

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*TATIANA PRADO*

### **OCORRÊNCIA DE ROTAVÍRUS, ADENOVÍRUS, NOROVÍRUS E VÍRUS DA HEPATITE A EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO NO RIO DE JANEIRO E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE RECUPERAÇÃO VIRAL EM LODO DE ESGOTO**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Virologia

**Orientadores:** Prof. Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar  
Prof. Dra. Marize Pereira Miagostovich

**RIO DE JANEIRO**  
**2011**

*Essa tese é dedicada aos meus pais: Norvaldo do Amaral Prado e Vera Lucia Baldon por tudo que representam para mim*

*A Arnaldo Provasi Lanzara, meu amor, por compartilhar as mesmas expectativas e acompanhar todos os bons e maus momentos, sempre me incentivando e me ajudando a seguir adiante.*

## AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras: Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar e Dra. Marize Pereira Miagostovich, por terem me dado todo o apoio e incentivo para a realização desse trabalho, pelas experiências transmitidas em virologia; especialmente à Dra. Ana em Hepatite A e à Dra. Marize por todo o seu conhecimento em virologia ambiental e por orientar os alunos nas questões mais atuais e pertinentes sobre o tema, além de toda a sua contribuição para o desenvolvimento dessa área no país. Agradeço também a compreensão, amizade e ensinamentos para a vida pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Projeto PAPES V (403530/2008-3) pelo financiamento desse projeto. À Vice-presidência de Ambiente, Atenção e Promoção em Saúde pelo incentivo às pesquisas na área de virologia ambiental. Essa tese se encontra inserida no escopo das atividades da Fiocruz como centro colaborador da PAHO/OMS de saúde pública e ambiente.

Aos Drs. Edson Elias da Silva (IOC/FIOCRUZ), Maria Inês Zanoli Sato (CETESB/SP), Silvia Maria Baeta Cavalcanti (UFF/RJ), Caroline Cordeiro Soares (IOC/FIOCRUZ) por terem aceitado o convite para participar como membros examinadores dessa tese. Ao Dr. Edson Elias da Silva por ter sido o revisor da tese.

À Dra. Wilma C. Guilayn (ENSP/FIOCRUZ) pela amizade e carinho de todos esses anos e pela ajuda nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite (IOC/FIOCRUZ) por transmitir seus conhecimentos em virologia, especialmente veiculando textos e informações sempre relevantes para todo o grupo e dos quais muitos constam nessa tese.

À Francisca Alves Pereira dos Santos (Xica), pela pessoa maravilhosa que eu admiro e por todo seu afeto, sempre ajudando, aconselhando e tornando sempre muito boa a convivência de todas as pessoas do laboratório.

A Alexandre Fialho, Eduardo Volotão, Matias Victoria Montero, Tatiana Lundgren Rose, Túlio Machado Fumian e Waldir Lavatori pela ajuda na manipulação de reagentes e soluções, equipamentos, análises de PCR e sequenciamento.

Aos funcionários da CEDAE, por fornecerem as amostras de esgoto, lodo e biossólidos da ETE Alegria – Caju, RJ.

Aos colegas dos Laboratórios de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTVA) e Virologia Comparada e Ambiental (LVCA): Alexandre dos Santos da Silva, Anna Carolina Tinga, Anna Carolina Mendes de Oliveira, Elioneide Ferreira dos Santos, Giorgina Baltazar do Nascimento, Jaqueline Mendes de Oliveira, Júlia Fioretti, Leilane Morais Lopes, Luciane Amado, Fernando López, Gentil Arthur L. de Vanconcellos, Gonzalo Bello, Hugo Garcia, María Eugenia Galeano, Mariela Martínez Gomez, Matias Victoria Montero, Mônica Ferreira, Natália Lanzarine, Nilson Porto, Renata Tourinho, Sabina Victoria Montero, Silvana Portes, Túlio Machado Fumian, Vanessa Salete de Paula, Yasmine Rangel, pelo apoio e bons momentos dentro e fora da Fiocruz.

.

Aos amigos do “Cantão do Catete”: Wendel Antunes Cintra, Marcelo Martins, Rafael de Abreu, Maro Lara Martins, Jaqueline Garcia, Vanuza Braga, Fidel Flores, Ismael Pimentel, por toda a amizade, convivência, histórias, sentimentos compartilhados e momentos inesquecíveis.

Em especial aos meus tios João Silvío do Amaral Prado e Regina Neri por toda a ajuda, amizade, carinho e ensinamentos dos quais levarei para a vida toda. A Renato Prado por tudo que representa para mim. A Edson Tomé, Nadima, Carolina Marques Oliboni, Andréa Provasi Lanzara, Flávia Abud Lanzara, Bruno Abud, Camila Genari pelo apoio e amizade.

Aos meus avós Pacífico Baldon e Anna Migliozi Baldon *in memoriam*.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Virologia ambiental e a importância na vigilância epidemiológica .....	03
1.2. Caracterização e epidemiologia do vírus da hepatite A (HAV) .....	07
1.3. Caracterização e epidemiologia dos vírus causadores de gastroenterite aguda.....	11
1.3.1. Rotavírus A (RVA).....	11
1.3.2. Norovírus (NoV).....	14
1.3.3. Adenovírus (AdV).....	17
1.4. Tecnologias de tratamento de esgotos no Brasil.....	21
1.5. Biossólidos produzidos em Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs).....	24
1.6. Métodos para detecção viral em esgoto, lodo de esgoto e biossólidos.....	32
<b>2. RELEVÂNCIA</b> .....	35
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	37
3.1 Objetivo geral .....	37
3.2 Objetivos específicos .....	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	38
5.1. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants.....	38
5.2. Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil.....	50
5.3. Assessment of enteric viruses in a wastewater treatment plant and comparison of concentration methods for virus recovering. I. Primary sludge.....	56
5.4. Assessment of enteric viruses in a wastewater treatment plant and comparison of concentration methods for virus recovering. II. Biosolids.....	77
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	97
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	112
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	114
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	115
<b>10. ANEXOS</b> .....	128
10.1. Caracterização das Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs).....	128
10.1.1. Sistema de tratamento de esgoto anaeróbio (ETE hospitalar 1).....	128
10.1.2. Sistema de tratamento de esgoto aeróbio (ETE hospitalar 2).....	131
10.1.3. ETE urbana (Alegria - Caju - RJ).....	132
10.1.4. Qualidade do efluente ao longo do tratamento.....	139
10.2. Resultados de PCR convencional para amostras de biossólidos.....	141
10.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	142

