCR convencional, monoplex, não é capaz de detetar vários tipos de vírus simultaneamente numa mesma amostra. No PCR multiplex utiliza-se uma mistura de diferentes primers para detetar

Importância para a saúde pública da pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo

vários tipos virais em simultâneo numa única amostra, tornando o método mais rápido e económico. Há, porém, o risco de os primers utilizados poderem interferir uns com os outros.

Os métodos imunológicos podem ser utilizados para a pesquisa de antígenos virais nas águas, os ensaios imunoenzimáticos são os mais utilizados devido à elevada sensibilidade e especificidade. A imunocromatografia é um método simples e rápido, sendo a sua sensibilidade e especificidade comparáveis às dos ensaios imunoenzimáticos.

Estas técnicas estão disponíveis para diversos vírus e podem ser usadas quando estão presentes na amostra grandes quantidades de antígenos virais. No entanto, são menos específicas e sensíveis que os métodos moleculares e são muito suscetíveis a interferências. Para além disto, também não fornecem informações relativamente à viabilidade dos vírus (10,12).

6. Pesquisa de vírus em águas residuais

Durante o período de estágio tive a oportunidade de participar num projeto de investigação no laboratório de Virologia da Faculdade de Farmácia, sob a orientação da Doutora Ana Miguel e da Doutora Cristina Luxo. Este projeto visa a pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo.

As amostras utilizadas foram recolhidas e cedidas pelo Laboratório de Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Estas amostras são provenientes de 15 estações de tratamento de águas residuais (ETARs), localizadas de norte a sul do país. As amostras foram recolhidas à entrada e à saída destas ETARs durante o Outono e o Inverno.

As amostras foram guardadas num congelador a -20°C . Posteriormente foram concentradas por ultracentrifugação. Após concentração extraiu-se o ácido nucleico de acordo com a metodologia descrita e a pesquisa do ácido nucleico viral foi feita com recurso a qPCR.

Este projeto é recente e nesta primeira fase fez-se apenas a pesquisa de ADN do vírus JC e RNA do vírus da hepatite E. Os resultados obtidos são preliminares, no entanto já se obtiveram várias amostras positivas. A deteção do ácido nucleico do vírus é apenas o início sendo necessário, posteriormente fazer a quantificação e a identificação das estirpes virais. Estes resultados realçam a importância deste tipo de estudos e a necessidade de alertar as

Importância para a saúde pública da pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo

autoridades competentes para a importância da pesquisa de vírus em águas residuais, no âmbito da saúde pública.

Esta oportunidade permitiu-me aplicar na prática o tema desenvolvido na minha monografia e compreender as dificuldades da pesquisa de vírus nas águas. A possibilidade de participar neste projeto contribuiu para uma melhor percepção do tema abordado na monografia e foi sem dúvida uma experiência muito enriquecedora na minha formação científica. Posso ainda acrescentar que fez aumentar ainda mais o gosto que já possuía pela Virologia e pelo trabalho laboratorial.

Conclusão

O desenvolvimento, a globalização, a evolução genética dos patogéneos virais, e muitos outros fatores propiciam o surgimento de novas ameaças à qualidade da água. Apesar do progresso nos métodos de tratamento das águas, as doenças transmitidas através desta via continuam a ter importantes impactos socioeconómicos negativos, tanto nos países em desenvolvimento como nos países desenvolvidos.

É necessário que cada vez mais as autoridades estejam conscientes do papel que a água desempenha na transmissão de doenças, e da importância de tornar mais minuciosos os controlos microbiológicos, incluído nestes a pesquisa de vírus.

Há ainda um longo caminho a percorrer até que a análise rotineira de vírus para avaliação da qualidade da água seja uma realidade, estamos no entanto no bom caminho, sendo esta uma área que desperta cada vez mais o interesse dos investigadores e das autoridades regulamentares.

