



NORMA TÉCNICA


L5.505

Dez/2001
27 PÁGINAS

Enterovirus - método de concentração de amostras de águas de esgoto : 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)

 <p>CETESB</p>	<p>ENTEROVÍRUS – MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUAS DE ESGOTO (Procedimento)</p>	<p>L5.505 dez/2001</p>
--	---	-----------------------------------

SUMÁRIO

	pag.
Introdução.....	01
1. Objetivo.....	02
2. Documentos complementares.....	02
3. Definições.....	02
4. Aparelhagem	03
5. Execução do Ensaio.....	11
6. Referências Bibliográficas.....	19
Anexo A - Procedimentos Complementares	21
Anexo B – Esquema de procedimento utilizando-se sistema de filtração	24
Anexo C – Esquema de procedimento utilizando-se funil de Büchner	25
Anexo D - Esquema de procedimento utilizando-se a técnica de Moore.....	26

Introdução

Entre os vírus presentes na água de esgoto, os mais comumente isolados são os Poliovírus, os vírus Cocksackie A e B e os vírus ECHO, que fazem parte do grupo dos Enterovírus.

O fato das águas de esgoto carregarem freqüentemente esses vírus de alto grau de patogenicidade para o ser humano, tornou as mesmas objeto de vários estudos nas últimas décadas. Esses estudos visam elucidar a epidemiologia dos Enterovírus, seja na detecção de fontes de infecção, na obtenção de informações sobre a sobrevivência desses vírus e sua resistência aos processos de tratamento de águas de esgoto, na avaliação da eficácia do tratamento, ou na avaliação de riscos à saúde pública devido às descargas de despejos contaminados com vírus nos corpos d'água e oceanos.

A densidade de vírus nas águas de esgotos pode variar muito, devido a diversos fatores, tais como: a concentração de vírus que está sendo excretada pela população, o volume e tipo de despejos domésticos e industriais, o fator de diluição das águas de esgoto, como também as variações sazonais.

Esses vírus podem sobreviver no meio ambiente por períodos de tempo variáveis, dependendo das condições de temperatura, umidade, presença de matéria orgânica, pH e vários outros fatores ambientais.

Nos últimos anos os métodos de concentração e ensaios para detecção de vírus vêm sendo modificados e aperfeiçoados, porém, até o presente momento não foi estabelecido um método padrão internacional para a detecção de vírus em amostras de águas de esgoto.

A detecção de vírus na água geralmente consiste em três etapas diferentes: coleta de uma amostra representativa, concentração dos vírus na amostra, isolamento e identificação dos vírus concentrados.

A escolha de um método adequado de concentração de amostras de água de esgoto para o isolamento de Enterovírus, vai depender não só do conteúdo viral, como também das características da amostra, uma vez que a grande quantidade de matéria orgânica presente nos esgotos pode interferir no processo. A simplicidade, eficiência e custo são fatores que também devem ser levados em consideração nessa escolha.

1. Objetivo

Esta Norma prescreve os procedimentos que permitem concentrar, em laboratório, amostras de água e esgoto pelas técnicas de adsorção a hidróxido de alumínio (Anexos B e C) e pela técnica de Moore (Anexo D), para isolamento de Enterovírus.

2. Documentos Complementares

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

M1.002 – Lavagem, preparo e esterilização de material para cultura celular.

L5.501 – Preparo de culturas celulares para ensaios virológicos

L5.502 – Enterovírus em água – Isolamento e quantificação

L5.504 – Identificação de enterovírus

3. Definições

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.6.

3.1 Adsorção

Associação de partículas virais à superfície de materiais sólidos por meio de processos físico e químicos.

3.2 Concentração

Processo pelo qual se reduz a porção líquida de uma amostra, mantendo todo seu conteúdo sólido.

3.3 Concentração por filtração

Concentração efetuada com o uso de membrana filtrante.

3.4 Floculação orgânica

Processo de concentração em que se utiliza uma solução protéica (extrato de carne), o ajuste do pH e a centrifugação para a obtenção de pequenos volumes de amostra, adequados para a análise.

3.5 p.a.

Para análise

3.6 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

4. Aparelhagem

4.1 Equipamentos

4.1.1 Agitador tipo “Vortex”

4.1.2 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103.393 p.a (1,05 kgf/cm² ou 15 lb/pol²), produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Em seu funcionamento, deve-se observar a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara e sua operação deve durar, no máximo, uma hora, sendo recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

4.1.3 Balanças

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1g ao serem pesados 150g¹

4.1.4 Banho-maria

Equipado com termostato para temperaturas de 35 a 56^o 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 por meio da passagem do mesmo por filtros HEPA, cuja eficiência é de 99,99% para partículas iguais ou maiores que 0,3 µ m. 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 aos operadores.

4.1.6 Centrífuga refrigerada

Com velocidade até 6000 rpm e que tenham rotores com caçapas para volumes de 20,0 mL e 1000,0 mL.

4.1.7 Freezer

Com regulagem para manter a temperatura na faixa de -20 a -70^oC, 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 aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação celular, cuja condutividade deve ser inferior a 2µs/cm a 25°C e o pH estar na faixa de 5,5 a 7,5.

¹ As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; devem ser mantidas limpas e manuseadas por pessoal que conheça seu funcionamento sua aferição deve ser feita periodicamente.

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 de 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^oC. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 4 a 6 horas, a uma temperatura de 170 a 180^oC.

4.1.10 Funil de Büchner

Com 142 mm de diâmetro.

4.1.11 Incubadora bacteriológica

Deve manter a temperatura na faixa de 37 ± 0,5^oC e a umidade relativa entre 75 e 85% e ser colocada em um local onde a temperatura permaneça na faixa de 16 a 27^oC. Registrar a temperatura com um termômetro graduado em incrementos de 0,5^oC, pelo menos 2 vezes ao dia.²

4.1.12 Placa agitadora magnética

Com velocidade regulável.