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AdV – Adenovírus  
CDC – do inglês: *Centers for Disease Control and Prevention*  
cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar  
CEDAE – Companhia Estadual de Água e Esgoto do Rio de Janeiro  
CG – Cópias de genoma  
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente  
Crio-ME – criomicroscopia eletrônica  
DBO – demanda bioquímica de oxigênio  
dNTP – desoxirribonucleotídeos  
ddNTP – didesoxirribonucleotídeo  
DNA – ácido desoxirribonucléico  
DQO – demanda química de oxigênio  
EDS – do inglês: *Energy dispersive x-ray detector*  
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético  
ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública  
ETE – Estação de tratamento de esgoto  
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz  
G – Genogrupo de NoV  
HAV – Vírus da hepatite A, do inglês “*Hepatitis A Virus*”  
HCl – Ácido clorídrico  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IOC – Instituto Oswaldo Cruz  
kDa – Kilodalton  
log<sub>10</sub> – Logaritmo em base dez  
μL - microlitro  
MEV – Microscopia eletrônica de varredura  
mg/L – Miligrama por litro  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
mL – mililitro  
mM - milimolar  
MS – Ministério da Saúde  
NaOH – hidróxido de sódio  
NLV – *Norwalk-like virus*  
nm – Nanômetro  
nt – Nucleotídeo  
NoV – Norovírus  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
ORF – Fase de leitura aberta, do inglês “*Open Reading Frame*”  
PAGE – Gel de poliacrilamida  
pb – pares de bases  
PCR – Reação em cadeia pela polimerase, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”  
PEG – Polietileno glicol  
pH – Potencial hidrogeniônico  
Primer – Oligonucleotídeo iniciador  
qPCR – PCR quantitativa ou PCR em tempo real (*real-time qPCR*)  
RNA – Ácido ribonucléico  
RNAm – RNA mensageiro

RNase - Ribonuclease  
RpRd – RNA polimerase RNA dependente  
RT-PCR – PCR de transcrição reversa, do inglês “*Reverse Transcription-PCR*”  
RVA – Rotavírus humano  
SG – subgrupo de RVA  
SUS – Sistema Único de Saúde  
UASB – Reator anaeróbio de manta de lodo (do inglês: *Upflow anaerobic sludge blanket*)  
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro  
US EPA – Agência de Proteção Ambiental dos EUA (*Environmental Protection Agency*)  
UTR – Região não traduzida, do inglês “*Untranslated Region*”  
UV – Ultravioleta  
VP1 – Proteína estrutural 1  
VP2 - Proteína estrutural 2  
VP3 - Proteína estrutural 3  
VP4 - Proteína estrutural 4

## LISTA DE FIGURAS

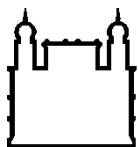
<b>Fig 1.1.1.</b> Mortes por diarreia em crianças menores de 5 anos em decorrência de condições sanitárias precárias .....	04
<b>Fig 1.1.2.</b> Rotas de transmissão de vírus entéricos no ambiente .....	06
<b>Fig 1.2.1.</b> Organização do genoma do HAV, produtos de tradução e regiões usadas para a amplificação .....	08
<b>Fig 1.2.2.</b> Prevalência anti-HAV em várias regiões do mundo .....	10
<b>Fig 1.3.1.1.</b> Distribuição global estimada de mortes relacionadas aos RV .....	11
<b>Fig 1.3.1.2.</b> Eletromicrografia de RV humano .....	12
<b>Fig 1.3.1.3.</b> Estrutura dos RV .....	13
<b>Fig 1.3.2.1.</b> Classificação dos NoV .....	16
<b>Fig 1.3.2.2.</b> Alvos de regiões genômicas de NoV usadas em análises de RT-PCR para detecção e genotipagem .....	17
<b>Fig 1.3.3.1.</b> Estrutura dos AdV .....	18
<b>Fig 1.3.3.2.</b> Mapa transcricional de AdV humano espécie D .....	20
<b>Fig 1.4.1.</b> Evolução percentual das principais variáveis de esgotamento sanitário – Brasil – 2000/2008 .....	21
<b>Fig 1.5.1.</b> Esquema geral do processo de tratamento de esgoto e biossólidos .....	24
<b>Fig 1.5.2.</b> Distribuição de reaproveitamento do lodo de esgoto (%) gerados em processos de tratamento de esgotos .....	26
<b>Fig 1.5.3.</b> Destino ou disposição do lodo de esgoto gerado pelos processos de tratamento de esgotos no Rio de Janeiro – Brasil – 2008 .....	27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.3.3.1.</b> Sítios anatômicos de isolamento de AdV humanos e espécies e sorotipos envolvidos .....	19
---	----

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.4.1.</b> Concentrações virais obtidas por qPCR em esgoto bruto e tratado em processos de lodo ativado no Brasil .....	23
<b>Quadro 1.5.1.</b> Composição química típica do lodo bruto e digerido.....	25
<b>Quadro 1.5.2.</b> Processos de tratamento para reduzir o número de patógenos em lodo de esgoto .....	29
<b>Quadro 1.5.3.</b> Resumo de redução de patógenos em vários processos de tratamento de lodo.....	30
<b>Quadro 1.5.4.</b> Limites de patógenos permitidos em biossólidos de classe A e B (Conama, 375, 2006) .....	31



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

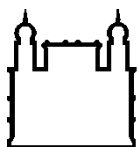
# OCORRÊNCIA DE ROTAVÍRUS, ADENOVÍRUS, NOROVÍRUS E VÍRUS DA HEPATITE A EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO NO RIO DE JANEIRO E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE RECUPERAÇÃO VIRAL EM LODO DE ESGOTO

