



NORMA TÉCNICA

L5.502

Dez/1987
29 PÁGINAS

Enterovirus em água - isolamento e quantificação:
procedimento

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	ENTEROVÍRUS EM ÁGUA ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO Procedimento	L5.502 DEZ/87
--------	---	----------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	2
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	5
5 Execução do ensaio.....	17
6 Resultados.....	20
Anexo A - Procedimentos complementares.....	23
Anexo B - Referências bibliográficas.....	27

INTRODUÇÃO

Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, isto é, só se multiplicam em células vivas, re-orientando os mecanismos de síntese das mesmas para a produção de ácido nucléico viral e, consequentemente, de novas partículas virais ou vírions.

Nas águas de superfície, que constituem os maiores mananciais, existem vírus originários da flora e fauna aquáticas, de plantas superiores e de animais e também vírus de origem humana, que chegam até elas como contribuição do lançamento de esgotos não devidamente tratados.

De uma maneira geral, quase todos os vírus que infectam o homem causam infecções no trato respiratório, mas poucos deles são capazes de ultrapassar a barreira ácida existente no estômago, e de se replicar no trato intestinal, que é o local de replicação preferencial dos Enterovírus (Polio, Cocksackie e ECHO), Adenovírus, Rotavírus, e Reovírus. A infecção pode surgir, tanto pela ingestão de alimentos ou de águas contaminadas com vírus, como pela disseminação destes, do trato respiratório para o trato digestivo.

Entre os Enterovírus estão incluídos mais de cem vírus diferentes, excretados pelo homem, sendo encontrados nas fezes humanas e nos esgotos. Nestes, os vírus podem sobreviver durante semanas ou meses, apesar das condições adversas que ali existem.

O carregamento de vírus de origem humana dos esgotos para outras águas pode ser controlado pelo tratamento adequado do esgoto e o risco de veiculação de vírus pela água de consumo pode ser controlado

pelo tratamento eficiente da mesma. A descarga de efluentes contaminados, diretamente num rio ou no mar, pode determinar a ocorrência de infecções humanas, pois, é fato conhecido, a transmissão de certas doenças por via hídrica.

A importância dos vírus presentes em água não reside em seu número, mas em sua infectividade. As menores quantidades de vírus que podem ser detectadas em culturas de células susceptíveis são suficientes para provocar infecção no homem.

A detecção dos vírus presentes em amostras ambientais é geralmente realizada através de métodos que são baseados na habilidade que os vírus possuem de causar destruição observável em culturas celulares. Dois métodos são mais utilizados: o método estimativo e o método enumerativo que determina o número de Unidades Formadoras de Placa (UFP). A seleção entre esses ensaios com culturas celulares dependerá do tipo de amostra a ser analisada.

A técnica de plaqueamento, que utiliza substrato semi-sólido, tem sido recomendada para o isolamento de vírus de amostras de águas contaminadas, pois através dessa metodologia é possível separar diferentes partículas virais.

A técnica estimativa, que utiliza meio líquido, é mais apropriada para inoculação de amostras de água tratada uma vez que esse método aumenta a probabilidade de detecção dos vírus.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve os procedimentos que permitem o isolamento e a quantificação de Enterovirus presentes em diferentes tipos de água.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- M1.002 - Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular
- L5.501 - Preparo de culturas celulares para ensaios virológicos
- L5.503 - Método de concentração de amostras para o isolamento de Enterovírus a partir de grandes volumes de água
- L5.504 - Identificação de Enterovírus
- L5.505 - Método de concentração de amostras de esgoto por adsorção a hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$) para o isolamento de Enterovírus
- L5.506 - Método de concentração de amostras de resíduos sólidos para o isolamento de Enterovírus

L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de micro
biologia

L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para
fins microbiológicos.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.14.

3.1 Picornavírus

Vírus icosaédricos pequenos (20-30 nm) constituídos de RNA fita ú
nica. Devido a certas características físicas, químicas e biológi
cas diferentes, os Picornavírus foram classificados em 2 gêneros: En
terovírus e Rhinovírus.

3.2 Enterovírus

Constituem um subgrupo dos Picornavírus humanos que incluem os Polio
vírus, os vírus Coxsackie e os vírus ECHO. São semelhantes no as
pecto epidemiológico, nas características físicas, químicas e bio
lógicas e no fato de infectarem o trato gastrointestinal do homem.

3.3 Cultura celular confluyente

É a cultura "in vitro" das células dispersas de um tecido animal
ou humano, que apresenta uma monocamada celular completa.

3.4 Linhagem celular

É o conjunto de células que se multiplicam "in vitro" por longos pe
ríodos de tempo. A heteroploidia é a responsável pela passagem "in
vitro" das células primárias que são diplóides, à condição de linha
gem celular.

3.5 Lise celular

Destruição das células devido a replicação de partículas virais.

3.6 Efeito citopático (ECP)

Alterações características que são apresentadas pelas células infec
tadas por partículas virais.

3.7 DICT₅₀

Dose infectante 50% em cultura de tecidos.

3.8 UFP

Unidades Formadoras de Placa.

3.9 Placas

São áreas circulares incolores das monocamadas celulares, constituí
das de células infectadas, visíveis a olho nu devido a adição de um

corante vital que cora as células viáveis, não corando as infectadas ou lisadas.

3.10 Corante vital

É aquele que cora as células que apresentam funções metabólicas normais.

3.11 Meio de cultura

É a mistura balanceada de substâncias consideradas essenciais para as células: aminoácidos, vitaminas, carboidratos, sais e proteínas que apresenta pH 7,0 a 7,2 e, assim fornece às células que se multiplicam "in vitro" condições semelhantes aquela que dispõem "in vivo".