4.1.13 Pipetador automático

Ou outro dispositivo de segurança para sucção de conteúdos líquidos.

4.1.14 Porta-filtro

De aço inoxidável, de 293 mm de diâmetro.

4.1.15 Potenciômetro

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH e sua calibração deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com, no mínimo, duas soluções-tampão (pH=4,0; pH=6,86 ou pH=9,18).

4.1.16 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura na faixa de 2 a 8^oC, com capacidade para conter os meios de cultura e as soluções a serem mantidas sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente. A temperatura deve ser controlada pelo menos 1 vez por dia.

4.1.17 Sistema de filtração tipo Swinex.

De aço inoxidável com 25 mm de diâmetro.

4.1.18 Vasilhames de pressão

De aço inoxidável, com capacidade de 5 litros.

² A verificação da temperatura na incubadora deve ser feita periodicamente (mínimo de 2 vezes ao dia) por meio de termômetro (com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral) colocados em pontos representativos da mesma, sendo aconselhável, também, a calibração de um termômetro de máximo e mínima em sua parte central. A estratificação da temperatura na incubadora pode ser evitada com a colocação, em seu interior, de um dispositivo para circulação do ar.

4.2 Materiais

4.2.1 Alcoômetro

4.2.2 Algodão hidrófilo

4.2.3 Atadura de crepe

De algodão, com 20 cm de largura por 4,5 cm de comprimento.

4.2.4 Bandejas de aço inoxidável

4.2.5 Barra magnética

Recoberta com teflon, tamanho 6 cm x 1 cm.

4.2.6 Fio de nylon

Com diâmetro de 1,20 mm.

4.2.7 Fita adesiva

Para controle do material submetido à esterilização em estufa ou autoclave

4.2.8 Fita crepe

4.2.9 Flaconete

Do mesmo tipo utilizado para acondicionar penicilina, com capacidade de 50 mL com tampa de borracha.

4.2.10 Filtro Zeta Plus

Composto de celulose e partículas inorgânicas, série 50S, com 25 mm de diâmetro.

4.2.11 Gaze hidrófila de 91 m x 91 cm x 8 dobras

4.2.12 Kitasato

Com capacidade suficiente para conter o volume da amostra a ser filtrada.

4.2.13 Luvas descartáveis.

4.2.14 .Máscara descartável

4.2.15 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).

4.2.16 Mangueiras de borracha

Com paredes espessas e resistentes à pressão.

4.2.17 Mangueiras de plástico rígido de ¼”.

4.2.18 Papel alumínio

4.2.19 Papel Kraft

4.2.20 Pinças

Dente de rato, de aço inoxidável e com 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, erro de calibração inferior a 2,5% e com bocal para tampão de algodão.

4.2.22 Pissete para álcool a 70%

4.2.23 Porta-pipetas de aço inoxidável.

4.2.24 Pré-filtro de fibra de vidro tipo AP 20.

4.2.25 Provetas graduadas

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

4.2.26 Seringas hipodérmicas

4.2.27 Tesoura com ponta fina

4.2.28 Tubos de centrífuga

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

4.2.29 Tubos de ensaio

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

4.3 Reagentes

4.3.1 Procedimentos gerais

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

4.3.2 Reagentes necessários

- Ácido clorídrico (HCl) p.a.:
- Anfotericina B (fungizona), 250µg/mL:
- Água destilada:
- Álcool etílico comercial:
- Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) p.a.;
- Carbonato de sódio (Na₂CO₃) p.a.;

- Cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a.;
- Cloreto de sódio (NaCl) p.a.;
- Dextrose;
- Extrato de carne;
- Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a.;
- Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{H}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.;
- Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- Penicilina G-potássica cristalina;
- Peptona de soja;
- Soro fetal bovino;
- Sulfato de gentamicina;
- Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) p.a.;
- Triptona;
- Tween 80;

4.4 Meios de cultura

4.4.1 Caldo de soja e triptona (“Tryptic Soy Broth”)

Fórmula:

Triptona	17,0g
Peptona de soja.....	3,0g
Dextrose	2,5g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato de potássio dibásico.....	2,5g
Água destilada	1000,0mL
pH final após esterilização: $7,3 \pm 0,2$	

Preparo:

Pesar 30,0g do meio desidratado “Tryptic Soy Broth” e acrescentar 1000,0mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH para 7,3 com solução de hidróxido de sódio 1N (item 4.5.5). Distribuir volumes de 12,0mL em tubos de 15mm x 150mm, com tampa de rosca. Esterilizar por autoclavação (item 4.6.1).

4.5 Soluções

4.5.1 Álcool a 70%

Fórmula:

Álcool etílico comercial	700,0mL
Água destilada	$\pm 300,0\text{mL}$

Preparo:

Medir 700,0mL de álcool etílico comercial em recipiente adequado e adicionar uma quantidade de água

(aproximadamente 200,0 a 300,0mL) suficiente para obter uma solução com teor de 70% de álcool. Essa verificação é feita por meio do uso do alcoômetro.

4.5.2 Solução de ácido clorídrico (HCl) – 1N

Fórmula:

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

Preparo:

Adicionar lentamente 83,5mL de ácido clorídrico em 916,5mL de água destilada.

Observação:

Nunca adicionar a água sobre o ácido, mas sim o ácido à água.

4.5.3 Solução de ácido clorídrico (HCl) – 6N

Fórmula:

Ácido clorídrico.....	501,0mL
Água destilada	499,0mL

Preparo:

Adicionar lentamente 501,0mL de ácido clorídrico em 499,0mL de água destilada.

Observação:

Nunca adicionar a água sobre o ácido, mas sim o ácido à água.

4.5.4 Solução de extrato de carne a 3%

Fórmula:

Extrato de carne.....	9,0g
Água destilada q.s.p.....	300,0g

pH final: 7,0

Preparo:

Pesar 9,0g de extrato de carne em um Erlenmeyer de 500,0mL e acrescentar 300,0mL de água fria, agitando até completa dissolução. Acertar o pH e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos (item 4.6.1). estocar em geladeira 2 a 8°C.