Tatiana Prado

### RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a presença de rotavírus (RVA), adenovírus (AdV), norovírus (NoV) e vírus da hepatite A (HAV) em amostras ambientais (esgoto e lodo de esgoto primário e tratado) geradas e obtidas em diferentes Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) da cidade do Rio de Janeiro pela detecção, quantificação e caracterização molecular, assim como determinar a eficiência de diferentes metodologias de recuperação viral em lodo de esgoto. A concentração destes vírus foi determinada em ETEs hospitalares que operam por processos anaeróbios (reator UASB e filtros anaeróbios) e aeróbio (lodo ativado de aeração prolongada) e em uma ETE urbana de grande porte (Alegria, Caju) que utiliza processo de lodo ativado convencional. Os resultados demonstraram que os efluentes hospitalares são contaminados com elevadas cargas virais, especialmente RVA, apontando para o risco da disseminação ambiental quando processos de tratamento biológicos convencionais (aeróbios e anaeróbios) não são adequados para a remoção viral. Uma grande variabilidade de genótipos virais foi encontrada nos efluentes hospitalares, particularmente para AdV, para os quais foram detectadas espécies C e D, comumente envolvidas em casos de infecções respiratórias e conjuntivite nosocomial. Apenas genótipo GII.4 de NoV foi detectado nos efluentes hospitalares, confirmando a prevalência desse genótipo no Brasil. No estudo que avaliou a detecção de HAV nas águas residuárias urbanas foi constatado que 58% das amostras de esgoto bruto foram positivas para HAV e as cargas de genomas virais não foram detectadas nos efluentes tratados do processo de lodo ativado convencional. A análise filogenética baseada na região do genoma VP1/2A de HAV detectados em 2009-2010 demonstrou a prevalência do subgenótipo IA e os isolados apresentaram maior identidade de nucleotídeos com isolados de HAV do Brasil e Argentina. A detecção viral obtida em diversas etapas da ETE de grande porte demonstrou a predominância de RVA e AdV e o sistema de lodo ativado convencional reduziu as cargas de genomas virais em 1 – 1,5 unidades  $\log_{10}$  no efluente final tratado. A análise da eficiência dos métodos de detecção viral em lodo de esgoto demonstrou que a presença de inibidores nas amostras afeta o desempenho da amplificação de ácidos nucleicos e o uso do controle interno (bacteriófago PP7) pode ser adequado para monitorar as etapas de detecção viral. O método baseado na eluição utilizando extrato de carne foi o mais viável para recuperar os vírus pesquisados, sobretudo AdV em lodo de esgoto. Os AdV foram predominantes nas amostras de lodo de esgoto tratado e, portanto, poderiam ser considerados bons indicadores para a presença de vírus de disseminação entérica nesses resíduos. Esse é o primeiro estudo demonstrando a ocorrência de RVA e NoV GII em lodo de esgoto digerido anaerobicamente no Brasil, e espera-se que esse trabalho contribua para expandir essa linha de investigação, incluindo a análise de biossólidos produzidos por outros processos de estabilização.

**Palavras-chaves:** vírus de disseminação entérica, estações de tratamento de esgotos, águas residuárias, lodo de esgoto, metodologias de concentração viral.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## **ROTAVIRUS, ADENOVIRUS, NOROVIRUS AND HEPATITIS A VIRUS OCCURRENCE IN WASTEWATER TREATMENT PLANTS IN RIO DE JANEIRO AND EVALUATION OF VIRUS RECOVERY METHODS IN SEWAGE SLUDGE**

Tatiana Prado

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the presence of rotavirus (RVA), adenovirus (AdV), norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV) in environmental samples (sewage and primary and treated sewage sludge) produced in different wastewater treatment plants (WWTPs) in Rio de Janeiro city through the detection, quantification and molecular characterization, as well as, determining the efficiency of different viral recovery methods in sewage sludge. Viral concentrations were determined in hospital WWTPs that operates by anaerobic processes (UASB reactor and anaerobic filters) and aerobic (activated sludge process with prolonged aeration) and in a great urban WWTP (Alegria, Caju) that operates by conventional activated sludge process. The results demonstrate that hospital wastewaters and treated effluents by anaerobic and aerobic processes are contaminated with high viral loads, especially RV-A, pointing environmental dissemination risks when conventional biological treatment processes are not suitable for virus removal. A great variability of viral genotypes was found, mainly for AdV, which species C and D involved in respiratory infectious diseases and nosocomial keratoconjunctivites cases were detected. Only NoV GII.4 was obtained in hospital wastewaters, confirming the prevalence of this genotype in Brazil. In the study that evaluated HAV detection in urban wastewaters was demonstrated that 58% of the raw sewage samples were positive for HAV and the viral genome loads were not detected in the treated effluents from activated sludge process. Phylogenetic analysis based on VP1/2A genome region of HAV detected in 2009-2010 demonstrated the prevalence of subgenotype IA and the isolates showed higher nucleotide identity with HAV isolates from Brazil and Argentina. Virus detection determined in distinct stages of the conventional activated sludge process demonstrated the predominance of RVA and AdV and viral genome loads were reduced in  $1 - 1,5 \log_{10}$  units in the treated effluent. Analysis of the virus recovery methods efficiency in sewage sludge demonstrated that the presence of inhibitors affect the performance of the nucleic acid amplification reactions and the use of an internal control (PP7 bacteriophage) can be suitable to monitoring viral detection stages. The method based on beef extract elution was more viable for recovering viruses, mainly AdV in sewage sludge. Adenoviruses are predominant in these samples and, therefore, could be considered good indicators to evaluate the viral contamination in these residues. This is the first Brazilian report on the occurrence of RV-A and NoV GII in sewage sludge treated by anaerobic digestion and is expected that the present study contributes for the investigation of the enterically disseminated viruses in biosolids treated by other stabilization processes.

**Key-words:** enterically disseminated viruses, wastewater treatment plants, wastewaters, sewage sludge, viral concentration methods.

## 1. INTRODUÇÃO

---

Os primeiros estudos em virologia ambiental foram realizados a partir de 1940 através da detecção dos poliovírus em ambientes aquáticos (Metcalf et al. 1995). Em anos posteriores, os poliovírus continuaram sendo os principais agentes virais entéricos pesquisados em matrizes ambientais, principalmente devido ao desenvolvimento de culturas celulares (Fong e Lipp, 2005).

