



NORMA TÉCNICA

L5.506

Dez/1988
22 PÁGINAS

Método de concentração de lodo de esgoto para isolamento de enterovirus: método de ensaio

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	MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO DE LODO DE ESGOTO PARA ISOLAMENTO DE ENTEROVIRUS Método de ensaio	L5.506 DEZ/88
--------	--	----------------------

<u>SUMÁRIO</u>	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	2
3 Definições.....	2
4 Aparelhagem.....	3
5 Execução do ensaio.....	11
Anexo A - Procedimentos complementares.....	15
Anexo B - Esquemas de procedimento.....	19
Anexo C - Referências bibliográficas.....	21

INTRODUÇÃO

O crescimento populacional acelerado dos últimos anos e a consequente expansão urbana aumentaram a demanda agrícola, a ponto de se tornar interesse mundial, a utilização de resíduos orgânicos para o condicionamento de solos agriculturáveis, tanto de zonas áridas como de zonas úmidas. Embora a utilização do lodo de esgoto no solo, pareça ser a solução para vários problemas, existe o perigo de contaminação do solo, vegetação, animais e do agricultor com microrganismos patogênicos, como os vírus, caso a sua utilização não seja bem controlada e o tratamento aplicado ao lodo não seja adequado.

Estudos sobre o comportamento dos Enterovírus durante os diferentes tipos de tratamento de lodos de esgoto vem sendo avaliados. Taxas consideráveis de partículas virais tem sido observadas com frequência, após a digestão anaeróbica do lodo. Essas quantidades variaram de acordo com as diversas condições operacionais, tais como a temperatura do processo, a duração do tempo de retenção e a concentração dos sólidos suspensos. Com o tratamento químico em condições de pH alcalino foram observadas taxas de inativação virais acima de 90%; já com o tratamento térmico obteve-se cerca de 100% de remoção, isto deve-se ao fato de que os Enterovírus não resistem ao dessecação e a altas temperaturas.

Os Enterovírus podem ser de grande utilidade na avaliação da eficiência dos processos de compostagem e tratamento de lodo de esgoto, pois eles são mais resistentes a alguns tipos de tratamento do que as bactérias convencionais. No entanto, poucos são os dados encon

trados na literatura sobre o isolamento de Enterovírus de amostras de lodo de esgoto "in natura".

Diferentes métodos vêm sendo desenvolvidos e aperfeiçoados, visando a concentração de Enterovírus de amostras de lodo, não existindo, no entanto, nenhum método universal para concentrar vírus a partir de qualquer tipo de amostra ambiental. As metodologias existentes apresentam certas limitações, o que permite utilizá-las apenas em determinadas tarefas; sendo que a escolha do método adequado, vai depender das características da amostra em estudo.

A metodologia descrita nesta Norma se aplica para a concentração de amostras de lodo altamente contaminadas, pois tais métodos utilizam pequenas quantidades do material a ser testado. Convém lembrar também que estes métodos de concentração continuam constantemente em desenvolvimento, visando sempre se obter uma técnica mais sensível para a recuperação de Enterovírus de amostras ambientais.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve os procedimentos que permitem concentrar, em laboratório, as amostras de lodo de esgoto para isolamento de Enterovírus.

2 NORMAS 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
- L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia
- 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 3.6.

3.1 Adsorção

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

3.2 Concentração

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

3.3 Lodo digerido

Lodo de esgoto com menos de 10% de sólidos (2 a 6%), obtido na saída do digestor.

3.4 Lodo digerido centrifugado

Lodo de esgoto com mais de 10% de sólidos (15 a 30%).

3.5 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

3.6 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 capa

cidade 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 que 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 aos operadores.

4.1.6 Centrífuga refrigerada

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

4.1.7 Congeladores

Com regulagem para manter a temperatura na faixa de -20°C a -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 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°C . O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 4 a 6 horas, a uma temperatura de 170 a 180°C .