4.5.5 Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1N

Fórmula:

Hidróxido de sódio	40,0g
Água destilada estéril q.s.p.....	1000,0mL

Preparo:

Pesar 40,0g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1000,0mL com água destilada estéril.

4.5.6 Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 6N

Fórmula:

Hidróxido de sódio 240,0g
 Água destilada estéril q.s.p..... 1000,0mL

Preparo:

Pesar 240,0g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1000,0mL com água destilada.

4.5.7 Suspensão – estoque de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃)

Na preparação de suspensão de hidróxido de alumínio devem ser utilizadas três soluções preparadas da seguintes forma:

4.5.7.1 Solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 4M

Fórmula:

Carbonato de sódio 42,39g
 Água destilada q.s.p..... 100,0mL

Preparo:

Pesar 422,39g de carbonato de sódio e adicionar 50,0mL de água destilada. Agitar até completa dissolução. Completar o volume final para 100,0mL. Esterilizar a 121°C por 15 minutos (item 4.6.1).

4.5.7.2 Solução de cloreto de alumínio (AlCl₃.6H₂O) 0,05M

Fórmula:

Cloreto de alumínio 12,07g
 Água destilada q.s.p..... 1000,0mL

Preparo:

Pesar 12,07g de cloreto de alumínio e adicionar 500,0mL de água destilada. Agitar até completar dissolução. Completar o volume final para 1000,0mL. Esterilizar a 121°C por 15 minutos (item 4.6.1).

4.5.7.3 Solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,15M

Fórmula:

Cloreto de sódio 35,2g
 Água destilada q.s.p..... 4000,0mL

Preparo:

Dissolver 35,2g de cloreto de sódio em 3000,0mL de água destilada e agitar até completa dissolução. Completar o volume final para 4000,0mL. Esterilizar em autoclave a 121°C 15 minutos (item 4.6.1).

4.5.7.4 Preparo final da suspensão de hidróxido de alumínio**Fórmula:**

Solução de carbonato de sódio 4M.....	30,0mL
Solução de cloreto de alumínio 0,05M.....	1000,0mL
Solução de cloreto de sódio 0,15M	4000,0mL

Preparo:

Adicionar lentamente e sob agitação, 30,0mL da solução de carbonato de sódio 4M em 1000,0mL da solução de cloreto de alumínio 0,05M. Ajustar o pH para 7,2. Manter a mistura sob agitação constante durante 15 minutos, em temperatura ambiente.

Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minuto. Desprezar o sobrenadante e suspender o sedimento com o mesmo volume de solução de cloreto de sódio 0,15M. Centrifugar novamente (2000 rpm por 15 minutos), suspender o sedimento com solução de cloreto de sódio 0,15M e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, em condições de assepsia, centrifugar a suspensão a 2000 rpm durante 15 minutos, descartar o sobrenadamento e suspender o sedimento em 1100,0mL de solução de cloreto de sódio 0,15M estéril. Armazenar na temperatura de 4°C.

No momento do uso, agitar bem a suspensão total e centrifugar volume necessário para o teste a 2500 rpm durante 15 minutos. Suspender o sedimento em solução de cloreto de sódio 0,15M, com volume igual ao do sobrenadante.

4.5.8 Solução – estoque de penicilina G – potássica cristalina**Fórmula:**

Dissolver o conteúdo de um frasco de penicilina G – potássica cristalina (10 milhões UI) em 100,0mL de solução balanceada de Hanks 1 x concentrada (Norma CETESB L5.501). Acertar o pH para 7,0-7,2 com bicarbonato de sódio a 7,5%. Distribuir a solução em volume de 50,0mL. Armazenar em congelador a -20°C.

4.5.9 Solução de sulfato de gentamicina**Fórmula:**

Sulfato de gentamicina (40mg de gentamicina base/mL)	1,0mL
Solução balanceada de Hanks 1 x concentrada	3,0mL

Preparo:

Diluir o conteúdo de uma ampola de sulfato de gentamicina em 3,0mL de solução balanceada de Hanks 1 x concentrada (Norma CETESB L5.501). Acertar o pH para 7,0-7,2 com bicarbonato de sódio a 7,5%. Armazenar em congelador a -20°C .

4.5.10 Solução de soro fetal bovino a 10%

Fórmula:

Soro fetal bovino inativado (em banho-maria a 56°C por 60 minutos).....	5,0mL
Água bidestilada estéril	45,0mL

Preparo:

Adicionar 5,0mL de soro fetal bovino inativado em 45,0mL de água bidestilada estéril. Agitar levemente para dissolução. Armazenar em geladeira.

4.5.11 Solução de tween 80 a 0,1%

Fórmula:

Tween 80	1,0mL
Água destilada	999,0mL

Preparo:

Diluir 1,0mL de Tween 80 em 999,0mL de água destilada. Agitar até completa dissolução.

Observação:

Esta solução deverá ser preparada no momento do uso.

4.5.12 Solução de fosfato de sódio dibásico 0,15M pH 9,0

Fórmula:

Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4,02g
Água destilada q.s.p.....	100mL

pH final: 9,0

Preparo:

Pesar 4,02g de fosfato de sódio dibásico e adicionar 50,0mL de água destilada. Agitar até dissolução total. Completar o volume final para 100,0mL. Ajustar o pH para 9,0 e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4.6 Esterilização das soluções e meios de cultura

4.6.1 Autoclavação

Esterilização de soluções ou de meios de cultura em autoclave deve ser feita 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.

4.7 Armazenamento de soluções

As soluções são armazenadas em refrigerador (2 a 8°C) ou em freezer (-20°C). São mantidas em frascos bem fechados, com rolhas de borracha ou tampa de 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 o material desses frascos é lentamente dissolvido, e íons de metais pesados são posteriormente encontrados nessas soluções.