Nas décadas de 1960 e 1970 as pesquisas em virologia ambiental avançaram significativamente através do aperfeiçoamento de métodos para a concentração de vírus da hepatite A (HAV) em água; dos avanços nas pesquisas soropidemiológicas de surtos de gastroenterite não bacterianas demonstrando a importância dos calicivírus (particularmente dos norovírus - NoV) e do rotavírus humano (RVA) na diarreia infantil (Wilhelmi et al. 2003) e do reconhecimento de que muitos surtos de hepatite e gastroenterite poderiam ser provocados pela transmissão de vírus entéricos no ambiente (Metcalf et al. 1995).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, notadamente da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) na década de 1980, uma nova era em virologia ambiental teve início. O desenvolvimento das técnicas moleculares permitiram ampliar a análise para a detecção de uma variedade de grupos virais, principalmente para vírus fastidiosos ou para grupos de vírus para os quais ainda não existem métodos de cultura celulares adaptados para a replicação viral, como é o caso dos norovírus humanos (Wilhelmi et al. 2003; Tan e Jiang, 2007).

Nos últimos anos a linha de pesquisa em virologia ambiental tem se intensificado no Brasil com o desenvolvimento de estudos demonstrando a presença de vírus de disseminação entérica em água, esgotos e águas superficiais poluídas (Villar et al. 2006, 2007., De Paula et al. 2007., Barrella, 2008, Barrella et al. 2009; Miagostovich et al. 2008., Ferreira et al. 2009; Garrafa, 2009; Victoria et al. 2009, 2010., Fumian et al. 2010, 2011., Rigotto et al. 2010., Schilindwein et al. 2010). A ocorrência desses vírus nos ecossistemas aquáticos tem sido relacionada à falta de serviços de esgotamento sanitário adequado (De Paula et al. 2007; Miagostovich et al. 2008).



A expansão dos sistemas de esgotamento e a qualidade dos serviços prestados, particularmente o bom desempenho das estações de tratamento de esgotos (ETEs) em remover poluentes, são importantes para assegurar uma boa qualidade dos efluentes tratados e minimizar impactos ambientais e riscos de saúde pública. No entanto, Oliveira e Von Sperling (2008) têm demonstrado que muitas ETEs que operam no país apresentam níveis de desempenho aquém do esperado para a remoção de matéria orgânica e bactérias do grupo dos coliformes.

Entretanto, o uso de indicadores microbianos tradicionais, tais como os coliformes, não é adequado para prever os níveis de contaminação e resistência viral aos processos de tratamento de água e esgoto (Tyrrell et al. 1995; Baggi et al. 2001). É necessário obter informações acerca do desempenho desses sistemas na remoção viral, validar os processos de tratamento e subsidiar estratégias adequadas para o gerenciamento de esgotos.

Um dos maiores problemas operacionais no controle de ETEs se refere ao gerenciamento adequado dos resíduos sólidos (lodo de esgoto) produzidos como consequência do processo de tratamento. Esses resíduos necessitam de tratamento adequado para a redução dos níveis de contaminantes, incluindo microorganismos patogênicos.

Embora alguns métodos venham sendo utilizados para detectar vírus de disseminação entérica em lodo de esgoto ou biossólidos, ainda não foi estabelecido um método padronizado, simplificado e que apresente uma boa eficiência para recuperar grupos virais distintos (Straub e Chandler, 2003; Sidhu e Toze, 2009; Girones et al. 2010; Jofre e Blanch, 2010).

O desempenho dos métodos utilizados para a detecção viral no ambiente varia conforme o tipo de amostra analisada. Os limites de detecção desses métodos frequentemente não são demonstrados e, em muitos casos, existe a necessidade de utilizar controles internos para monitorar as diferentes etapas do processo de detecção viral. Esses procedimentos poderiam evitar a obtenção de resultados falso-negativos, garantindo uma análise mais confiável de risco à saúde pública.

Os trabalhos desenvolvidos nessa tese têm como objetivo ampliar os conhecimentos acerca de algumas questões referidas anteriormente. Os avanços e desafios pertinentes ao tema serão apresentados ao longo da revisão e discussão dos trabalhos produzidos.

---

## 1.1. VIROLOGIA AMBIENTAL E A IMPORTÂNCIA NA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

---

*“Em vez de nos referirmos às “doenças negligenciadas” deveríamos usar, o que seria mais correto, “doenças de populações negligenciadas”... “Negligenciamento”, neste caso, não é só a falta de instrumentos, ferramentas para a saúde pública no combate às doenças, mas também se refere ao acesso da população aos postos, aos agentes de saúde e **ao saneamento básico**. “As doenças negligenciadas são causa e consequência da pobreza. “Temos que ter disponibilidade de novas ferramentas, novas estratégias com ênfase na atenção primária e melhorias nos serviços de saúde.*

*“Isso é parte de uma agenda na saúde pública que não foi concluída no país. Ainda estamos atrasados. Necessitamos de estratégias especiais e ênfase no nível local, com decisões baseadas em evidências, necessidade de informação adequada para a população, integração com a atenção primária (ESF), intervenções interprogramáticas, como ter acesso a água potável, a **condições básicas de higiene nas comunidades do país**”.*