3.11.1 Meio de crescimento

É o meio de cultura Eagle que contém 10% de soro fetal bovino inativado com ou sem solução de antibióticos. É usado para promover a rápida proliferação celular.

3.11.2 Meio de manutenção líquido

É o meio de cultura Eagle que contém 2% de soro fetal bovino inativado com ou sem solução de antibióticos. É usado para manter a cultura em estado metabólico baixo e contínuo, não necessariamente em multiplicação.

3.11.3 Meio de manutenção sólido ou meio gelificado

É o meio de cultura Eagle 2 x concentrado sem vermelho de fenol, acrescentado de soluções de sais, L-glutamina, antibióticos, soro fetal bovino inativado e corante vital (vermelho neutro). É usado para isolamento e quantificação dos vírus em monocamadas celulares.

3.12 Soro fetal bovino inativado

O soro fetal bovino inativado, no meio de cultura é um componente suplementar-estimulador cujas funções principais são nutrir e também inibir certas enzimas proteolíticas secretadas pelas próprias células. O fator essencial presente no soro é a fetuína de origem protéica, que parece ser necessária ao achatamento das células sobre a superfície do vidro. A inativação do soro é efetuada através do aquecimento em banho-maria a 56°C por 30 minutos, na qual são inativados inibidores ou aglutininas não específicas contidas no soro.

3.13 q.s.p

Quantidade suficiente para.

3.14 p.a

Para análise.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Agitador tipo "Vortex"

4.1.2 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado por esse método e ser equipada com válvula de segurança, com um manômetro e com um termômetro, cujo bulbo ficará na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave é normalmente operada a uma pressão de vapor de 15 libras por polegada quadrada, produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Deve-se observar, em seu funcionamento, a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara. A operação total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operações e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121°C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

4.1.3 Balanças

4.1.3.1 Com sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.

4.1.3.2 Com sensibilidade mínima de 1 mg ao pesar 10 g.

4.1.4 Banho-maria

Equipado com termostato para temperaturas de 35°C a 56°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo meios de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição.

4.1.5 Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical)

Equipamento que possibilita a retenção de partículas do ar através da passagem do mesmo por filtros HEPA, cuja eficiência é de 99,99% para partículas iguais ou maiores a 0,3 µm. O ar estéril produzido é dirigido em forma de fluxo direto sobre a área de trabalho, proporcionando grande segurança nos manuseios que devem ser realizados em condições de máxima esterilidade como também proteção dos operadores.

4.1.6 Centrífuga refrigerada

Com velocidade até 6 000 rpm e que tenham rotores com caçapas para volumes de até 20,0 mL e 1 000,0 mL.

4.1.7 Congeladores

Com regulagem para manter a temperatura na faixa de -20°C e -70°C . É destinado ao armazenamento de soluções e dos concentrados das amostras. A limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.8 Destilador de água ou sistema purificador de água

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram no desenvolvimento das culturas de células.

4.1.9 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, frascos para reagentes e meios de cultura e toda vidraria e aparelhagem que pode ser esterilizada por calor seco, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170 a 180°C . O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 4 a 6 horas, à temperatura de 170 a 180°C .

4.1.10 Fonte de pressão

Bomba de pressão ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão de $1,0 \text{ kgf/cm}^2$.

4.1.11 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com capacidade suficiente para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas, quando o material de trabalho estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande, devem ser colocados um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deverá manter 75 a 85% de umidade relativa e ser colocada em local onde a temperatura permaneça preferencialmente na faixa de 16 a 27°C .

4.1.12 Máquina dosadora automática de Brewer

Com capacidade para dosar 5 a 50,0 mL de meio de cultura.

4.1.13 Microscópio binocular de focalização invertida

4.1.14 Placa agitadora magnética

Com velocidade regulável.

4.1.15 Pipetador automático

Ou outro dispositivo de segurança para sucção de conteúdos líquidos.

4.1.16 Porta-filtros

De aço inoxidável, diâmetros de 47 mm, 142 mm e 293 mm.

4.1.17 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com precisão mínima de 0,1 unidades de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de pH 4,0, pH 6,86 e pH 9,18.

4.1.18 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C, com capacidade para conter os meios de cultura e as soluções a serem mantidos sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.19 Seringas automáticas, tipo Cornwall de 2e5,0 mL

4.1.20 Vasilhames de pressão

De aço inoxidável, com capacidade de 5 e 10 litros.

4.2 Materiais

4.2.1 Alcoômetro

4.2.2 Algodão hidrófilo

4.2.3 Bandejas de aço inoxidável

4.2.4 Braçadeiras

Tipo rosca sem fim de 1" e 1/2".

4.2.5 Barra magnética

Recoberta com teflon, tamanho 6 cm x 1 cm.

4.2.6 Chaves especiais para porta-filtros

4.2.7 Estantes de aço inoxidável

Perfuradas, para tubos de cultura com cunhas para ajuste do ângulo de inclinação.

4.2.8 Fita adesiva

Para controle do material submetido à esterilização em estufa ou autoclave.

4.2.9 Fita crepe

4.2.10 Flaconete

Do mesmo tipo utilizado para condicionar penicilina, com capacidade de 20,0 mL com tampa de borracha.

4.2.11 Frascos com uma face plana de 44 cm² para cultivo de células (semente)

4.2.12 Frascos Cultex ou similar com uma face plana de 25 cm² para cultivo de células

4.2.13 Frascos com capacidade de 1 000,0 mL com tampa de rosca para armazenamento de meio de cultura

4.2.14 Mangueiras de borracha

Com parede espessa, resistentes à pressão.