5. EXECUÇÃO DO ENSAIO

A concentração dos vírus presentes na amostra pode ser realizada por adsorção a hidróxido de alumínio, seguida de filtração com pressão positiva (item 5.3) ou sob vácuo em funil de Büchner (item 5.4). Alternativamente pode-se utilizar a técnica de Moore (mecha de gaze – item 5.5).

5.1 Amostra

5.1.1 Coleta

A coleta da amostra de água de esgoto deve ser realizada tomando-se precauções especiais como a utilização de máscaras e luvas descartáveis. Quando a coleta for realizada em estação de tratamento de esgoto ela deverá ser feita em um ponto logo após o gradeamento, antes do início de qualquer processo de tratamento.

5.1.2 Identificação

A amostra deve ser bem identificada e todas as informações sobre a mesma devem ser completas (nº da amostra, data, local, pH, temperatura e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente)..

5.1.3 Volume

Para concentração de enterovírus de água de esgoto, recomenda-se a utilização de 2,0 a 5,0 litros de amostra.

5.1.4 Transporte e conservação

Após a coleta, a amostra deverá ser processada o mais rapidamente possível. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (2°C a 8°C) e conservadas assim até o início da análise, sendo que o tempo limite entre amostragens e o início do exame não deve exceder 48 horas. Se o ensaio não puder ser realizado dentro desse prazo, a amostra deve ser mantida à temperatura de -70°C.

5.2 Princípio do método de contração por adsorção a hidróxido de alumínio.

Os enterovírus presentes em águas de esgoto podem ser isolados utilizando-se a técnica da adsorção a flocúlos de hidróxido de alumínio. Essa adsorção é possível devido a uma propriedade de superfície que lhes permite agregarem-se a materiais sólidos. Isso facilitará sua posterior adsorção aos pré-filtros de fibra de vidro empregados na filtração da amostra.

5.3 Procedimento utilizando-se adsorção com hidróxido de alumínio seguido de filtração em pressão positiva.

5.3.1 Bancada

Antes de iniciar o ensaio, desinfetar a bancada de trabalho usando um desinfetante que não deixe resíduos.

5.3.2 Material necessário

Dispor sobre a bancada de trabalho o material necessário à execução da análise conforme 5.3.2.1 a 5.3.2.8

5.3.2.1 Vasilhames de pressão, mangueiras apropriadas para filtração e bomba de pressão positiva.

5.3.2.2 Porta-filtro de 293 mm de diâmetro, previamente esterilizado.

5.3.2.3 Pré-filtro de fibra de vidro AP20 estéril, com 293 mm de diâmetro.

5.3.2.4 Placa agitadora e barra magnética.

5.3.2.5 Pinça de bordas lisas e tesoura com ponta fina, mergulhadas em álcool.

5.3.2.6 Béquer de 400 mL identificado com os dados da amostra.

5.3.2.7 Tubos de centrífuga.

5.3.2.8 Bico de Bunsen, para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem da pinça e da tesoura.

5.3.3 Preparação do porta-filtro

5.3.3.1 Retirar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça flambada e esfriada, colocar um pré-filtro de fibra de vidro tipo AP20 estéril, centralizando-o sobre a parte inferior do porta-filtro.

5.3.3.2 Acoplar a parte superior do porta-filtro, tendo cuidado para não danificar o pré-filtro.

5.3.3.3 Tratar o pré-filtro, passando através do sistema 700,0 mL da solução de Tween 80 a 0,1% (item 4.5.11) e 7,0 litros de água destilada, utilizando vasilhames de pressão (pressão positiva).

5.3.4 Processamento da amostra

5.3.4.1 Durante todo o processamento da amostra o operador deverá utilizar máscaras e luvas descartáveis e demais procedimentos de segurança pertinentes.

5.3.4.2 Todo o material que estiver sendo manuseado ou utilizado na análise deverá ser separado e devidamente descontaminado.

5.3.4.3 Ao chegar no laboratório a amostra de água de esgoto é homogeneizada cuidadosamente e clarificada mediante filtração através de gaze, para remoção de material particulado grosseiro. A gaze deve ser hidrófila, arranjada em três dobras e fixada no recipiente utilizado para o processo de clarificação.

5.3.4.4 Acondicionar a água de esgoto em um vasilhame de pressão e homogeneizar com o auxílio de placa agitadora e barra magnética.

5.3.4.5 Medir o pH inicial da amostra, com o auxílio de um potenciômetro, e ajustá-lo para pH 6,0, com solução com solução de ácido clorídrico 6N (item 4.5.3) ou hidróxido de sódio 6N (item 4.5.6).

5.3.4.6 Acrescentar um volume adequado da suspensão-estoque de hidróxido de alumínio (item 4.5.7) de modo a diluí-la a 1:100 na amostra.

5.3.4.7 Manter a amostra sob agitação lenta e constante, utilizando placa agitadora e barra magnética, durante duas horas à temperatura ambiente.

5.3.4.8 Após o período de homogeneização, fechar o vasilhame de pressão, conectar ao porta-filtro e a bomba de pressão positiva e proceder à filtração.

5.3.4.9 Desligar a bomba de pressão, retirar a parte superior do porta-filtro, remover o pré-filtro com o auxílio de uma pinça e uma tesoura previamente flambadas, dividí-lo em pequenos pedaços, colocando-os em um béquer devidamente identificado, que contenha aproximadamente 20,0 mL da solução de extrato de carne 3% pH 7,0 (item 4.5.4).

Observação:

Se necessário, adicionar solução de extrato de carne 3% pH 7,0 (item 4.5.4) em volume suficiente para cobrir todo o pré-filtro dentro do béquer.

5.3.4.10 Manter a mistura do pré-filtro mais a solução de extrato de carne em homogeneização vigorosa durante 15 minutos.

5.3.4.11 Transferir a mistura para um tubo de centrífuga estéril e centrifugar a 2500 rpm, durante 30 minutos, preferencialmente sob refrigeração.