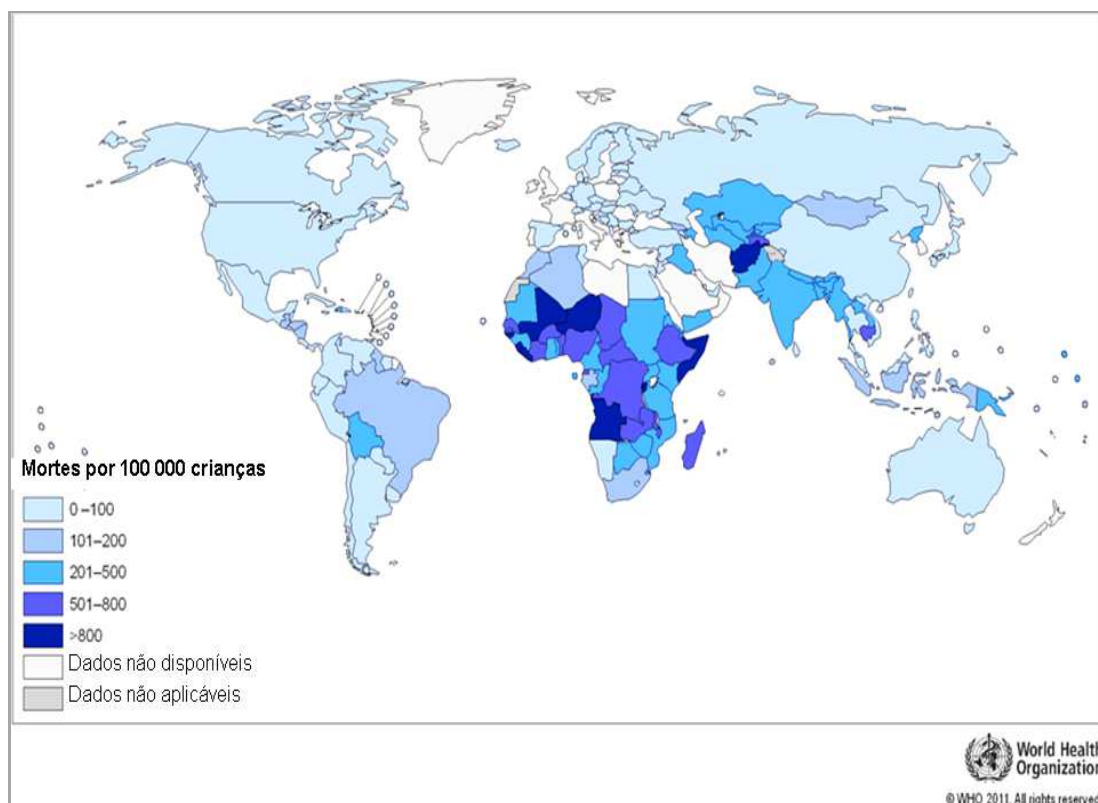
*(In: segunda sessão da Plenária do V Encontro do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) realizada em 21/06/2011 por Jarbas Barbosa – secretário de Vigilância em Saúde - MS).*

A prevenção de surtos ou epidemias associadas às doenças infecciosas de transmissão hídrica teve início nos países que primeiramente sofreram o intenso processo de urbanização e industrialização (Lofrano e Brown, 2010). No Brasil, a preocupação com a saúde ambiental teve seu apogeu com o movimento de Reforma Sanitária, que teve início nas décadas de 1960 e 1970 e cujos desdobramentos culminaram na criação do Sistema Único de Saúde (SUS) em 1990, o qual se estrutura sobre a integralidade do modelo de atenção à saúde (Lima et al. 2005; Paim, 2008), incluindo a saúde ambiental como um dos determinantes do processo saúde-doença.

As doenças infecciosas de transmissão hídrica, notadamente as doenças diarréicas e as hepatites virais, ainda representam um sério problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 1,5 milhões de mortes por ano sejam provocadas por doenças diarréicas, afetando principalmente crianças dos países em desenvolvimento (OMS, 2009) (Figura 1.1.1).

As causas das infecções são atribuídas em muitos casos aos fatores ambientais como água contaminada com esgoto e às precárias condições sanitárias e de higiene da população (Bosch et al. 2008; Okoh et al. 2010). A OMS também estimou que os fatores ambientais são

responsáveis por 19% sobre a carga total de doenças que afetam o Brasil, sendo que as condições ambientais podem ser responsáveis por 5.4% do acometimento por doenças diarréicas (OMS – *Country profile of environmental burden of disease*, 2011. Disponível online: [http://www.who.int/quantifying\\_ehimpacts/national/countryprofile/brazil.pdf](http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/national/countryprofile/brazil.pdf) ).



**Fig 1.1.1.** Mortes por diarreia em crianças menores de 5 anos em decorrência de condições sanitárias precárias - 2004

**Fonte.** OMS, *Environment and Health*. 2011. Disponível online: [http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_wsh\\_daly\\_2004.png](http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_wsh_daly_2004.png)

Embora as taxas de mortalidade por doenças diarréicas venham diminuindo progressivamente no Brasil devido à melhoria das condições sanitárias e sócio-econômicas da população; a taxa de morte em 100 000 habitantes é cerca de 3%, com taxas mais elevadas nas regiões norte e nordeste (Lista de Morbidade, CID 10 - DATASUS, MS, 2011). Também deve se levar em consideração que esses dados se referem aos casos devidamente diagnosticados e notificados; casos subnotificados poderiam camuflar dados mais realísticos, sobretudo para localidades que carecem de serviços básicos de saúde.

A prevenção da ocorrência das doenças diarréicas poderia reduzir as demandas de atendimento e internações no SUS. O número total de internações hospitalares no SUS somente por doença diarréica aguda em 2010 foi de aproximadamente 250.000 internações (DATASUS, MS, 2011. Lista Morb. CID-10: diarréia e gastroenterite de origem infecciosa presumível).

Fatores de riscos associados à epidemiologia das doenças infecciosas são agravados pelas precárias condições sanitárias, sócio-econômicas, de moradia e higiene das populações.

