

# DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS COMO MEDIDA DE QUALIDADE EM ÁGUA POTÁVEL: SITUAÇÃO ATUAL E LIMITAÇÕES

Fernando Rosado Spilki<sup>1</sup>

## RESUMO

A água potável deve ser livre de poluição fecal. Os métodos clássicos de determinação de contaminação fecal da água baseiam-se na detecção de coliformes fecais. Todavia, vírus de excreção fecal (vírus entéricos) podem estar presentes mesmo na ausência de coliformes detectáveis e constituir risco como agentes causadores de epidemias na população humana. A presente revisão traz conceitos introdutórios sobre vírus entéricos, as técnicas atualmente disponíveis para análise virológica da água e os entraves técnicos e conceituais para a implementação de tais procedimentos na rotina do monitoramento de qualidade da água.

**Palavras-chave:** Análise Viroológica da Água. Vírus Entéricos. Água Potável.

## ABSTRACT

Drinking water should be free of fecal pollution. Classical methods for determination of fecal contamination of water are based on the detection of fecal coliforms. However, viruses of fecal excretion (enteric viruses) may be present even on the absence of detectable coliforms being a risk as causative agents of epidemics on the human population. The present review contains introductory concepts about enteric viruses, techniques which are presently available for viral analysis of water and the possible technical and conceptual barriers regarding the implementation of such procedures on the routine monitoring of water quality.

**Keywords:** Viral Analysis of Water. Enteric Viruses. Drinking Water.

---

<sup>1</sup>Professor Adjunto e Orientador pelo Programa de Pós-graduação Mestrado em Qualidade Ambiental da Feevale; Doutor em Genética e Biologia Molecular; Mestre em Virologia Animal; Médico Veterinário.

## INTRODUÇÃO

Microrganismos são agentes biológicos microscópicos que podem ou não causar doenças no homem. Nessa categoria se incluem bactérias, protozoários, vírus e alguns tipos de fungos. Três grandes grupos de microrganismos podem ser encontrados na água: bactérias, protozoários e vírus. A presença de microrganismos é mais freqüente em lagos e rios, mas a água de poços também pode apresentar esses agentes (Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water, 2004). Muitos microrganismos conhecidos estão associados à presença de contaminação por fezes, seja de origem humana ou animal, na água potável.

O objetivo principal de garantir a ausência de contaminação fecal em águas destinadas ao consumo humano é reduzir a transmissão de doenças de veiculação hídrica. Para tanto, é utilizado o tratamento da água destinada ao consumo por grandes populações humanas (TAVARES et al., 2005). Visando monitorar a eficácia do sistema de tratamento e a conseqüente qualidade da água fornecida à população, são feitos rotineiramente testes da água tratada com vistas a mensurar parâmetros relacionados a aspectos físicos e químicos (turbidez, alcalinidade, acidez, presença de matéria orgânica e inorgânica), bem como de aspectos microbiológicos (TEIXEIRA et al., 2002).

A análise de contaminação fecal da água se baseia atualmente nos métodos clássicos de detecção de coliformes fecais (bactérias de origem fecal, em especial a *Escherichia coli*, um habitante comensal do trato gastrointestinal dos mamíferos), respeitando regulamentações de uso local ou nacional, normalmente conforme parâmetros deliberados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006). O uso de tais microrganismos como indicadores de poluição por fezes humanas apresenta duas limitações principais: I) não é possível distinguir contaminação fecal de origem humana de outras fontes, tendo em vista que tais bactérias podem infectar outros animais; II) coliformes apresentam baixa resistência no ambiente, especialmente quando comparados a alguns tipos de vírus, de tal modo que um exame mensurando coliformes fecais não exclui a possibilidade da contaminação da água por outros microrganismos causadores de doenças em humanos, notadamente os vírus (TAVARES et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2002).

Dadas as limitações inerentes ao uso dos coliformes fecais como indicadores microbiológicos da potabilidade da água, nos últimos anos, é crescente a pesquisa no sentido de aprimorar métodos de detecção aplicáveis à análise de outros microrganismos na água, com especial atenção aos vírus entéricos (TAVARES et al., 2005; FONG & LIPP et al., 2005).