5.3.4.12 Após a centrifugação, colher o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta estéril acoplada a um pipetador automático, e transferí-lo para um flaconete estéril, previamente identificado com os dados da amostra.

5.3.4.13 Submeter o concentrado final da amostra obtido aos testes de redução dos efeitos citotóxicos e ao teste de esterilidade (eliminação de bactérias e fungos), conforme descritos nos itens 5.6 e 5.7.

Observação:

Se não for possível realizar esses testes imediatamente, conservar o concentrado final a -70°C .

5.4 Procedimento utilizando-se adsorção com hidróxido de alumínio seguido de filtração sob vácuo em funil de Büchner.

5.4.1 Bancada

Antes de iniciar o exame, desinfetar a bancada de trabalho usando um desinfetante que não deixe resíduos.

5.4.2 Material necessário

Disponibilizar sobre a bancada de trabalho o material necessário à execução da análise, conforme 5.4.2.1 a 5.4.2.6.

5.4.2.1 Fonte de vácuo, mangueiras apropriadas para filtração, e Kitasato.

5.4.2.2 Funil de Büchner de 142 mm de diâmetro, previamente esterilizado.

5.4.2.3 Pré-filtro de fibra de vidro tipo AP20 estéril, com 142 mm de diâmetro.

5.4.2.4 Béquer identificado com os dados da amostra.

5.4.2.5 Tubos de centrífuga.

5.4.2.6 Bico de Bunsen, para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem da pinça e da tesoura.

5.4.3 Preparação do Funil de Büchner

5.4.3.1 Acoplar o funil de Büchner ao Kitasato e ligá-lo à fonte de vácuo.

5.4.3.2 Com uma pinça flambada e esfriada, colocar o pré-filtro de fibra de vidro tipo AP20 estéril sobre a superfície do funil de Büchner.

5.4.3.3 Tratar o pré-filtro, passando através do sistema 700,0 mL da solução de tween 80 a 0,1% (item 4.5.11) e 7,0 litros de água destilada, utilizando para isso fonte de vácuo.

5.4.4 Processamento da amostra

5.4.4.1 Durante todo o processamento da amostra o operador deverá utilizar máscaras e luvas descartáveis e demais procedimentos de segurança pertinentes.

5.4.4.2 Todo o material que estiver sendo manuseado ou utilizado na análise deverá ser separado e devidamente descontaminado.

5.4.4.3 Ao chegar no laboratório a amostra de água de esgoto é homogeneizada cuidadosamente e clarificada mediante filtração através de gaze para remoção de material particulado grosseiro. A gaze deve ser hidrófila, arranjada em três dobras e fixada no recipiente utilizado para o processo de clarificação.

5.4.4.4 Acondicionar a água do esgoto em um recipiente com capacidade suficiente para conter o volume da amostra a ser filtrado mais a solução de hidróxido de alumínio e homogeneizar com o auxílio da placa agitadora magnética.

5.4.4.5 Medir o pH inicial da amostra com o auxílio de um potenciômetro e ajustá-lo para 6,0, com a solução de ácido clorídrico 6N (item 4.5.3) ou com a solução de hidróxido de sódio 6N (item 4.5.6).

5.4.4.7 Manter a amostra sob agitação lenta e constante durante duas horas à temperatura ambiente, utilizando a placa agitadora e a barra magnética.

5.4.4.8 Após o período de homogeneização verter cuidadosamente a amostra no funil de Büchner, previamente preparado, conforme descrito no item 5.4.3.3.

5.4.4.9 Ligar a fonte de vácuo e proceder à filtração

5.4.4.10 Após toda amostra ter sido filtrada, desligar a fonte de vácuo e, com auxílio de uma pinça e de uma tesoura, previamente flambadas, remover o pré-filtro, dividi-lo em pequenos pedaços colocando-os em um béquer devidamente identificado e que contenha aproximadamente 20,0 mL da solução de extrato 3% pH 7,0 (item 4.5.4).

Observação:

Se necessário, adicionar solução de extrato de carne 3% pH 7,0 (item 4.5.4) em volume suficiente para cobrir todo o pré-filtro contido no béquer.

5.5 Procedimento utilizando-se a técnica de Moore (mecha de gaze)

5.5.1 Bancada

Antes de iniciar o exame, a bancada deve ser desinfetada com um desinfetante que não deixe resíduos.

5.5.2 Material necessário

Disponibilizar sobre a bancada de trabalho o material necessário à execução da análise, conforme 5.5.2.1 a 5.5.2.5.

5.5.2.1 Béquer de 500 mL identificado com os dados da amostra..

5.5.2.2 Placa agitadora e barra magnética.

5.5.2.3 Tubos de centrífuga.

5.5.2.4 Bico de Bunsen, para manter o ambiente asséptico.

5.5.2.5 Gaze hidrófila, arranjada em três dobras.

5.5.3 Processamento da amostra

5.5.3.1 Durante todo o processamento da amostra o operador deverá utilizar máscaras e luvas descartáveis e demais procedimentos de segurança pertinentes.

5.5.3.2 Todo o material que estiver sendo manuseado ou utilizado na análise deverá ser separado e devidamente descontaminado.

5.5.3.3 Ao chegar no laboratório, a amostra de mecha de gaze deverá ser retirada do saco plástico e colocada em um béquer de 500 mL previamente identificado com os dados da amostra.

5.5.3.4 Adicionar à amostra aproximadamente 100 mL de uma solução de extrato de carne a 3% (item 4.5.4).

Observação:

A quantidade de extrato de carne a ser adicionado à mecha de gaze deverá ser suficiente para mantê-la imersa na solução.

5.5.3.5 Deixar em contato (mecha de gaze + solução de extrato de carne) durante aproximadamente 30 minutos.

5.5.3.6 Após esse período, espremer bem a mecha de gaze, de tal forma que todo o material aderido a essa mecha seja retirado.