4.1.10 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.

do. 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.

4.1.11 Placa agitadora magnética

Com velocidade regulável.

4.1.12 Pipetador automático

Ou outro dispositivo de segurança para sucção de conteúdos líquidos.

4.1.13 Porta-filtro

De aço inoxidável, com 25 mm de diâmetro.

4.1.14 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.

4.1.15 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 deve ser feitas periodicamente.

4.2 Materiais

4.2.1 Alcoômetro

4.2.2 Algodão hidrófilo

4.2.3 Bandejas de aço inoxidável

4.2.4 Barra magnética

Recoberta com teflon, tamanho 6 cm x 1 cm.

4.2.5 Fita adesiva

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

4.2.6 Fita crepe

4.2.7 Flaconete

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

4.2.8 Filtro Zeta Plus

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

4.2.9 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).

4.2.10 Papel alumínio

4.2.11 Papel Kraft

4.2.12 Pinça

Dente de rato, de aço inoxidável.

4.2.13 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 1 mL, 5 mL e 10 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.

4.2.14 Pissete para álcool a 70%

4.2.15 Porta-pipetas, de aço inoxidável

4.2.16 Provetas graduadas

Com marcação externa, nos volumes de 100, 250, 500, 1 000 e 2 000 mL.

4.2.17 Seringas hipodérmicas

4.2.18 Tubos de centrífuga

Com capacidade de 20 mL, 100 mL e 1 000 mL.

4.2.19 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 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, devem ser mantidos sem modificações posteriores. Datar os frascos de reagentes após recebimento e abrir fi

cha controle na qual devem constar a data da chegada e todas as pesagens realizadas. Isto permite o controle do estoque de drogas existentes no laboratório.

4.3.2 Reagentes necessários

- a) Ácido clorídrico (HCl) p.a.;
- b) Anfotericina B (fungizone), 250 µg/mL;
- c) Água destilada;
- d) Álcool etílico comercial;
- e) Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) p.a.;
- f) Cloreto de alumínio (AlCl₃.6H₂O) p.a.;
- g) Cloreto de sódio (NaCl) p.a.;
- h) Dextrose;
- i) Extrato de carne;
- j) Fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) p.a.;
- k) Fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄.7H₂O) p.a.;
- l) Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- m) Penicilina G-potássica cristalina;
- n) Peptona de soja;
- o) Sulfato de gentamicina;
- p) Tiosulfato de sódio;
- q) Triptona.

4.4 Meios de cultura

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

Fórmula:

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

Preparo:

Pesar 30 g do meio desidratado "Tryptic Soy Broth" e acrescentar 1 000 mL 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 1 N (item 4.5.6). Distribuir volumes de 12 mL em tubos de 15 mm x 150 mm, com tampa de ros

ca. Esterilizar por autoclavação (item 4.6.1).

4.5 Soluções

4.5.1 Álcool a 70%

Fórmula:

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

Preparo:

Medir 700 mL de álcool etílico comercial em recipiente adequado e adicionar uma quantidade de água (aproximadamente 200 a 300 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) 5 N

Fórmula:

Ácido clorídrico fumegante.....	417,5 mL
Água destilada estéril.....	582,5 mL

Preparo:

Em um balão volumétrico com 582,5 mL de água destilada estéril, adicionar 417,5 mL de ácido clorídrico fumegante.

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

Fórmula:

Cloreto de alumínio.....	6,035 g
Água destilada q.s.p.....	500,0 mL

Preparo:

Pesar 6,035 g de cloreto de alumínio e acrescentar 500 mL de água destilada fria com agitação constante até completa dissolução. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos (item 4.6.1).