Bibliografia:

[1] – FRATINI, M.; IACONELLI, M.; LA ROSA, G.; LIBERA, S.; MUSCILLO, M. – Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Ann Ist Super Sanità*. Vol.48, nº4 (2012) 397-406.

[2] – CARTER, M. J. - Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of applied microbiology* 98 (2005) 1354-1380.

[3] – GANESH, A.; LIN, J. – Waterborne human pathogenic viruses of public health concern. *International Journal of Environmental Health Research* 23:6 (2013) 544-564.

[4] – FONG, T.; LIPP, E. – Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69:2 (2005), 357-371.

[5] – DONGDEM, J. T.; SOYIRI, I.; OCLOO, A. – Public health significance of viral contamination of drinking water. *African Journal of Microbiology Research* 3(12) (2009) 856-861.

[6] – NEL, L. H.; MARKOTTER, W. – New and Emerging Waterborne Infectious Diseases. *Water and Health I – UNESCO – Encyclopedia of Life Support Systems, Sample chapters*.

[7] – MATHENY, S. C.; KINGERY, J. E. – Hepatitis A. *American Family Physician* 86 (11) (2012) 1027-1034.

[8] – KAMAR, N.; BENDALL, R.; LEGRAND-ABRAVANEL, F.; XIA, N.; IJAZ, S.; IZOPET, J.; DALTON, H. R. – Hepatitis E. *Lancet* 379 (2012) 2477-2488.

[9] – GRIFFIN, D. W.; DONALDSON, K. A.; PAUL, J. H.; ROSE, J. B. – Pathogenic Human Viruses in Coastal Waters. *Clinical Microbiology Reviews* 16(1) (2013) 129-143.

[10] – RIBEIRO, A. M. – Detection of enteric virus in human faeces and residual waters: comparison of concentration methods and detection methods. *Universidade de Aveiro – Departamento de biologia* (2009).

[11] – MORILLO, S. G.; TIMENETSKY, M. C. S. – Norovirus: an overview. *Rev Assoc Med Bras* 57(4) (2011) 453-458.

Importância para a saúde pública da pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo

[12] – TAVARES, T. M.; CARDOSO, D. D. P.; BRITO, W. M. – Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. *Revista de Patologia Tropical* 34 (2) (2005) 85-104.

[13] – JOFRE, J.; BLANCH, A. R. – Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality. *Journal of applied microbiology* 109 (2010) 1853-1867.

[14] – ROSLEV, P.; BUKH, A. S. – State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Appl Microbiol Biotechnol* 89 (2011) 1341-1355.

[15] – CORRÊA, A. A. – Desafios da detecção de vírus gastroentéricos em água e alimentos. V Simpósio brasileiro de virologia comparada e ambiental (2011).

[16] – Decreto-Lei nº306/2007 de 27 de Agosto.

[17] – WONG, K.; FONG, T.; BIBBY, K.; MOLINA, M. - Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environment International* 45 (2012) 151-164.

[18] – BEURET, C.; KOHLER, D.; BAUMGARTNER, A.; LUTHI, T. – Norwalk-like Virus Sequences in Mineral Waters: One-year Monitoring of Three Brands. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4) (2002) 1925-1931.

[19] – ESPINOSA, A. C.; ESPINOSA, R.; MAURURI-AVIDAL, L.; MENDEZ, E.; MAZARI-HIRIART, M.; ARIAS, C.F. – Infectivity and genome persistence of rotavírus and astrovirus in drinking and irrigation water. *Water res.* 42 (2008) 2618-2628.

[20] – United States Environmental Protection Agency. Final Third Drinking Water Contaminant Candidate List. (2009).

[21] – BOSH, A. – Human virus in water: perspectives in medical virology. Elsevier (2007).

[22] - http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-282X2004000300034&script=sci_arttext (acedido a 24 de Maio de 2014)

[23] - <http://alagoasreal.blogspot.pt/2014/02/china-agua-engarrafada-contaminada.html> (acedido a 24 de Maio de 2014)