5.5.3.7 Filtrar o material retirado da mecha de gaze em um béquer de 500 mL que deverá ter preso em parte superior uma gaze dupla.

Observação:

A gaze dupla fixada na parte superior do béquer tem a finalidade de retirar resíduos grosseiros.

5.5.3.8 Com o auxílio de uma proveta, medir o volume obtido da amostra de esgoto.

5.5.3.9 Medir o pH inicial da amostra de esgoto com auxílio de um potenciômetro.

5.5.3.10 Ajustar o pH para 3,5 com solução de ácido clorídico 6 N, gota a gota e com homogeneização constante.

5.5.3.11 Deixar em homogeneização lenta por 30 minutos.

5.5.3.12 Verificar periodicamente o pH da amostra para assegurar-se de que o mesmo está na faixa adequada (pH 3,5).

5.5.3.13 Após o período de homogeneização, centrifugar a amostra a 4000 rpm durante 15 minutos, em centrífuga refrigerada.

5.5.3.14 Desprezar o sobrenadante e eluir o sedimento com 15mL de solução de fosfato de sódio a 0,15 M, pH 9,0 (item 4.5.12) e agitar por 15 minutos.

5.5.2.15 Ajustar o pH para 7,0-7,2 e proceder à redução do efeito citotóxico (item 5.6) e descontaminação da amostra (item 5.7).

5.6 Redução dos efeitos citotóxicos dos concentrados finais das amostras de água de esgoto.

Para redução dos componentes tóxicos, os concentrados finais das amostras devem ser processados através de filtros Zeta Plus 50S. Esse procedimento deve ser realizado em câmara de fluxo laminar vertical, observando-se todas as medidas de assepsia. São necessárias as etapas de 5.6.1 a 5.6.6.

5.6.1 Acoplar o porta-filtro que contém o filtro Zeta Plus 50S em um recipiente estéril e conectar na entrada do porta-filtro uma seringa hipodérmica estéril.

5.6.2 Tratar o filtro com 10,0 mL de solução de soro fetal bovino a 10% (item 4.5.10), que é passada através do respectivo filtro com auxílio de seringa hipodérmica e pressão manual.

5.6.3 Transferir o porta-filtro para um flaconete estéril previamente rotulado com os dados da amostra e proceder à filtração da mesma, utilizando seringa hipodérmica e pressão manual.

5.6.4 Após a filtração, lavar o filtro com 2,0 mL de meio de Eagle com 10% de soro fetal bovino inativado, pH 9,0 (Norma CETESB L5.501).

5.6.5 Adicionar o filtrado na amostra e anotar o volume final.

5.6.6 Submeter a amostra ao teste de esterilidade de acordo com o item 5.7.

5.7 Eliminação de bactérias e fungos dos concentrado finais das amostras de água e esgoto (Teste de Esterilidade)

Antes de ser inoculado em culturas de células, a amostra é submetida ao teste de esterilidade quanto à presença de bactérias e fungos contaminantes. Este teste é realizado em câmara de fluxo laminar vertical observando-se todas as medidas de assepsia. São necessárias as etapas de 5.7.1 a 5.7.5.

5.7.1 Em um flaconete estéril, previamente rotulado com os dados da amostra, adicionar 0,3 mL de penicilina (item 4.5.8), 0,3 mL de sulfato de gentamicina (item 4.5.9), 0,3 mL de fungizona líquida (250 µg/mL) e a amostra em teste. Homogeneizar vigorosamente.

5.7.2 Deixar em contato durante uma hora, à temperatura ambiente.

5.7.3 Após esse período, inocular 1,0 mL da amostra em teste em dois tubos de caldo de soja e triptona (item 4.4.1).

5.7.4 Incubar os tubos inoculados na estufa a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e realizar leitura diárias durante 14 dias.

5.7.5 Durante o período de leitura, manter a amostra a -70°C .

5.7.5.1 A amostra estará livre de contaminantes se o caldo de soja e triptona não apresentar turvação ou qualquer outra evidência de crescimento de microrganismos durante os 14 dias de incubação.

Observação:

Caso as amostras apresentem contaminação, submetê-las a centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos e tratar o sobrenadante conforme descrito nos itens 5.7.1 a 5.7.5.

5.8 Isolamento, quantificação e identificação dos vírus presentes nas amostras de água de esgoto concentradas

Após terem sido tratados, para a redução dos componentes citotóxicos e testados quanto à esterilidade, os concentrados finais das amostras devem ser inoculados em culturas de células de acordo com os procedimentos descritos nas Normas CETESB L5.502 e L5.504 para isolamento, quantificação e identificação dos Enterovírus.

6. Referências Bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Detection of enteric virusses. In: ___ Standard methods for the examination of water wastewater** 20° ed. Washington. APHA, AWWA, WEF.1998.

BERG. G.; BODILY, H.L.; LENNETE. E.H.; MELNICK, J.L.& METCALF, T.G. **Viruses in Water.** Washington, American Public Health Association, 1976, 256 p.

BLOMM, H.H.; MACH. W.N.; KRUEGER, B.J.; MALLMANN. W.L. **Identification of enteroviruses in sewage.** J. Infect. Dis.: 105: 61-68. 1959.

ENGLAND, B. Concentration of virus by adsorption to and elution from $Al(OH)_3$ In: **Manual on analyses for water pollution control.** E, Lund. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe, 1977, p. 32-40.

GODARD. M.R. & SELLWOOD, J. Isolation of enteric viruses from sewage. In: **Viruses and disinfection of water and wastewater.** Eds. M. Buttler, A.R . Medlen, R. Morris. Guildford. University of Surrey, 1982. p. 1-6.

HEJKAL, T.W.; GERBA, C.P.: RAO, V.C. **Reduccion of citotoxicity in virus concentrates from environmental samples.** Appl. Environ. Microbiol.. 43: 731-733, 1982.