4.5.4 Solução de extrato de carne a 10%

Fórmula:

Extrato de carne.....	20 g
Água destilada q.s.p.....	200 mL

pH final: 7,0

Preparo:

Pesar 20 g de extrato de carne em um erlenmeyer de 500 mL e acrescentar 200 mL de água destilada fria, agitando até completa dissolu

ção. 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 fosfato de sódio (Na₂HPO₄.7H₂O) 0,15 M

Fórmula:

Fosfato de sódio dibásico.....	4,02 g
Água destilada q.s.p.....	10,0 mL

pH final: 9,0

Preparo:

Pesar 4,02 g de fosfato de sódio e acrescentar 100 mL de água destilada fria com agitação constante até completa dissolução. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos (item 4.6.1).

4.5.6 Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 N

Fórmula:

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

Preparo:

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

4.5.7 Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 6 N

Fórmula:

Hidróxido de sódio.....	240 g
Água destilada estéril q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 240 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000 mL com água destilada estéril.

4.5.8 Solução-estoque de penicilina G-potássica cristalina

Fórmula:

Penicilina G-potássica cristalina.....	10 000 000 UI
Solução balanceada de Hanks 1 x concentrada.....	100 mL

Preparo:

Dissolver o conteúdo de um frasco de penicilina G-potássica cristalina (10 milhões UI) em 100 mL 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 volumes de 50 mL.

Armazenar em congelador a -20°C .

4.5.9 Solução de sulfato de gentamicina

Fórmula:

Sulfato de gentamicina (cada 1 mL contém 40 mg de gentamicina base).....	1 mL
Solução balanceada de Hanks 1 x concentrada.....	3 mL

Preparo:

Dissolver o conteúdo de uma ampola de sulfato de gentamicina (40 mg) em 3 mL 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.....	5 mL
Água bidestilada estéril.....	50 mL

Preparo:

Adicionar 5 mL de soro fetal bovino inativado, em banho-maria a 56°C durante 30 minutos, em 50 mL de água bidestilada estéril. Agitar levemente para dissolução.

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 congelador (-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 esses frascos são lentamente dissolvidos e íons de metais pesados são, posteriormente, encontrados nessas soluções.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

Para pesquisar a presença de vírus entéricos em lodos de esgoto é necessário levar em consideração que eles podem estar adsorvidos aos sólidos de origem fecal e a outros materiais que compõem a fase sólida do lodo. Entre os fatores que auxiliam a agregação dos vírus entéricos a materiais particulados figuram a natureza do material, o pH, a temperatura e a umidade.

Para promover a dissociação entre os sólidos e os vírus, a amostra de lodo é tratada com solução proteica (extrato de carne) em pH e concentração adequados. Esta solução é então concentrada, através do processo de floculação orgânica no qual o ajuste do pH e a centrifugação levam à obtenção de pequenos volumes de amostra possíveis de serem analisados.

Uma vez concentrada, o passo seguinte é a inoculação da amostra descontaminada em culturas de células. No entanto, substâncias tóxicas presentes na amostra de lodo podem destruir as células, sendo necessário um tratamento prévio antes da inoculação. Para tal, filtra-se o concentrado final através de filtros eletropositivos compostos de celulose e partículas inorgânicas, processo este que reduz os componentes tóxicos das amostras concentradas.

5.2 Concentração de amostras de lodo digerido (menos de 10% de sólidos) para isolamento de Enterovírus

5.2.1 Pesar 200 g de lodo em um recipiente com capacidade para 1 000 mL. Homogeneizar, utilizando agitador e barra magnética.

5.2.2 Medir o pH inicial da amostra de lodo com o auxílio de um potenciômetro.

5.2.3 Acrescentar 2 mL de solução de cloreto de alumínio 0,05 M, com agitação contínua.

5.2.4 Ajustar o pH para 3,0-3,5 com solução de ácido clorídrico 5 N e homogeneizar durante 30 minutos.

5.2.5 Verificar periodicamente o pH da amostra para assegurar-se de que o pH está na faixa adequada e sempre acima de 3,0.

5.2.6 Após o período de homogeneização, centrifugar a amostra a 4 000 rpm durante 15 minutos, em centrífuga refrigerada.

5.2.7 Desprezar o sobrenadante e eluir o sedimento com 200 mL de solução de extrato de carne a 10%, pH 7,0. Homogeneizar durante 30 minutos.