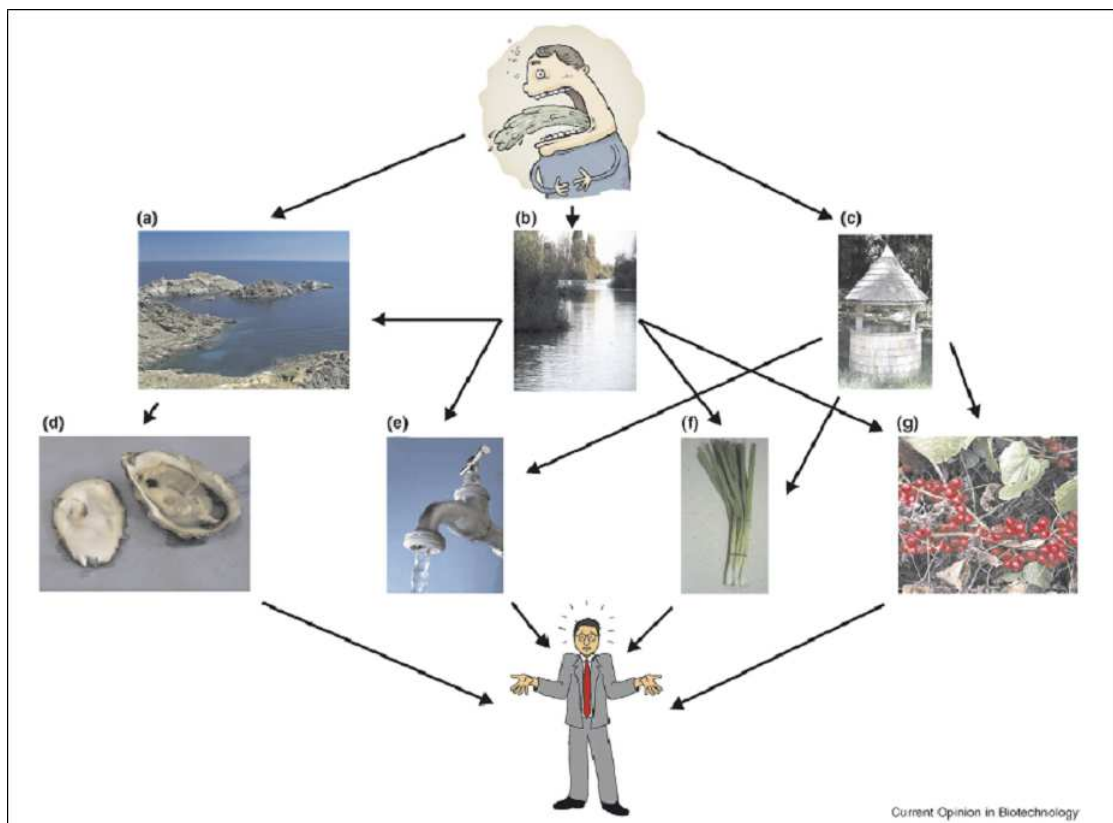
A falta dos serviços de esgotamento sanitário contribui para agravar os níveis de degradação dos corpos hídricos e a disseminação de microrganismos patogênicos no ambiente, sobretudo vírus de disseminação entérica.

Pacientes com gastroenterites ou hepatites virais podem excretar ao redor de  $10^5$  a  $10^{13}$  partículas de vírus por grama de fezes (Fong e Lipp, 2005; Bosch et al. 2008; Okoh et al. 2010), e, portanto, esses patógenos estão presentes em altas concentrações nas águas residuárias ou em águas superficiais poluídas (Ashbolt, 2004; Fong e Lipp, 2005; Bosch et al. 2008; Girones et al. 2010; Jofre e Blanch, 2010).

As partículas virais são altamente resistentes às condições desfavoráveis do meio ambiente (Rzezutka e Cook, 2004), o que contribui para a grande disseminação, potencializando os riscos de transmissão.

A distribuição e a prevalência desses patógenos, entretanto, são variáveis entre as diversas regiões do mundo porque dependem do perfil epidemiológico da comunidade, das condições geográficas, incluindo padrões de sazonalidade, das condições sócio-econômicas e ambientais específicas.

Os vírus de disseminação entérica podem ser transmitidos por contato pessoa-a-pessoa, fômites, alimentos contaminados e, quando estão presentes no ambiente aquático eles podem ser transmitidos pelo consumo de água contaminada, pelo contato com águas de recreação ou pelo contato com a pele e inalação (Wyn-Jones e Sellwood, 2001). A figura 1.1.2 apresenta as principais rotas de transmissão dos agentes virais entéricos quando presentes no ambiente.



**Rotas de transmissão de vírus entéricos.** Vírus são excretados em altos números nas fezes e vômitos de indivíduos infectados e alcançam as águas residuárias. Desde que processos de tratamento de esgoto atuais não são capazes de eliminar os vírus no efluente tratado, esses patógenos contaminam diversos ambientes aquáticos: marinho (a); rios (b); águas subterrâneas (c). Os vírus presentes nesses ambientes podem contaminar mariscos cultivados em águas poluídas (d), a água potável (e) e alimentos cultivados em terras irrigadas com efluente de ETEs e/ou fertilizadas com lodo de esgoto (f) e (g).

**Fig 1.1.2.** Rotas de transmissão de vírus entéricos no ambiente

**Fonte.** Bosch et al. 2008.

Os vírus de disseminação entérica são relacionados a diversos surtos de veiculação hídrica. Os NoV seriam os principais agentes virais entéricos responsáveis pelos surtos de veiculação hídrica no mundo, seguidos pelos AdV, Echovirus e HAV (Sinclair et al. 2009).

No Brasil, dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde (MS), mostraram que de 1999 a 2008 foram notificados 343 surtos de doenças infecciosas provocadas pela transmissão hídrica (MS - COVEH/CGDT/DEVEP/SVS/MS, atualizado em 14.07.2008). Quanto à identificação do agente etiológico, os vírus da hepatite A, rotavírus e norovírus foram os responsáveis pela maioria dos casos notificados de surtos de veiculação

hídrica (54 surtos) seguidos por surtos de origem bacteriana (52 surtos). Aproximadamente 45% dos surtos de veiculação hídrica não foram identificados, demonstrando que o papel da vigilância epidemiológica no esclarecimento desses surtos deve ser reforçado.

Em 2005, o papel da Política Nacional de Saúde Ambiental foi redefinido e algumas linhas de atuação foram propostas: (1) a estruturação e o fortalecimento da Vigilância em Saúde Ambiental; (2) a construção de agendas intersetoriais integradas; (3) o fomento à promoção de ambientes saudáveis; (4) o estímulo à produção de conhecimento e desenvolvimento de capacidades em saúde ambiental; e (5) a construção de um Sistema de Informação Integrado em Saúde Ambiental (Conselho Nacional de Saúde, MS, 2007. *In*: Subsídios para a construção da Política Nacional de Saúde Ambiental).