4.2.15 Mangueiras de plástico rígido, de 1/4"

4.2.16 Materiais para preparação de meios de cultura e reagentes

Recipientes de vidro neutro ou aço inoxidável. O material de aquecimento e os bastões devem estar limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

4.2.17 Membranas filtrantes

De éster de celulose, com porosidade de 0,22 µm e 0,45 µm, com diâmetro de 47 mm, 142 mm e 293 mm.

4.2.18 Papel alumínio

4.2.19 Papel Kraft

4.2.20 Pinça

4.2.20.1 Dente de rato, de aço inoxidável.

4.2.20.2 Pontas retas e bordas lisas, de aço inoxidável.

4.2.21 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 1,0 mL, 5,0 mL e 10,0 mL com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5%, e com bocal para tampão de algodão. São guardadas em porta-pipetas, de aço inoxidável, podendo também ser embrulhadas individualmente em papel Kraft. São esterilizadas por calor seco a 170-180°C, durante 4-6 horas.

4.2.22 Pipetas tipo Pasteur

4.2.23 Pisseta para álcool 70%

4.2.24 Porta-pipetas, de aço inoxidável

4.2.25 Provetas graduadas

Com marcação externa, nos volumes de 100, 250, 500, 1000 e 2000,0 mL.

4.2.26 Pré-filtro de fibra de vidro

Tipo AP-20, com diâmetro de 47 mm, 142 mm e 293 mm.

4.2.27 Rolhas de borracha ácido-resistente n^os 2, 3, 4, 6, 8 e 9

4.2.28 Terminais de mangueira, com engate rápido

De aço inoxidável, para a conexão aos vasilhames de pressão.

4.2.29 Tubos de centrífuga

Com capacidade de 20 mL, 100 mL e 1000,0 mL.

4.2.30 Tubos de ensaio

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, de 15 mm x 150 mm, com tampa de rosca.

4.2.31 Tubos de ensaio, de borossilicato (Pyrex) ou vidro neutro, de 16 mm x 150 mm

4.3 Reagentes

Para o preparo dos meios de cultura, devem ser utilizados reagentes de boa qualidade, isto é, devem ser de grau bacteriológico e de procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalterados. Uma vez feita a escolha dos reagentes, seu uso deverá ser padronizado e, quando possível, serem mantidos sem modificações posteriores. Datar os frascos de reagentes após recebimento e abrir ficha controle na qual devem constar a data de chegada e todas as pesagens realizadas. Isto permite o controle do estoque de drogas existentes no laboratório.

4.3.1 Reagentes necessários

- Ácido clorídrico (HCl) p.a.
- Ácido fólico (cristalino)
- Anfotericina B (fungizona), 250 µg/mL
- Água bidestilada
- Água destilada
- Álcool etílico comercial
- l-arginina. HCl
- Bacto-agar ou agarose
- Bacto-dextrose
- Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) p.a.
- Biotina
- l-cistina
- Cloreto de cálcio anidro (CaCl₂) p.a.
- Cloreto de colina
- Cloreto de magnésio (MgCl₂) p.a.
- Cloreto de potássio (KCl) p.a.
- Cloreto de sódio (NaCl) p.a.
- Dextrose
- l-fenilalanina

- Formalina
- Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a.
- Fosfato de sódio ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) p.a.
- Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) p.a.
- l-glutamina
- Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.
- l-histidina . HCl
- l-inositol
- l-isoleucina
- l-leucina
- l-lisina . HCl
- l-metionina
- Nicotinamida
- Pantotenato de cálcio
- Penicilina G-potássica
- Peptona
- Piridoxina . HCl
- Riboflavinina
- Sulfato de gentamicina
- Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) p.a.
- Tiamina . HCl
- l-tirosina
- l-treonina
- l-triptofano
- Triptona
- l-valina
- Vermelho neutro.

4.4 Meios de cultura

4.4.1 Caldo de soja e triptona ("Tryptic Soy Broth")

Fórmula:

Triptona.....	17 g
Peptona de soja.....	3 g
Dextrose.....	2,5 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Fosfato de potássio dibásico.....	2,5 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização.....	7,3 \pm 0,2

Preparo:

Pesar 30 g do meio desidratado "Tryptic Soy Broth" e acrescentar

1 000,0mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente , até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não se ja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH para 7,3 com solução de hidróxido de sódio 1 N (item 4.5.8). Distribuir volumes de 12,0 mL em tubos de 15 mm x 150 mm, com tampa de ros ca. Esterilizar por autoclavação (item 4.7.2).

4.4.2 Meio de Eagle

Ver Norma CETESB L5.501.

4.4.3 Meio de Eagle com 5% de soro fetal bovino inativado

(ver Norma CETESB L5.501).

4.4.4 Meio de Eagle 2 x concentrado sem vermelho de fenol (com sais de Earle)

O meio de cultura Eagle 2 x concentrado é obtido a partir do meio de Eagle 10 x concentrado e é constituído de:

- duas soluções de aminoácidos (soluções A e B)
- três soluções de vitaminas (soluções C, D e E)
- dextrose, sais e fosfatos.

4.4.4.1 Solução A - Aminoácidos

<u>Fórmula:</u>	g/l L (10x)
l-arginina . HCl.....	1,05 g
l-histidina . HCl.....	0,31 g
l-lisina . HCl.....	0,58 g
l-triptofano.....	0,10 g
l-fenilalanina.....	0,32 g
l-treonina.....	0,48 g
l-leucina.....	0,52 g
l-valina.....	0,46 g
l-isoleucina.....	0,52 g
l-metionina.....	0,15 g

4.4.4.2 Solução B - Aminoácidos

<u>Fórmula:</u>	g/l L (10x)
l-tirosina.....	0,36 g
l-cistina.....	0,24 g
Ácido clorídrico (HCl) 0,075 N (item 4.5.3).....	200,0 mL

Preparo:

Pesar os dois aminoácidos e dissolver em 200,0 mL de HCl 0,075 N com leve aquecimento a 80°C em banho-maria ou sob leve agitação constante até a completa dissolução.