Vírus são organismos acelulares, ou seja, desprovidos de células. Sua estrutura normalmente compreende o ácido nucléico (genoma viral) protegido por uma capa de proteínas (chamada capsídeo). O capsídeo pode ou não estar envolto por uma membrana biológica, o envelope viral. Vírus desprovidos de envelope (chamados não-envelopados) são extremamente resistentes no ambiente e podem permanecer viáveis na água ou no solo por períodos mais prolongados do que organismos mais complexos, como as bactérias. Portanto, em última análise, uma água livre de coliformes fecais nem sempre estará livre de contaminação por fezes (BOSCH, 1998; WHO, 2003).

Mais de 140 diferentes vírus podem ser encontrados nos dejetos humanos, muitos deles sendo importantes causadores de doença. Para esses agentes, a principal via de transmissão é a água. Não seria de modo algum prático analisar a água buscando todos esses diferentes agentes, por isso grande parte dos esforços têm se concentrado na busca de indicadores virais fidedignos da contaminação fecal pela detecção de um vírus ou de um conjunto de diferentes agentes virais, sendo o enfoque voltado principalmente aos colifagos (vírus que infectam bactérias) e mais recentemente aos chamados vírus entéricos (Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water, 2004; JIANG et al., 2007).

Vírus entéricos são agentes encontrados com frequência como contaminantes de mananciais de água e do ambiente (FONG & LIPP et al., 2005). Os vírus entéricos são um grupo heterogêneo de agentes virais que inclui desde agentes com destacada importância como causa de doenças em humanos e animais. Diferentes espécies de vírus podem ser incluídas nesse grupo, tais como os Enterovírus, Norovírus, Astrovírus, Adenovírus, Rotavírus e os vírus das Hepatites A e E, dentre outros agentes virais (Tabela 1; BOSCH, 1998; FONG & LIPP et al, 2005). Tais vírus são caracterizados por sua estabilidade estrutural, tanto no trato gastrointestinal quanto no ambiente e pela característica de serem excretados através das fezes de humanos e animais podendo resistir como contaminantes da água e do ambiente por longos períodos de tempo (BOSCH, 1998; MEHNERT et al., 2003).

De fato, normalmente os vírus entéricos são mais resistentes a métodos químicos e físicos de tratamento da água e esgoto do que as bactérias (tais como os coliformes fecais), permitindo um monitoramento mais acurado da eficácia de tais procedimentos (WHO, 2006). Desse modo, a detecção destes agentes em amostras de água tratada e não-tratada tem sido realizada com sucesso no intuito de inferir, através da presença ou não desses vírus, a eficácia dos procedimentos de tratamento de esgoto e de água na área urbana ou de resíduos oriundos da produção animal nos sistemas agropastoris (LEY et al., 2002). Esses agentes podem causar doenças em humanos, que vão desde uma diarreia passageira até infecções do sistema nervoso central (Tabela 1).

Ainda que os vírus entéricos possam estar associados a graves manifestações clínicas em humanos, limitações técnicas e de ordem conceitual se impõem ao seu uso na análise rotineira da água potável (Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water, 2004; WHO, 2006). Características inerentes a estes agentes, métodos de detecção e limitações serão discutidos nas seções a seguir.

Tabela 1: Vírus entéricos com possível transmissão por água e respectivas doenças causadas em humanos

<b>Vírus</b>	<b>Doença que causa</b>
<b>Poliovírus</b>	Meningite (inflamação das meninges), paralisia
<b>Echovírus</b>	Meningite, diarreia, doenças respiratórias
<b>Coxsackievírus A</b>	Meningite, doenças respiratórias
<b>Coxsackievírus B</b>	Miocardite (inflamação do músculo cardíaco), anomalias cardíacas no feto, doenças respiratórias, meningite
<b>Enterovírus 68 a 71</b>	Meningite, encefalite, conjuntivite, doenças respiratórias
<b>Enterovírus 72</b>	Hepatite (inflamação do fígado)
<b>Vírus das Hepatites A e E</b>	Hepatite
<b>Norovírus</b>	Diarreia, vômito
<b>Calicivírus</b>	Gastroenterite
<b>Astrovírus</b>	Gastroenterite
<b>Reovírus</b>	Não determinada, p ossivelmente doença respiratória
<b>Rotavírus</b>	Diarreia em crianças
<b>Adenovírus</b>	Conjuntivites, gastroenterites, doenças respiratórias
<b>Coronavírus</b>	Doenças respiratórias
<b>Parvovírus</b>	Doenças respiratórias
<b>Torovírus</b>	Gastroenterites
<b>Torquetenovírus</b>	Não determinada, p ossivelmente hepatite