5.2.8 Centrifugar a 4 000 rpm durante 30 minutos.

5.2.9 Colher o sobrenadante e diluir a 1:3,3 com água destilada es téril, para ajustar a concentração do extrato de carne para 3%. Calcular o volume de água necessário para a diluição 1:3,3, utilizando as seguintes fórmulas:

$$a) \text{ volume final da amostra a 3\%} = \frac{\text{volume do sobrenadante} \times 10}{3}$$

$$b) \text{ volume de água destilada a ser acrescentada para diluir 1:3,3} = \text{volume final da amostra a 3\%} - \text{volume do sobrenadante}$$

Exemplo:

$$\text{volume final da amostra a 3\%} = X$$

$$\text{volume do sobrenadante} = 225 \text{ mL}$$

$$\text{volume de água destilada a ser acrescentado para diluir a 1:3,3} = Y$$

$$a) x = \frac{225 \text{ mL} \times 10}{3} \rightarrow x = 750 \text{ mL}$$

$$b) y = 750 \text{ mL} - 225 \text{ mL} \rightarrow y = 525 \text{ mL}$$

5.2.10 Após adicionar ao sobrenadante o volume adequado de água destilada, dar prosseguimento à análise, acrescentando-se a amostra solução de ácido clorídrico 5 N, gota a gota e com agitação constante, até atingir pH 3,5.

5.2.11 Deixar em agitação lenta por 30 minutos.

5.2.12 Centrifugar a 4 000 rpm durante 30 minutos em centrífuga refrigerada.

5.2.13 Desprezar o sobrenadante e eluir o sedimento com 15 mL de solução de fosfato de sódio a 0,15 M, pH 9,0 e agitar por 15 minutos.

5.2.14 Ajustar o pH para 7,0-7,2 e proceder à redução do efeito citotóxico (item 5.4) e descontaminação da amostra (item 5.5).

5.3 Concentração de amostras de lodo digerido centrifugado (mais de 10% de sólidos) para isolamento de Enterovírus

5.3.1 Pesar 100 g de lodo em um recipiente com capacidade para 1 000 mL.

5.3.2 Adicionar 200 mL de solução de extrato de carne a 10%, pH 7,0. Homogeneizar durante 30 minutos, utilizando agitador e barra magnética.

5.3.3 Centrifugar a 4 000 rpm por 30 minutos, em centrífuga refrigerada.

5.3.4 Colher o sobrenadante e ajustar a concentração do extrato de carne para 3%, fazendo uma diluição a 1:3,3, dando prosseguimento ao ensaio de acordo com os itens 5.2.9 a 5.2.14.

5.4 Redução dos efeitos citotóxicos dos concentrados finais das amostras de lodo de esgoto

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

5.4.1 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.

5.4.2 Tratar o filtro com 10 mL de solução de soro fetal bovino a 10%, que é passada através do respectivo filtro com o auxílio de seringa hipodérmica e pressão manual.

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

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

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

5.4.6 Submeter a amostra ao teste de esterilidade de acordo com o item 5.5.

5.5 Descontaminação dos concentrados finais das amostras de lodos de esgoto

Antes de ser inoculada 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.

5.5.1 Em um flaconete estéril, previamente rotulado com os dados da amostra, adicionar 0,5 mL de penicilina (item 4.5.8), 0,5 mL de sulfato de gentamicina (item 4.5.9), 0,5 mL de fungizone líquida (250 µg/mL) e a amostra em teste. Homogeneizar vigorosamente.

5.5.2 Deixar em contato durante 1 hora, à temperatura ambiente.

5.5.3 Após esse período, inocular 1 mL da amostra em teste em 2 tubos de caldo de soja e triptona (item 4.4.1).

5.5.4 Incubar os tubos inoculados na estufa a 35°C e realizar leituras diárias durante 14 dias.

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

5.5.5.1 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.