4.4.4.3 Solução C - Vitaminas

<u>Fórmula:</u>	g/l L (10x)
Nicotinamida.....	200 mg
Piridoxina . HCl.....	200 mg
Tiamina . HCl.....	200 mg
Pantotenato de cálcio.....	200 mg
Cloreto de colina.....	200 mg
i-inositol.....	400 mg
Riboflavina.....	20 mg
Água bidestilada q.s.p.....	200,0 mL

Preparo:

Pesar as vitaminas e dissolver com aproximadamente 175,0 mL de água bidestilada. Completar o volume final para 200,0 mL. Distribuir a solução em volumes de 10,0 mL e armazenar em congelador a -20°C . A cada um litro de meio Eagle 10 x concentrado adicionar 10,0 mL da solução C.

4.4.4.4 Solução D - Vitaminas

<u>Fórmula:</u>	g/l L (10x)
Biotina.....	200 mg
Ácido clorídrico (HCl) 1 N (item 4.5.2).....	1,0 mL
Água bidestilada q.s.p.....	200,0 mL

Preparo:

Pesar 200 mg de biotina e dissolver em cerca de 150,0 mL de água bi destilada. Para aumentar a estabilidade, acrescentar 1,0 mL de HCl 1N e, completar o volume final para 200,0 mL com água bidestilada. Distribuir a solução em volumes de 10,0 mL e armazenar em congelador a -20°C . A cada um litro de meio Eagle 10 x concentrado adicionar 10,0 mL da solução D.

4.4.4.5 Solução E - Vitaminas

<u>Fórmula:</u>	g/l L (10x)
Ácido fólico cristalino.....	200 mg
Solução salina de Hanks 1 x q.s.p.....	200,0 mL

Preparo:

Pesar 200 mg de ácido fólico e dissolver em cerca de 150,0 mL de solução salina de Hanks 1 x (ver norma CETESB L5.501). Completar o volume para 200,0 mL com a solução salina de Hanks. Distribuir a solução em volumes de 10,0 mL e armazenar a -20°C . A cada 1 litro de meio Eagle 10 x concentrado adicionar 10,0 mL da solução E.

4.4.4.6 Preparo da mistura final do meio Eagle 2 x concentrado em solução salina de Earle

- a) Os componentes a seguir são dissolvidos na solução B (item 4.4.4.2)

	g/1 L (10 x)
Cloreto de sódio (NaCl).....	68 g
Cloreto de potássio (KCl).....	4 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O).....	2 g

- b) Pesar 1,4 g de fosfato de sódio (NaH₂PO₄.H₂O) e dissolver em 55,0 mL de água bidestilada. Adicionar no "pool" a cima (item a);
- c) Pesar 10,0 g de bacto-dextrose e dissolver em 50,0 mL de água bidestilada. Adicionar no "pool" a cima (item a);
- d) O volume do "pool" (item a) é ajustado para 600,0 mL com água bidestilada e as seguintes soluções são adicionadas para 1 litro de meio Eagle 10 x concentrado:

Soluções	mL/1L (10 x)
C.....	10,0 mL
D.....	10,0 mL
E.....	10,0 mL

- e) Pesar 2 g de cloreto de cálcio (CaCl₂) e dissolver em 160,0 mL de água bidestilada. Após dissolução adicionar esta solução no "pool" lentamente com "agitação vigorosa";
- f) Os aminoácidos da solução A (item 4.4.4.1) são adicionados no "pool" na ordem descrita, e o volume é ajustado aproximadamente para 950,0 mL com água bidestilada. Esta mistura é mantida em refrigerador a 4°C durante a noite;
- g) Decorrido este tempo o volume total é ajustado para 1 000,0 mL com água bidestilada. Esterilizar por filtração (item 4.7.1). Distribuir volumes de 500,0 mL e efetuar prova de esterilidade, colocando os frascos à temperatura de 35°C durante 24-48 horas. Armazenar em congelador à -20°C, e
- h) Para o uso, o meio Eagle 10 x concentrado sem vermelho de fenol é diluído à 2 x concentrado, da seguinte maneira:
- | | |
|--|----------|
| Meio de Eagle 10 x conc. s/vermelho de fenol.... | 100,0 mL |
| Água bidestilada estéril..... | 400,0 mL |
- O meio de Eagle 2 x concentrado sem vermelho de fenol, assim obtido, é armazenado em congelador a -20°C.

4.4.5 Meio gelificadoFórmula:

Eagle 2 x concentrado sem vermelho de fenol (item 4.4.4)...	46,5 mL
Solução de glutamina a 3% (item 4.5.7).....	1,0 mL
Soro fetal bovino inativado a 56°C/30'.....	2,0 mL
Solução de bicarbonato de sódio a 7,5% (item 4.5.5).....	3,0 mL
Solução de cloreto de magnésio a 1% (item 4.5.6).....	1,0 mL
Solução de vermelho neutro a 1:1000 (item 4.5.11).....	1,5 mL
Solução de penicilina G-potássica (item 4.5.9).....	0,1 mL
Solução de sulfato de gentamicina (item 4.5.10).....	0,1 mL
Anfotericina B (Fungizona) 250 µg/mL.....	0,1 mL
Solução de bacto-agar ou agarose a 3% (item 4.5.4).....	50,0 mL

Preparo:

Juntar todos os componentes, com exceção do bacto-agar ou agarose, na ordem indicada acima, lentamente e com agitação moderada. Estabilizar esse meio em banho-maria a 46-47°C. Adicionar então, a solução de bacto-agar ou agarose agitando lentamente evitando a formação de bolhas. Conservar o meio gelificado em banho-maria à 46-47°C, durante a distribuição.