KELLY. S. & SANDERSON. W.W. **Density of enteroviruses in sewage** J. Water Pollut. Control Fed., 32: 1269 – 1273, 1960.

LUND. E. & HEDSTRÖM. C.E. **A study on sampling and isolation methods for the detection of virus in sewage.** Water Res., 3: 823-832, 1969.

MALHERBE, H. **The recovery of viruses from sewage.** J. Inst. Sew. Purif., 30: 210-214, 1964.

MARQUES. E. **Levantamento do número e dos tipos de enterovírus em diferentes águas de esgoto da Capital de São Paulo.** São Paulo, 1987. 101 p. (Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

PAYMENT, P.; AYACHE. R.; TRUDEL, M. **A survey of enteric viruses in domestic sewage.** Can. J. Microbiol., 29: 111-119, 1983.

TYLER. J. **Occurrence in water of viruses of public health significance.** J. Appl. Bacteriol, 14 (suppl): 37S – 46 S, 1985.

WALLIS. C. & MELNICK, J.L. **Concentration of viruses on aluminum and calcium salts.** Am. J. Epidemiol., 85: 459-468, 1967.

WELLINGS, F.M.; LEWIS, AL.; MONTAIN, C.W. **Demonstration of solids-associated virus in wastewater and sludge.** Appl. Environ. Microbiol., 31: 354-358. 1976.

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

/ ANEXO A

ANEXO A – Procedimentos complementares

A-1 Ensaio de controle

A-1.1 Teste de esterilidade

Após terem sido preparados e antes de serem usados, quaisquer soluções ou meios de culturas são rotineiramente testados quanto à presença de fungos e/ou bactérias. Esse teste consiste na inoculação de 1,0 mL do volume de cada frasco da solução em teste em dois tubos de caldo de soja e triptona (item 4.4.1), os quais, após sementeira, são incubados a 37°C durante, no mínimo, 48 horas (deve-se efetuar leituras diárias até completar 14 dias). Constitui evidência da presença de microorganismos qualquer turvação do caldo de soja e triptona.

Esta contaminação pode ser decorrente de falhas no processo de esterilização ou contaminação após a esterilização.

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°C–180°C ou em autoclave a 121°C. Para a realização destes ver a Norma CETESB L5.010 – Avaliação de laboratórios de análise bacteriológica da água.

A-1.4 Controle da eficiência da autoclave

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

Se houver mudança de 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 a sobrevivência e o crescimento das

culturas celulares e os ensaios virológicos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, por meio da realização de testes específicos.

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 vapores que possam ser produzidos no laboratório. O armazenamento prolongado 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 ser que o condicionador tenha um filtro de ar especial.

A-4.3 A limpeza da sala é feita após expediente, devendo-se utilizar para isso panos de limpeza com desinfetante. Evitar o uso de vassoura.. Chão, mesas e balcões são limpos diariamente.

Nos fins de semana realiza-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive de vidros e paredes. Esporadicamente, após a limpeza, o ambiente é impregnado com uma solução alcoólica de formol a 8%, que é colocada em placas de Petri, para evaporar.

A-5 Precauções

Dentre as pessoas que trabalham no laboratório, aquelas que têm menor tempo de treinamento e as que estão mais diretamente associadas a manuseio de material infectado são as que apresentam maiores possibilidades de infecção acidental.

A inalação de aerossóis, a aspiração de soluções contaminadas por meio de pipetas, acidentes durante centrifugação, 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 de equipamentos de proteção.

A-5.1 Ácidos

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

A-5.2 Materiais 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

De uso obrigatório por todos os técnicos na execução de quaisquer atividades laboratoriais.

A-5.2.3 Luvas descartáveis de plástico (ou cirúrgicas).

A-5.2.4 Luvas revestidas de amianto.

A-5.2.5 Máscaras descartáveis

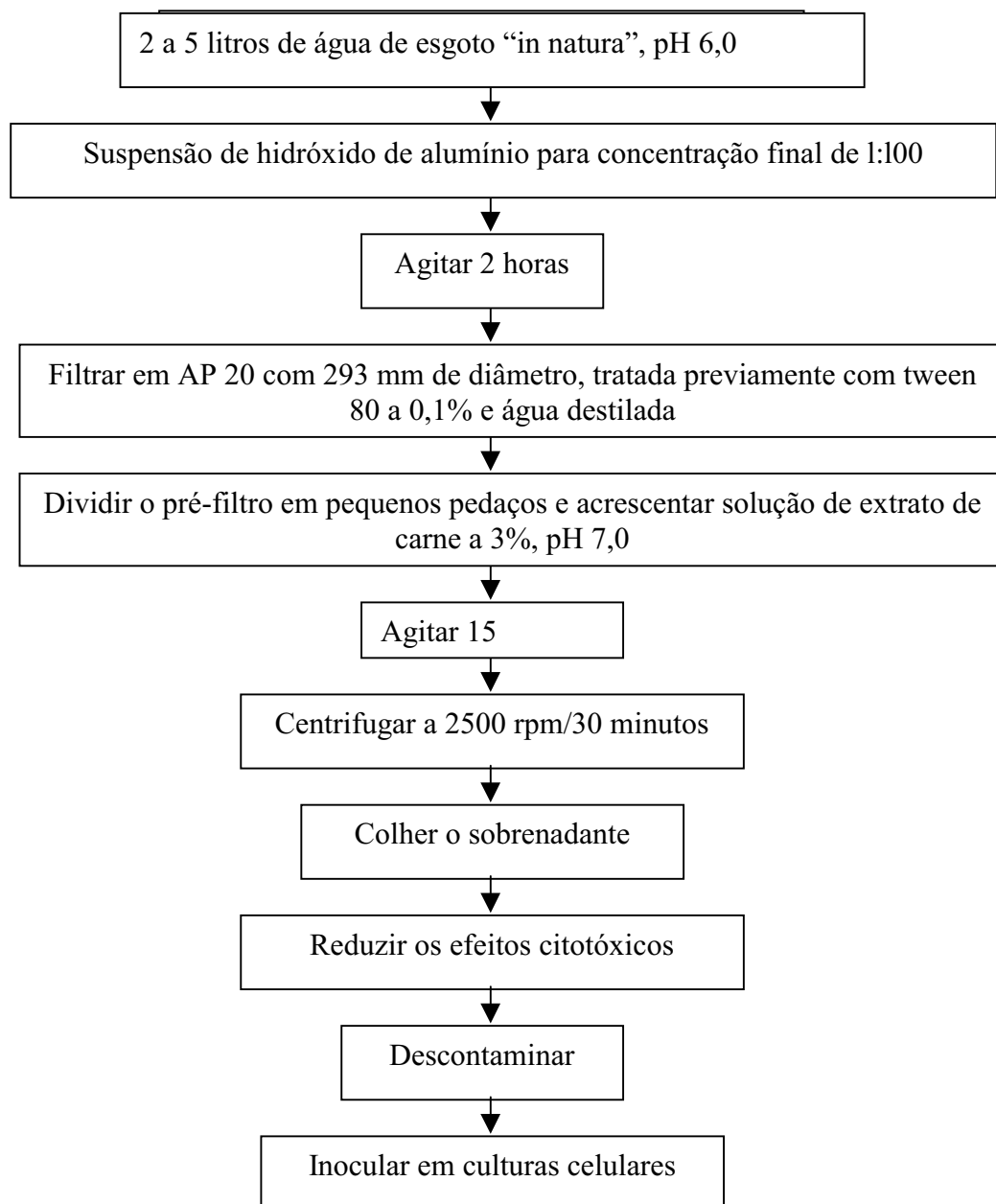
A-5.2.6 Pipetador automático ou outro dispositivo adequado para aspiração de amostras e reagentes.