## FONTES DE CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR VÍRUS ENTÉRICOS

Os vírus entéricos são eliminados em grandes quantidades nas fezes dos indivíduos infectados, mesmo que não estejam doentes. Quantidades da ordem de  $10^9$  a  $10^{11}$  partículas virais podem estar presentes em 1 grama de fezes excretadas por uma pessoa infectada (BOSCH, 1998). Essa imensa quantidade de agentes pode ser disseminada entre as pessoas por veiculação hídrica, fechando um ciclo de transmissão fecal-oral, caso medidas que barrem a contaminação da água não sejam adotadas. A desinfecção química geralmente aplicada ao tratamento de água normalmente não é eficaz em destruir a maioria das partículas virais infecciosas. Para um tratamento eficaz, que evite epidemias de infecções víricas, seria necessária, associada à adição de cloro, a ozonização e exposição da água à luz ultravioleta (UV) na faixa de comprimentos de onda esterilizantes (Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water, 2004; TEIXEIRA et al., 2005; WHO, 2006). Tais estratégias podem reduzir grandemente o número de vírus presente na água, mas a total erradicação é de difícil alcance pelos métodos disponíveis atualmente para aplicação em larga escala (TAVARES et al., 2005).

Não só o consumo direto da água contaminada serve de via de disseminação mas o uso de águas contaminadas com vírus na lavagem de utensílios, no banho e outras atividades de higiene pessoal e a irrigação de verduras e outros alimentos consumidos crus pode ser fonte de contaminação pelos vírus entéricos (WHO, 2003).

## RESISTÊNCIA E DISSEMINAÇÃO DOS VÍRUS ENTÉRICOS NO AMBIENTE

Por características inerentes à sua estrutura, os vírus entéricos podem se manter viáveis por períodos mais prolongados no ambiente que outros organismos, especialmente os coliformes fecais. Esses agentes são bastante resistentes às intempéries naturais, dessecação, acidez ou alcalinidade da água e do solo. Ainda do ponto de vista estrutural, por seu tamanho extremamente diminuto (menor que 200 nm), são extremamente filtráveis, o que compromete muito a eficácia de algumas etapas da purificação da água para consumo. Essa filtrabilidade permite que tais agentes se disseminem de fossas sépticas a poços, rios e lagos com relativa facilidade. Já foi relatado transporte de vírus pela água da chuva de fossas sépticas a lençóis freáticos, localizados a distâncias superiores a 1.500 metros (HURST et al., 1980).

## MÉTODOS DE ANÁLISE VIROLÓGICA DA ÁGUA

O monitoramento da presença de vírus na água geralmente é considerado de difícil execução (Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water, 2004; WHO, 2006). No passado recente, o desenvolvimento de métodos moleculares, voltados à detecção do genoma viral facilitou grandemente o processo, mas dificuldades inerentes às pequenas quantidades de vírus disponíveis na água, o relativo custo elevado das técnicas de detecção molecular e principalmente a falta de pessoal treinado dificultam a implementação da análise virológica da água como um procedimento de rotina (FONG & LIPP et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005).

Não há uma estimativa válida para todos os casos, mas muitos estudos demonstram que, em mananciais de água contaminada, podemos encontrar entre 1 e 10.000 partículas de vírus por litro de água coletada (BOSCH, 1998). Essa grande variação impõe a necessidade de concentrar os sólidos presentes na amostra antes de realizar a detecção de vírus propriamente dita (KATAYAMA et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2005). Para tanto, se utilizam de forma isolada ou separadamente, os métodos de

ultracentrifugação, ultrafiltração, filtração por membranas carregadas positiva ou negativamente, diálise e precipitação química, esta última com o emprego de poli(etileno glicol) (PEG) ou adição de hidróxido de alumínio à amostra como agentes precipitantes. O objetivo geral é obter uma massa de sólidos em que possam estar contidos os vírus contaminantes em uma concentração maior, passível de detecção posterior (BOSCH, 1998; KATAYAMA et al., 2002).