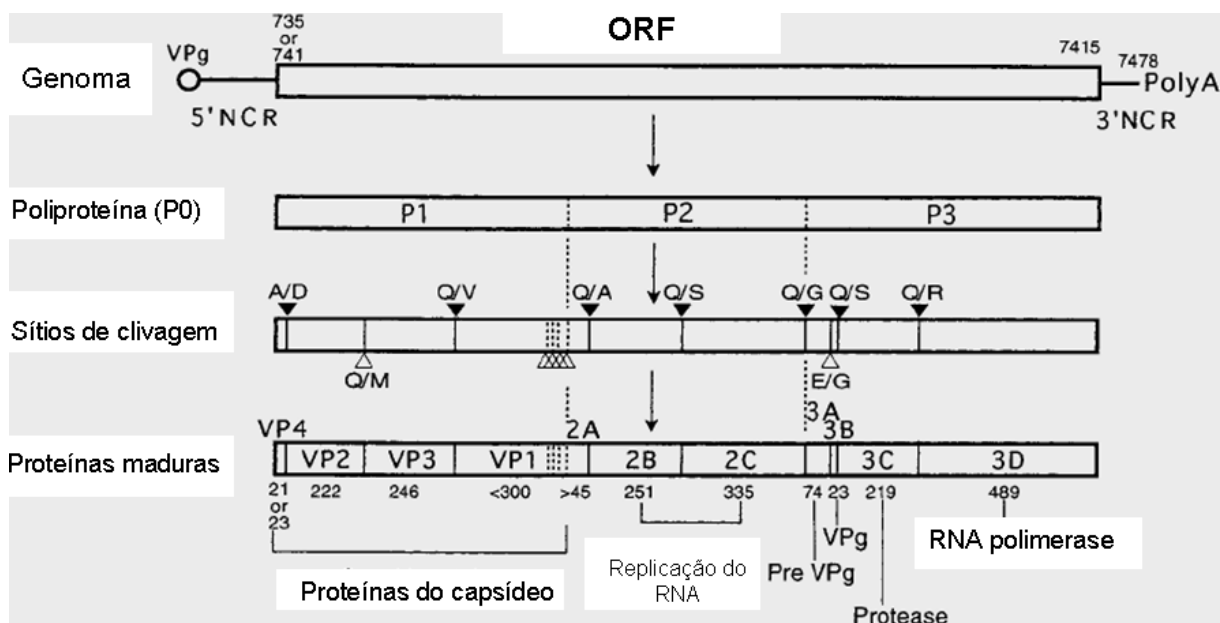
Nesse novo contexto, a ampliação e a avaliação da qualidade dos serviços de saneamento básico constituem medidas preventivas importantes em saúde pública e serão discutidos com maiores detalhes nos itens 1.4 e 1.5 da tese. As principais características e a epidemiologia dos vírus de disseminação entérica que são foco de análise desse estudo serão resumidas nos tópicos seguintes.

---

## **1.2. CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS DA HEPATITE A (HAV)**

---

O HAV pertence à família *Picornaviridae* do gênero *Hepatovirus* (Totsuka e Moritsugu, 1999). Esse vírus é uma partícula icosaédrica, não envelopada, com 27 a 32 nm de diâmetro (Robertson et al. 1992; Wasley et al. 2006). O genoma é constituído de RNA de fita simples, polaridade positiva, contendo 7,5 kb contendo uma simples região de leitura aberta (*open reading frame* – ORF) que codifica uma simples poliproteína de 2225 a 2227 aminoácidos, com 3 regiões distintas (P1, P2 e P3) (Nainan et al. 2006). Esta poliproteína é posteriormente clivada através de uma protease viral (3Cpro), resultando na produção de 4 proteínas estruturais que compõem o capsídeo (VP4, VP2, VP3 e VP1) e várias proteínas não estruturais (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D) (Figura 1.2.1).



**Fig 1.2.1.** Organização do genoma do HAV, produtos de tradução e clivagem da poliproteína (HAV HM 175).

**Fonte.** Totsuka e Moritsugu, 1999. Adaptado.

O segmento de 168 nucleotídeos (nt) na região do genoma da VP1/2A é usado para a classificação dos genótipos de HAV, desde que essa área tem relativamente alta variabilidade na sequência de nt e aminoácidos (Robertson et al. 1992; Totsuka e Moritsugu, 1999).

São reconhecidos 7 genótipos diferentes de HAV, incluindo 4 genótipos que infectam humanos (I, II, III e VII) e 3 genótipos que infectam símios (IV, V e VI) e 6 subgenótipos (IA, IB, IIA, IIB, IIIA e IIIB) (Robertson et al. 1992; Carrilho et al. 2005), sendo que cerca de 80% dos HAV isolados de humanos pertencem ao genótipo I, subdividido em 2 subgenótipos: IA e IB (De Paula et al. 2004).

O HAV se replica nos hepatócitos, é excretado na bile e liberado nas fezes (Wasley et al. 2006). A doença causada pela infecção com o HAV tem um período tipicamente abrupto que pode incluir febre, anorexia, náusea, desconforto abdominal, urina escura e icterícia. Crianças com até 6 anos de idade são frequentemente assintomáticas e crianças mais velhas e adultos são geralmente sintomáticos, com icterícia ocorrendo em mais de 70% dos casos (Wasley et al. 2006; Martinelli et al. 2010). A infecção e a vacinação geralmente conferem imunidade prolongada contra a re-infecção (Jacobsen e Koopman, 2004).

Aproximadamente 1,4 milhões de novas infecções causadas por HAV são estimadas por ocorrer no mundo a cada ano (OMS, 2011. Disponível online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/en/index.html>).