Nota: Caso as amostras continuem a apresentar contaminação, submetê-las a centrifugação a 4 000 rpm por 15 minutos, depois proceder conforme descrito nos itens 5.5.1 a 5.5.5.

5.6 Isolamento, quantificação e identificação dos vírus presentes nas amostras de lodo de esgoto concentrados

5.6.1 Após terem sido tratados, para a redução dos componentes citotóxicos e testados quanto a 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.

/ANEXO A

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 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 semeadura, 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.

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 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 entre os materiais a serem esterilizados. Essas 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 microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através 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 bidestilada para garantir a produção de uma água de alta qualidade, livre 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 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 sem varrições exageradas e, de preferência, empregando solução de formalina ou de outro desinfetante. Chão, mesas e balcões são limpos diariamente. Nos fins de semana, realiza-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive vidros e paredes. Esporadicamente, após a limpeza, o ambiente é impregnado com uma solução alcóolica 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 manobras com material infectado são as que apresentam maiores possibilidades de ser infectadas acidentalmente.

A inalação de aerossóis, a aspiração de soluções contaminadas através de pipetas, acidente de centrifugações, etc., provocam comprova

damente 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 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 riscos ao operador), mas sim 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.

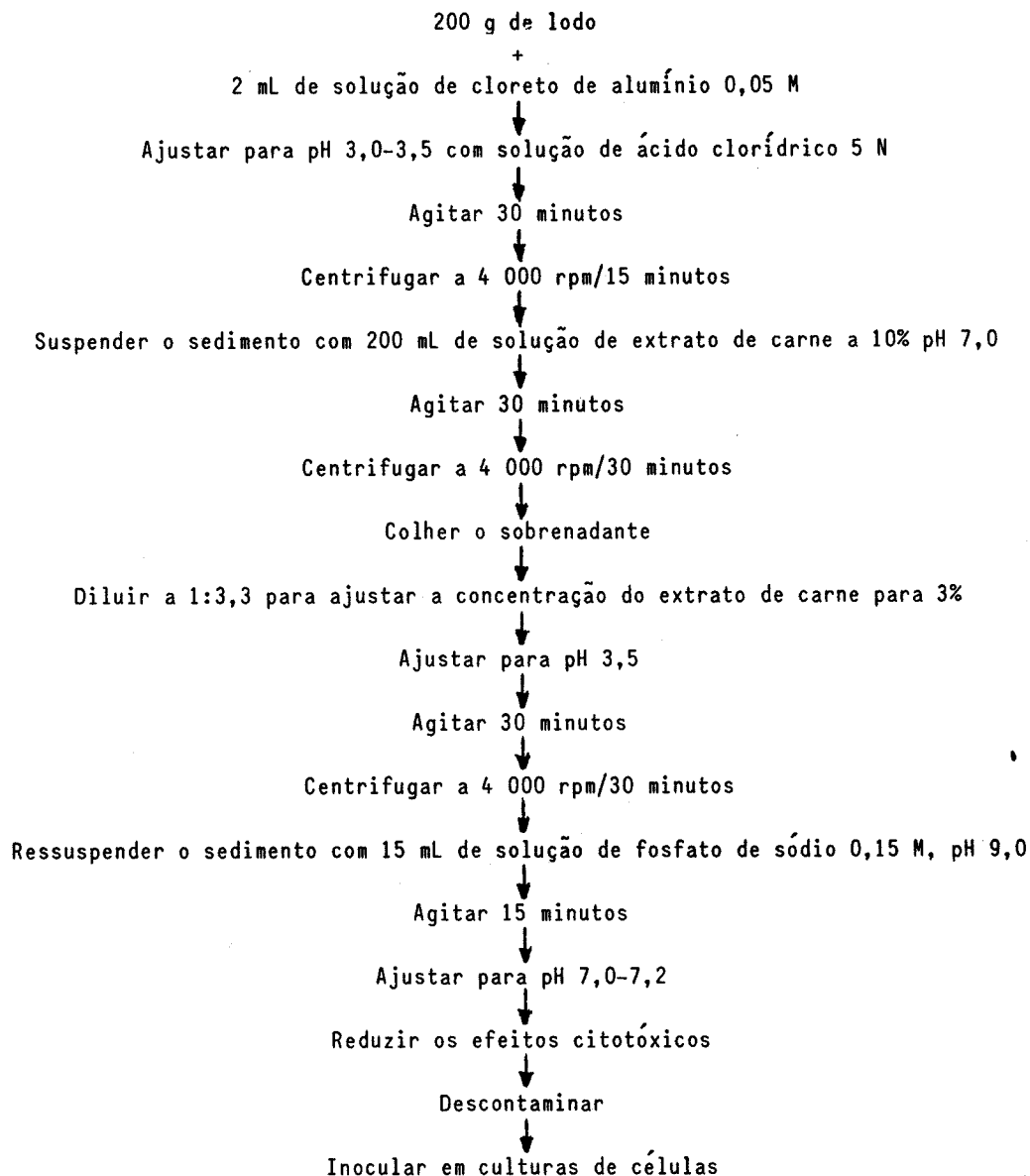
A-5.2.2 Aventais de pano

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

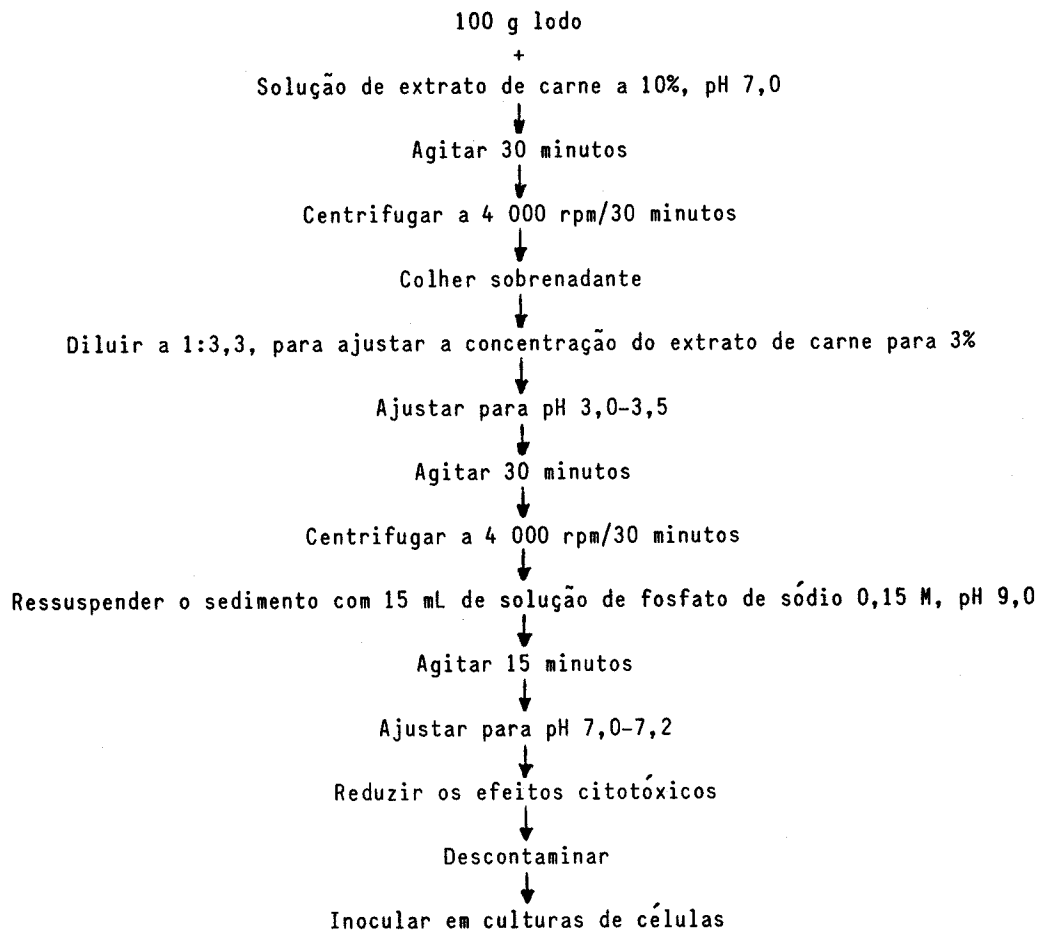
A-5.2.4 Protetor facial

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 - ESQUEMAS DE PROCEDIMENTOESQUEMA 1 - Método de concentração de lodo digerido (menos de 10% de sólidos) para isolamento de Enterovírus

/ESQUEMA 2

ESQUEMA 2 - Método de concentração de lodo digerido centrifugado (mais de 10% de sólidos) para isolamento de Enterovírus



/ANEXO C

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Detection of enteric viruses. In: ---. Standard methods for the examination of water and wastewater. 16 ed. Washington, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, 1985. p. 946-74.
- C-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.
- C-3 BERMAN, D. & BERG, G. Recovery of indigenous viruses from sludges, tentative EPA method, in press, 1980.
- C-4 BLOCK, J.C.; HAVELAAR, A.H. & L'HERMITE, P. Epidemiological studies of risks associated with the agricultural use of sewage sludge: Knowledge and needs. London, Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 168 p.
- C-5 CETESB, Norma M1.002 - Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular. São Paulo, CETESB, 1985.
- C-6 _____, Norma L5.501 - Preparo de culturas celulares para ensaios virológicos. São Paulo, CETESB, 1987.