Os procedimentos de detecção viral devem ser realizados em laboratórios dotados de equipamentos adequados e pessoal treinado para a manipulação de vírus potencialmente patogênicos. Duas estratégias podem ser adotadas na detecção propriamente dita dos vírus presentes nas amostras de água concentradas: isolamento de vírus em cultivos de células *in vitro* e detecção molecular, pela amplificação de fragmentos do genoma dos vírus (BOSCH, 1998). A adoção de métodos baseados nos cultivos celulares é dispendiosa, a princípio, e pode ser prejudicada pela presença de toxicantes nas amostras analisadas, mas permite inferir a infeciosidade dos vírus presentes nas amostras e o real perigo de transmissão das doenças (AGBALIKA et al., 1984; BOSCH, 1998; TEIXEIRA et al., 2005). As técnicas moleculares facilitam o processo, pela facilidade na execução (CHANDLER et al., 2000; LEY et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2005) e maior contingente de pessoal treinado disponível do que o aquele com experiência em análises virológicas baseadas em cultivo celular. O uso de uma combinação dessas técnicas normalmente resulta em uma sensibilidade mais elevada para a detecção de vírus na água (GREENING et al., 2002).

## JUSTIFICATIVA PARA A ANÁLISE VIROLÓGICA DA ÁGUA

A análise virológica da água seria de grande interesse como ferramenta para avaliar os riscos associados ao uso geral e consumo da água, bem como para mensurar a eficácia do tratamento da água e os riscos à saúde humana (TEIXEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2002). Especialmente durante surtos de doenças de veiculação hídrica, a detecção de vírus entéricos na água fornece pistas às autoridades acerca das fontes primárias de contaminação, bem como permite identificar falhas nos sistemas de tratamento de água e esgoto (WHO, 2006).

No caso de água retirada de poços e lençóis subterrâneos, devido à percolação, é mais provável encontrarmos vírus entéricos do que coliformes fecais como contaminantes (Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water, 2004), devido ao reduzido tamanho das partículas virais. Talvez nesse caso, análises virológicas regulares fossem ainda mais importantes do que em água proveniente de rios e lagos, em que provavelmente, mesmo em longo prazo, a análise virológica da água deverá ficar restrita à existência de surtos que justifiquem o procedimento.

Outros microrganismos também podem ser utilizados como indicadores além de vírus entéricos com vantagens relativas em relação aos coliformes fecais (WHO, 2006). Vírus de bactérias (fagos) são de fácil detecção e mais resistentes que os coliformes no ambiente, mas diferentemente dos vírus entéricos, podem replicar-se nas bactérias presentes no ambiente, aumentando em número e não garantindo contaminação da água (JIAN G et al, 2007). Enterococos são bactérias mais resistentes que os coliformes às agressões ambientais e podem servir como um marcador adequado; todavia, em semelhança aos coliformes e diferentemente da maioria dos vírus, não é possível garantir que sua presença seja oriunda de contaminação por fezes de humanos ou de animais (Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water, 2004), o que seria de especial interesse em saúde pública.

## LIMITAÇÕES TÉCNICAS E CONCEITUAIS À ANÁLISE VIROLÓGICA DA ÁGUA

A análise virológica da água está além das capacidades operacionais e técnicas da maioria dos laboratórios de monitoramento da qualidade da água, especialmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2006). O treinamento de pessoal em maior escala em técnicas moleculares e o barateamento delas observado ao longo dos últimos anos podem, em médio a longo prazo, tornar esta uma dificuldade de menor importância para a implantação de protocolos de monitoramento da presença de vírus na água potável.

Dentre as dificuldades conceituais, uma questão alegada por muitos pesquisadores (BOSCH, 1998; WHO, 2006) é a falta de um parâmetro que defina qual a quantidade aceitável de vírus presente na água potável. Apenas a observação quantitativa de um número relativamente grande de surtos de doenças virais de veiculação hídrica permitirá sobrepujar este empecilho, tornando imperiosa a realização de mais esforços de pesquisa sobre o tema. Associado a isto, temos uma gama de diferentes agentes virais candidatos como indicadores de contaminação fecal, sendo necessária investigação qualitativa acerca de qual destes vírus, ou associação destes, seria mais adequada como marcador definitivo de poluição fecal e inadequabilidade da água para consumo (WHO, 2006). Temos aí mais um alvo para a realização de pesquisa acadêmica com importante impacto social.