Nota: A concentração final de bacto-agar ou agarose no meio gelificado deverá ser sempre 1,5 %.

4.5 Soluções4.5.1 Álcool a 70%Fórmula:

Álcool etílico comercial.....	700,0 mL
Água destilada.....	±300,0 mL

Preparo:

Medir 700,0 mL de álcool etílico comercial em recipiente adequado e adicionar uma quantidade de água (aproximadamente 200,0 a 300,0 mL) suficiente para obter uma solução com teor de 70% de álcool. Essa verificação é feita através do uso do alcoômetro.

4.5.2 Solução de ácido clorídrico (HCl) 1NFórmula:

Ácido clorídrico fumegante.....	83,5 mL
Água destilada estéril.....	916,5 mL

Preparo:

Em um balão volumétrico com 916,5 mL de água destilada estéril, adicionar 83,5 mL de ácido clorídrico fumegante.

4.5.3 Solução de ácido clorídrico (HCl) 0,075NFórmula:

Ácido clorídrico fumegante..... 6,3 mL
Água bidestilada estéril..... 993,7 mL

Preparo:

Em um balão volumétrico com 993,7 mL de água bidestilada estéril, a dicionar 6,3 mL de ácido clorídrico fumegante.

4.5.4 Solução de bacto-agar ou agarose a 3%Fórmula:

Bacto-agar ou agarose..... 3,0 g
Água bidestilada..... 100,0 mL

Preparo:

Pesar 3,0 g de bacto-agar ou agarose e acrescentar 100,0 mL de água bidestilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do agar, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar por autoclavagem (item 4.7.2). Após a esterilização, mantê-lo em banho-maria a 46-47°C para evitar a solidificação do mesmo.

4.5.5 Solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 7,5%Fórmula:

Bicarbonato de sódio..... 75,0 g
Água bidestilada..... 1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 75,0g de bicarbonato de sódio e diluir em 1 000,0 mL de água bi destilada. Esterilizar por filtração (item 4.7.1). Distribuir em vo lumes de 100,0 mL. Armazenar em refrigerador (2 a 8°C).

4.5.6 Solução de cloreto de magnésio (MgCl₂.6H₂O) a 1%Fórmula:

Cloreto de magnésio..... 5,0 g
Água bidestilada..... 500,0 mL

Preparo:

Pesar 5,0 g de cloreto de magnésio e diluir em 500,0 mL de água bides tilada. Distribuir em volumes de 100,0 mL Esterilizar por autoclava ção (item 4.7.2). Armazenar em refrigerador (2 a 8°C).

4.5.7 Solução de l-glutamina a 3%Fórmula:

l-glutamina..... 3,0 g
Água bidestilada..... 100,0 mL

Preparo:

Pesar 3,0 g de l-glutamina e dissolver em 100,0 mL de água bidestilada. Esterilizar por filtração (item 4.7.1) e distribuir em volumes de 50,0 mL. Armazenar em congelador (-20°C).

4.5.8 Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1NFórmula:

Hidróxido de sódio..... 40,0 g
 Água destilada estéril q.s.p..... 1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 40,0g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000,0 mL de água destilada estéril.

4.5.9 Solução de penicilina G-potássica cristalinaFórmula:

Penicilina G-potássica cristalina..... 10 milhões U
 Água bidestilada estéril..... 100,0 mL

Preparo:

Dissolver o conteúdo de um frasco de penicilina G-potássica cristalina em 100,0 mL de água bidestilada estéril. Distribuir a solução em volumes de 50,0 mL. Armazenar em congelador a -20°C.

4.5.10 Solução de sulfato de gentamicinaFórmula:

Sulfato de gentamicina (40 mg)..... 1,0 mL
 Água bidestilada estéril..... 3,0 mL

Preparo:

Retirar o conteúdo de uma ampola de sulfato de gentamicina (40 mg), com auxílio de uma seringa hipodérmica e misturar com 3,0 mL de água bidestilada estéril. Armazenar em congelador a -20°C.

4.5.11 Solução de vermelho neutro a 1:1000Fórmula:

Vermelho neutro..... 0,2 g
 Água bidestilada..... 200,0 mL

Preparo:

Pesar 0,2 g de vermelho neutro e diluir em 200,0 mL de água bidestilada. Filtrar em papel de filtro. Esterilizar por filtração (item 4.7.1). Distribuir volumes de 100,0 mL em frascos âmbar. Armazenar em refrigerador (2 a 8°C).

4.6 Culturas celulares (ver norma CETESB L5.501)4.6.1 Para a inoculação das amostras são utilizadas culturas celu

lares em monocamadas confluentes, semeadas em garrafas tipo Cultex com meio de crescimento.

4.6.2 Para a coleta das placas virais formadas no meio gelificado, são utilizadas culturas semeadas em tubos de 16 mm x 150 mm, com meio de crescimento.

4.7 Esterilização das soluções e meios de cultura

4.7.1 Filtração

A filtração de soluções ou de meios de cultura que contêm substâncias termolábeis, é feita com pressão positiva ou vácuo, usando-se membranas de éster de celulose acopladas, com as seguintes porosidades: 0,45 μm e 0,22 μm . Membranas clarificantes de fibra de vidro, podem também ser incluídas e, as de tipo AP-20 são as mais indicadas. A montagem das membranas deve ser feita obedecendo uma ordem de crescente de porosidade.

Todos os materiais e equipamentos utilizados para a filtração deverão ser esterilizados previamente por autoclavação a 121°C durante 30 minutos.