A-5.2.7 Protetor facial.

De utilidade obrigatória (juntamente com a máscara com filtro adequado e luvas) no preparo de soluções de ácidos a serem empregados na lavagem de materiais

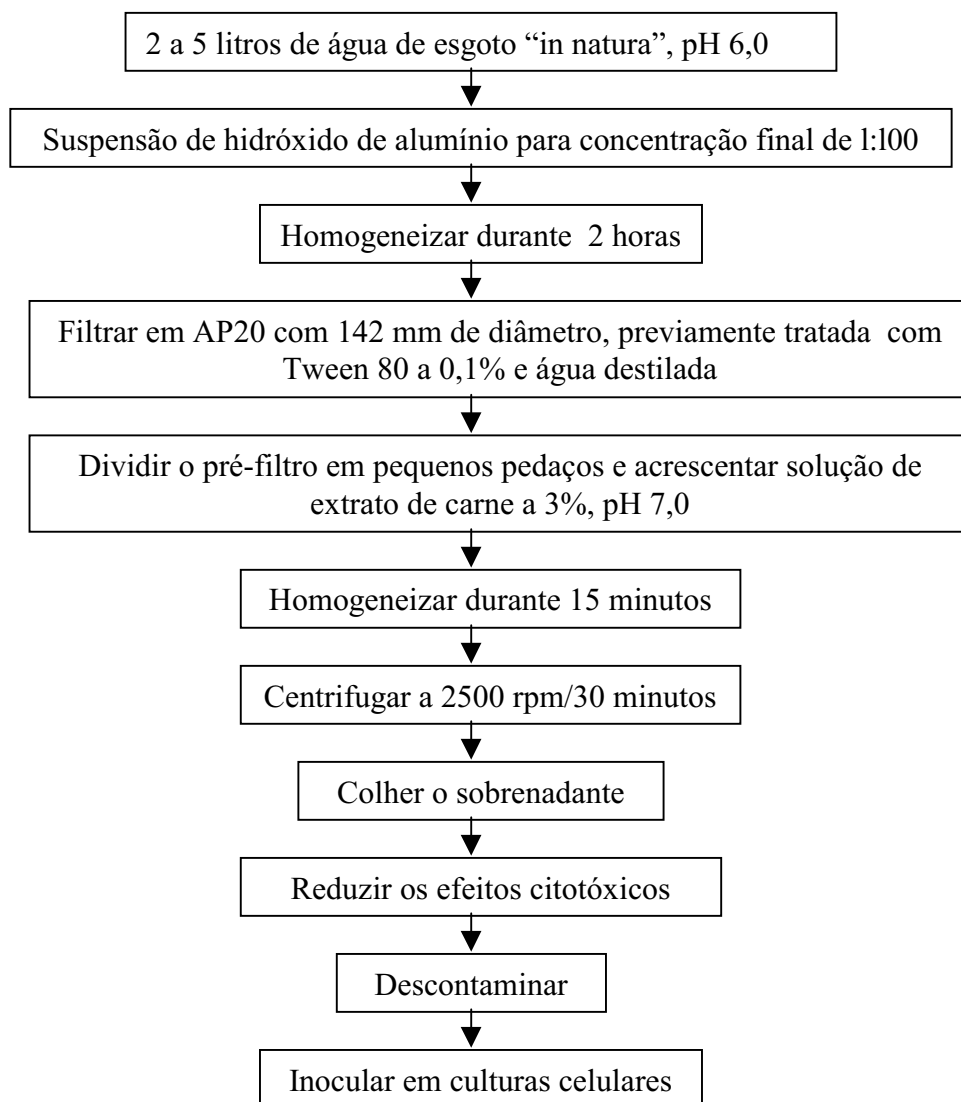
/ANEXO B

ANEXO B – Esquema de procedimento utilizando-se sistema de filtração (porta-filtro “Millipore”)



/ANEXO C

ANEXO C – Esquema de procedimento, utilizando-se funil de Büchner



/ANEXO D

ANEXO D – Esquema de procedimento, utilizando-se a Técnica de Moore (mecha de gaze)