Enquanto estas análises não se tornam uma realidade, a alternativa é implementar de forma efetiva uma gestão e observação rigorosa das estratégias clássicas de tratamento de água, com fiscalização rigorosa e monitoramento constante das etapas de floculação, clarificação, filtração e especialmente dos processos relacionados à desinfecção, em que esforços no sentido de reduzir ao máximo possível a presença de vírus sejam adotados.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os vírus entéricos apresentam elevada resistência no ambiente, notória incapacidade de se reproduzir fora do organismo hospedeiro e grande importância como agentes causais de importantes doenças em humanos. Tais características apontam que os vírus apresentam potenciais vantagens como agentes marcadores de contaminação da água por fezes, quando comparados aos coliformes fecais. Desde que sejam vencidas etapas de cunho prático para a adoção de tais metodologias e outros desafios de ordem conceitual, a análise virológica da água tende a oferecer uma importante ferramenta para garantia de qualidade da água potável em um futuro próximo.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho conta com o apoio financeiro do Centro Universitário Feevale, através do Projeto de Pesquisa 38.16.08.0914: “Uso de diferentes agentes virais como marcadores de impacto ambiental”.

## REFERÊNCIAS

AGBALIKA, F.; HARTEMANN, P.; FOLIGUET, J. M. Trypsin-Treated Ma-104: A Sensitive Cell Line for Isolating Enteric Viruses from Environmental Samples APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 1984, v. 47: p. 378-380.

BOSCH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Interntl. Microbiol.*, 1998, v.1: 191-196.

CHANDLER, DP; STULTS, JE; CEBULA, S; SCHUCK, B.L.; WEAVER, DW; ANDERSON, KK; EGHOLM, M; BROCKMAN, FJ. Affinity Purification of DNA and RNA from Environmental Samples with Peptide Nucleic Acid Clamps *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 2000, v.66: p. 3438–3445.

Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. 2004. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Supporting Documentation, Enteric viruses. **Health Canada**, Ontario, 28p.

FONG TT; LIPP, EK. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2005, v. 69: p. 357-371.

GREENING, GE, HEWITT, J; LEWIS, GD. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J. APPL. MICROBIOL.*, 2002, 93: p. 745–750.

HURST, CJ; GERBA, CP; CECH, I. Effects of Environmental Variables and Soil Characteristics on Virus Survival in Soil. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 1980, v. 40: p. 1067-1079.

JIANG, SC.; CHU, W; HE, J. Seasonal Detection of Human Viruses and Coliphage in Newport Bay, California. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007, v. 73, n. 20, p. 6468-6474.

KATAYAMA, H; SHIMASAKI, A; OHGAKI, S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002, v. 68, n. 3, p. 1033–1039.

LEY, V; HIGGINS, J; FAYER, R. Bovine Enteroviruses as Indicators of Fecal Contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, Madrid. 2002, v.68, n.7, p. 3455-3461.

MEHNERT, DU. Reuso de efluente doméstico na agricultura e a contaminação ambiental por vírus entéricos humanos. **Biológico**, 2003, v. 65, n.1/2 p. 19-21.

TAVARES, T M.; CARDOSO, DDP.; BRITO, WMED. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Revista de patologia tropical**, 2005, v. 34, n. 2, p. 85-104.

TEIXEIRA, JC.; LEAL, FCT. Desafios no controle de doenças de veiculação hídrica associadas ao tratamento e ao abastecimento de água para consumo humano. In: VI SIMPÓSIO ÍTALO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Vitória, 2002.

WHO (World Health Organization). 2006. Guidelines for drinking-water quality, Vol. 1. 3rd edition. **World Health Organization**, Genebra, 595 p.

WHO (World Health Organization). 2003. Emerging issues in water and infectious diseases,. **World Health Organization**, Genebra, 24 p.