4.7.2 Autoclavação

Esterilizações de soluções ou de meios de cultura em autoclave devem ser feitos em temperatura de 121°C durante 15 minutos. Durante a autoclavação de meios de cultura, não deve haver excesso de aquecimento para evitar uma sobrecarga térmica que possa produzir hidrólise, peptonação, caramelização ou outro tipo de destruição das substâncias que constituem os meios de cultura.

4.8 Armazenamento de soluções

As soluções são armazenadas em refrigerador (2 a 8°C) ou em congelador (-20°C). São mantidas em frascos bem fechados, com rolhas de borracha ou tampa com rosca, pois os tampões de algodão podem permitir a entrada e a conseqüente absorção de substâncias inespecíficas. Soluções alcalinas não devem ser estocadas em frascos de vidro por muito tempo, pois esses frascos são lentamente dissolvidos e íons de metais pesados são, posteriormente, encontrados nessas soluções.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

Os Enterovírus de um modo geral, crescem melhor em culturas de células primárias, no entanto, eles podem ser isolados em linhagens de

células de rins de diferentes espécies de macacos (Macaca mulatta, Cercopithecus aethiops), em linhagens humanas (amnion, rhabdomiosarcoma, carcinoma epidermóide de laringe, carcinoma epitelióide de cervix humano), e outras.

A replicação dos Enterovírus em cultura celular está geralmente as sociada a um efeito citopático (ECP) caracterizado por uma desorganização celular que consiste em arredondamento, aumento de refração, lise e descolamento das células infectadas da parede do vidro. Este efeito pode ser facilmente observado ao microscópio óptico invertido, em culturas celulares inoculadas segundo a técnica de isolamento de vírus em meio líquido.

Na técnica de isolamento em que se emprega meio gelificado com vermelho neutro, as células normais apresentam uma coloração rosada de vido a incorporação do corante vital. As partículas virais ao infectarem as células normais, se replicam propagando-se para as células vizinhas; essas células danificadas pela infecção viral perdem a capacidade de absorção desse corante e aparecem como regiões circulares incolores ou "placas", que se destacam, portanto, das demais células que estão coradas pelo vermelho neutro.

O fato de uma placa poder ser produzida originalmente por uma única partícula infectante, ou vírion, torna este método altamente quantitativo, permitindo calcular o número de unidades virais a partir do número de placas formadas no agar.

Placas de vírus Polio podem aparecer em 2 a 4 dias enquanto que alguns vírus ECHO podem demorar cerca de 7 a 10 dias para formar placas.

5.2 Amostras

5.2.1 As amostras de água tratada, água superficial (doce ou salga da), esgoto e lodo de esgoto são previamente concentradas e os concentrados finais tratados com solução de antibióticos e testados quanto a esterilidade, antes de serem inoculados (ver normas CETESB L5.503, L5.505 e L5.506).

5.2.2 A inoculação dos concentrados finais das amostras em culturas celulares, deve ser realizada em capelas de segurança biológica (câmaras de fluxo laminar vertical).

5.3 Procedimento

5.3.1 A partir dos concentrados finais das amostras de água superficial (doce ou salgada), esgoto e lodo de esgoto

5.3.1.1 Antes de iniciar o trabalho, desinfetar a câmara de fluxo laminar vertical com álcool a 70%.

5.3.1.2 Colocar na câmara de fluxo laminar todo o material necessário, tais como: pipetas, pinças, gaze, pipetador automático, etc.

5.3.1.3 Fazer a assepsia do bocal e da rolha das garrafas de culturas celulares, com álcool a 70% e em seguida flambar.

5.3.1.4 Desprezar o meio de cultura das garrafas com células.

5.3.1.5 Inocular 1,0mL de meio de Eagle com 5% de soro fetal bovino inativado em cada garrafa.

5.3.1.6 Homogeneizar a amostra em agitador tipo Vortex.

5.3.1.7 Inocular 10 a 15 garrafas de células com 0,5 ou 1,0 mL da amostra (por garrafa), ou caso seja necessário, inocular 1,0 mL das respectivas diluições.

5.3.1.8 Incubar as garrafas à temperatura de 35°C durante 1 a 2 horas para adsorção e penetração dos vírus nas células.

5.3.1.9 Após o período de incubação, desprezar o inóculo das garrafas de células.

5.3.1.10 Inocular com seringa automática tipo Cornwall, 5,0 mL do meio gelificado (item 4.4.5) em cada garrafa e espalhá-lo cuidadosamente sobre a monocamada de células.

5.3.1.11 Após a solidificação do meio, incubar as garrafas, em posição invertida e no escuro, a 35°C durante 14 dias.

5.3.1.12 Fazer leituras diárias, observando e anotando o aparecimento das placas de lise na monocamada de células.

5.3.1.13 De cada garrafa positiva, remover cada placa formada, raspando as áreas de células degeneradas e o agar, com o auxílio de uma pipeta Pasteur conectada a uma bomba a vácuo, transferindo esse material para um tubo de ensaio estéril contendo 1,0 mL de meio de crescimento (item 3.11.1).

5.3.1.14 Homogeneizar cada tubo em agitador tipo Vortex e inocular 1,0 mL de suspensão celular. Incubar a temperatura de 35°C.

5.3.1.15 Fazer leituras diárias, observando o aparecimento do efeito citopático (ECP) nas culturas de células.

5.3.1.16 Quando as culturas celulares apresentarem 75% de efeito citopático, congelar e descongelar 3 vezes cada tubo de ensaio, para maior liberação das partículas virais, procedendo em seguida à titulação e identificação (ver norma CETESB L5.504).