- C-7 _____, Norma L5.502 - Enterovírus em água - Isolamento e quantificação. São Paulo, CETESB, 1987.
- C-8 _____, Norma L5.504 - Identificação de Enterovírus. São Paulo, CETESB, 1986.
- C-9 _____, Norma L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratórios de microbiologia. São Paulo, CETESB, 1986.
- C-10 _____, Norma L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, CETESB, 1985.

- C-11 FEACHEM, R.G.; BRADLEY, D.J.; GARELICK, H. & MARA, D.D. Sanitation and disease health aspects of excreta and wastewater management. New York, John Wiley & Sons, 1983. p. 133-172.
- C-12 HEJKAL, T.W.; GERBA, C.P. & RAO, V.C. Reduction of cytotoxicity in virus concentrates from environmental samples. Appl. Environ. Microbiol., 43: 731-733, 1982.
- C-13 KATZENELSON, E.; FATTAL, B. & HOSTOVESKY, T. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. Appl. Environ. Microbiol., 32: 638-639, 1976.
- C-14 KELLY, S. & SANDERSON, W.W. Density of enteroviruses in sewage. J. Water Pollut. Control Fed., 32: 1269-1273, 1960.
- C-15 LUND, E. & RONNE, V. On the isolation of virus from sewage treatment plant sludges. Water Res., 7: 863-871, 1973.
- C-16 LUND, E. & HEDSTRÖM, C.E. Occurrence of enteric viruses in sewage after active sludges treatment. J. Water Pollut. Control Fed., 41: 169-174, 1969.
- C-17 WELLINGS, F.M.; LEWIS, A.L. & MOUNTAIN, C.W. Demonstration of solids - associated virus in wastewater and sludge. Appl. Environ. Microbiol., 31: 354-358, 1976.
- C-18 WELLINGS, F.M.; LEWIS, A.L.; MOUNTAIN, C.W. & PIERCE, L.V. Demonstration of virus in groundwater after effluent discharge and soil. Appl. Environ. Microbiol., 29: 751-757, 1975.
-