5.3.2 A partir dos concentrados finais das amostras de água tratada

5.3.2.1 Proceder como descrito nos itens 5.3.1.1 ao 5.3.1.8, exceto o item 5.3.1.5.

5.3.2.2 Após o período de incubação, inocular com seringa automática, tipo Cornwall, 14,0 mL de meio de manutenção líquido (item 3.11.2) em cada garrafa com célula.

5.3.2.3 Incubar as garrafas à temperatura de 35°C, durante 10 dias.

5.3.2.4 Fazer leituras diárias, observando o aparecimento do efeito citopático (ECP) nas culturas; caso não apareça são consideradas negativas. As garrafas que apresentarem suspeitas de efeito citopático devem ser congeladas à temperatura de -70°C.

5.3.2.5 Congelar e descongelar as garrafas com células à temperatura de -70°C, repetindo o processo 3 vezes, agitando vigorosamente para que as células se destaquem da parede do frasco.

5.3.2.6 Fazer um "pool" das garrafas positivas e centrifugar a 3 000 rpm durante 15 minutos, para remover os detritos celulares.

5.3.2.7 Fazer nova passagem do "pool", procedendo como descrito nos itens 5.3.2.1 a 5.3.2.4.

5.3.2.8 Após o período de incubação, as garrafas que apresentarem efeito citopático são consideradas positivas quanto à presença do vírus. As garrafas que não apresentarem efeito citopático são consideradas negativas.

5.3.2.9 Congelar as garrafas positivas a -70°C e descongelar conforme descrito no item 5.3.2.5, dando prosseguimento ao ensaio de acordo com os itens 5.3.1.1 ao 5.3.1.16.

6 RESULTADOS

6.1 Amostras de água superficial (doce ou salgada), esgoto e lodo de esgoto

6.1.1 A quantidade de vírus é expressa em UFP (Unidades Formadoras

de Placa) de Enterovírus por volume de amostra concentrada.

6.1.2 O cálculo do número de vírus em Unidades Formadoras de Placa é obtido contando-se o número de placas de lise, que foram formadas na camada celular inoculada com meio gelificado, e relacionando-se este número com o volume inoculado e com o volume total de água concentrada (ver Norma CETESB L5.503). Exemplo:

- a) volume total de amostra concentrada: 40,0 mL;
- b) volume do concentrado final da amostra: 15,0 mL;
- c) volume de amostra inoculada: 10,0 mL
- d) número total de UFP formadas nas garrafas inoculadas: 30;
- e) se o número total de UFP é 30 e o volume inoculado foi 10,0 mL o número de UFP em 15,0 mL do concentrado final da amostra será:

$$\frac{30 \text{ UFP} \times 15,0 \text{ mL}}{10,0 \text{ mL}} = 45 \text{ UFP};$$

- f) se 40 litros de amostra foram concentrados até 15,0 mL o número de UFP por 40 litros será o mesmo encontrado em 15,0 mL do concentrado final; e
- g) expressão do resultado final:

45 Unidades Formadoras de Placa de Enterovírus/ 40 litros

6.1.3 Os resultados das amostras negativas para a presença de vírus, são expressos como ausência de Enterovírus por volume de amostra concentrada.

6.2 Amostras de água tratada

6.2.1 Os resultados das amostras nas quais foram detectados vírus, são lançados como presença de Enterovírus por volume de amostra concentrada.

6.2.2 Os resultados das amostras negativas para a presença de vírus, são expressas como ausência de Enterovirus por volume de amostra concentrada.

ANEXO A - PROCEDIMENTOS COMPLEMENTARESA-1 Ensaio de controleA-1.1 Teste de esterilidade

Após terem sido preparados, e antes de serem usados, quaisquer soluções ou meios de cultura são rotineiramente testados, quanto à presença de fungos e/ou bactérias. Este teste consiste na inoculação de 1,0 mL do volume de cada frasco da solução em teste em 2 tubos de caldo de soja e triptona (item 4.4.1) os quais após sementeira são incubados a 35°C durante no mínimo 48 horas (deve-se efetuar leituras diárias até completar 14 dias). Constitui evidência da presença de microrganismos qualquer turvação do caldo de soja e triptona. Essa contaminação pode ser decorrente de falhas no processo de esterilização ou contaminação após a esterilização. Além disso, os frascos contendo as soluções ou meios de cultura permanecem por 14 dias à temperatura ambiente ao abrigo da luz, como teste adicional de esterilidade antes de serem armazenadas em refrigerador (2 a 8°C), ou em congelador (-20°C).

A-1.2 Controle de qualidade dos meios de cultura (ver Norma CETESB L5.216)A-1.3 Controle de esterilidade de vidraria e materiais

É recomendável a realização de testes específicos para avaliar e comprovar a esterilidade de vidraria e materiais submetidos à esterilização em estufa a 170-180°C ou em autoclave a 121°C. Para a realização destes testes ver Norma CETESB L5.010 - Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas da água.

A-1.4 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos Bacillus stearothermophilus em meio de cultura, colocando-as entre os frascos ou os materiais a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria, a 55°C durante 24-48 horas.

Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

A-1.5 Controle da qualidade da água destilada

A água destilada, a ser empregada em laboratórios de virologia, deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento de micror

ganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, a través da realização de testes específicos (ver norma CETESB L5.215 Prova de adequabilidade da água destilada para fins microbiológicos.

A-1.6 Controle da adequabilidade biológica da água bidestilada

Devem ser efetuados testes de adequabilidade biológica da água bi destilada para garantir a produção de uma água de alta qualidade, li vre de substâncias tóxicas ou nutrientes que possam interferir nos ensaios virológicos (ver Norma CETESB L5.215).

A-2 Armazenamento da água bidestilada

A água bidestilada deve ser armazenada em frascos limpos de vidro neutro, de preferência ao abrigo da luz e protegidos de pó ou vapo res que possam ser produzidos no laboratório. O armazenamento pro longado da água bidestilada deve ser evitado.

A-3 Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular (ver Norma CETESB M1.002)

A-4 Local de trabalho

A-4.1 As capelas de segurança biológica devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido e livres de poeiras.

A-4.2 Se a câmara estiver instalada em local com ar condicionado, a entrada do ar não deve ser dirigida diretamente sobre o campo de trabalho, a não se que o condicionador tenha um filtro de ar espe cial.

A-4.3 A limpeza da sala é feita após expediente sem varreções exa geradas e, de preferência, empregando solução de formalina ou de ou tro desinfetante. Chão, mesas e balcões são limpos diariamente. Nos fins de semana realiza-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive vi dros e paredes. Esporadicamente, após a limpeza o ambiente é impreg nado com uma solução alcoolizada de formol a 8% que é colocado em placas de Petri, para evaporar.

A-5 Precauções

Dentre as pessoas que trabalham no laboratório, aquelas que têm me nor tempo de treinamento e as que estão mais diretamente associadas à manobras com material infectado são as que apresentam maiores pos sibilidades de serem infectadas acidentalmente.

A inalação de aerossóis, a aspiração de soluções contaminadas através de pipetas, acidente de centrifugações, etc. provocam, comprovadamente, grande número de infecções acidentais e devem ser prevenidas pelo uso de máscaras descartáveis de papel, pipetadores e pela obediência às instruções específicas de trabalho e de uso do equipamento. (ver Norma CETESB L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia).

A-5.1 Ácidos

Ao preparar soluções com ácidos nunca adicionar a água sobre o ácido (pois isto poderá provocar sérios riscos ao operador), mas sim ácido à água.

A-5.2 Material de segurança

A-5.2.1 Aventais de plástico

Devem ser de plástico resistente e de comprimento adequado para a proteção do técnico durante os processos de lavagem.

A-5.2.2 Aventais de pano

Para uso obrigatório por todos os técnicos na execução de quaisquer atividades laboratoriais. Antes do encaminhamento para lavagem, os aventais devem ser esterilizados em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

A-5.2.3 Luvas de amianto

A-5.2.4 Protetor facial

De utilização obrigatória (juntamente com máscara, com filtro adequado e luvas) no preparo de solução de ácidos a serem empregados na lavagem de materiais.

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- B-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Detection of enteric viruses. In: Standard Methods for the examination of water and wastewater. 16^{ed}, Washington, APWA, AWWA, WPCF, 1985, p. 946-974.
- B-2 BERG, G.; BODILY, H.L.; LENNETTE, E.H.; MELNICK, J.L.; METCALF, T.G. Viruses in water. Washington, American Public Health Association, 1976, 256 p.
- B-3 CETESB, Norma M1.002 - Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular. São Paulo, CETESB, 1985.
- B-4 _____, Norma L5.501 - Preparo de culturas celulares para virologia. São Paulo, CETESB, 1979.
- B-5 _____, Norma L5.503 - Enterovirus em água - Concentração de amostras a partir de grandes volumes de água. São Paulo, CETESB, 1986.
- B-6 _____, Norma L5.504 - Identificação de Enterovirus. São Paulo, CETESB, 1986.
- B-7 _____, Norma L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia. São Paulo, CETESB, 1986.
- B-8 _____, Norma L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, CETESB, 1985.
- B-9 _____. Norma L5.505 - Método de concentração de amostras de esgoto por adsorção a hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) para o isolamento de Enterovirus. São Paulo, CETESB, 1978.
- B-10 _____, Norma L5.506 - Método de concentração de amostras de resíduos sólidos para o isolamento de Enterovirus. São Paulo, CETESB, 1978.
- B-11 COONEY, M. K. Relative efficiency of cell culture for detection of viruses. Hlth.Lab.Sci., 10: 294-302, 1973.

- B-12 DAHLING, D.K. & WRIGHT, B.A. Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environmental Appl.Environ.Microbiol., 51: 790-812, 1986.
- B-13 DULBECCO, R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. Proc.Nat.Acad.Sci, 38: 747-752, 1952.
- B-14 GABRIELSON, M.O. & HSIUNG, G.D. Sensitivity of agar overlay method for the recognition of enteroviruses, Appl.Microbiol., 13: 967-972, 1965.
- B-15 HEJKAL, T.W.; GERBA, C.P.; RAO, V.C. Reduction of citotoxicity in virus concentrates from environmental samples. Appl. Environ.Microbiol., 43: 731-733, 1982 a.
- B-16 HSIUNG, G.D. & MELNICK, J.L. Morphologic characteristics of plaques produced on monkey kidney monolayer culture by enteric viruses (poliomyelitis, Coxsackie and ECHO groups) . J.Immunol., 78: 128-136, 1957.
- B-17 IAWPRC STUDY GROUP ON WATER VIROLOGY. The health significance of viruses in water. Water Res., 17: 121-132, 1983.
- B-18 ILSE, W.; MEULEN, V. ter. R.D. Cells in the laboratory diagnosis of Enterovirus. Med.Microbiol.Immunol., 163: 233-240, 1977.
- B-19 LENNETTE, E.H.; SCHMIDT, N.J. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5th Edition, APHA, 1979.
- B-20 MARTINS, M.T.; SOARES, L.A.; MOLINA, A.G.; RIZZO, E. Sensibilidade de diferentes linhagens celulares na detecção de enterovirus humanos presentes em águas. Rev.Microbiol., 13: 166-172, 1982.

B-21 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human viruses in water, wastewater and soils. W.H.O. Tech Rep.Ser. (639): 1-50, 1979.