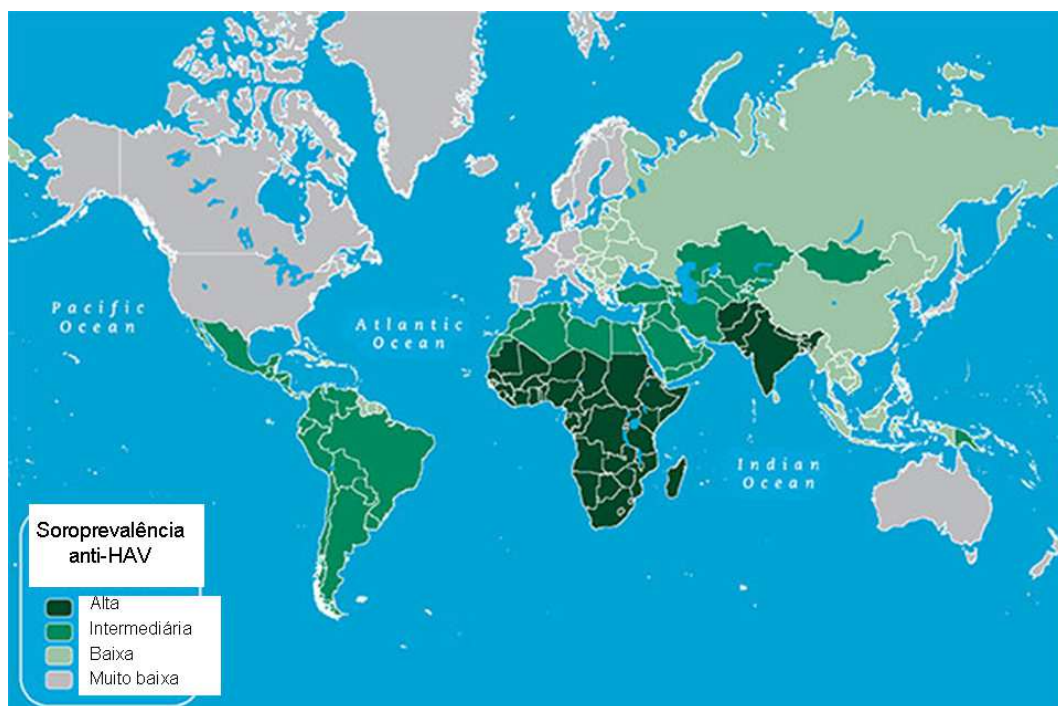
A taxa de infecção é correlacionada com o acesso ao saneamento básico e com indicadores sócio-econômicos, sendo que a doença é endêmica nos países em desenvolvimento (Jacobsen e Koopman, 2005; Wasley et al. 2006; Braga et al. 2008).

Embora um progressivo declínio das taxas de mortalidade por infecção do HAV venha sendo observado no Brasil (0.2 / 100 000 habitantes em 1980 para 0.02 / 100 000 habitantes em 2002) (Vital et al. 1998; 2006); de 2007 a 2011, 44.649 casos de hepatite viral aguda tipo A foram notificados no Brasil, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN – Net) (MS/SVS, 2011).

A maioria dos países Latino-Americanos tem altos níveis de soroprevalência anti-HAV em crianças e adultos, mas as taxas médias têm diminuído nos últimos 20 anos. No Brasil de 1977 a 1996-1997, a taxa de soroprevalência anti-HAV diminuiu de 98.4% para 64.7%, respectivamente (Jacobsen e Koopman, 2004).

A queda da soroprevalência reflete uma mudança no padrão epidemiológico da doença no Brasil como consequência do crescimento sócio-econômico e do acesso aos serviços de saneamento básico. O Brasil apresenta taxas intermediárias de soroprevalência anti-HAV (Figura 1.2.2), o que acarreta um maior número de indivíduos susceptíveis à doença na fase adulta.





**Fig 1.2.2.** Soroprevalência (anti-HAV IgG) por região do mundo (1990 – 2005)

**Fonte.** CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), 2011. (disponível online: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-a.htm>).

As epidemias não são comuns em áreas altamente endêmicas porque a maioria dos adultos adquiriu imunidade precocemente, mas em regiões com menores níveis de imunidade dos adultos, surtos da infecção são recorrentes (Jacobsen e Koopman, 2005).

Por causa da severidade da doença ser pronunciada com o aumento da idade, países contendo populações com altas proporções de adultos susceptíveis deveriam considerar programas de vacinação direcionados às populações de maior risco (Jacobsen e Koopman, 2004). A eficácia da vacina para reduzir as taxas de infecção pelo HAV tem sido demonstrada em alguns estudos (Wasley et al. 2006., Martinelli et al. 2010). Além da vacinação, a melhoria no acesso aos serviços de saneamento básico poderia contribuir para diminuir os riscos de transmissão do HAV, particularmente em regiões que ainda são altamente endêmicas.

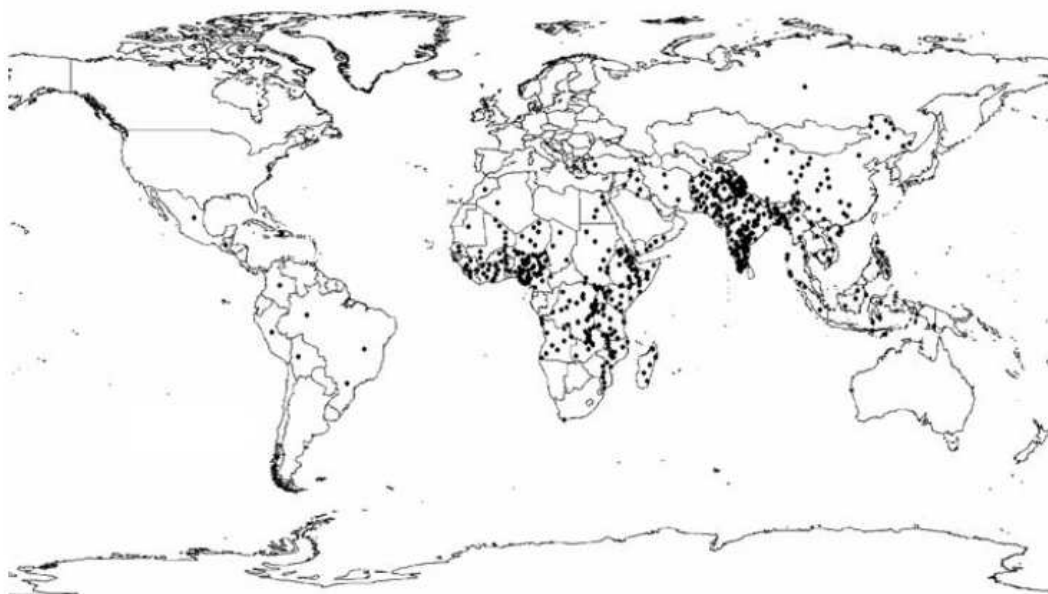
---

### 1.3. CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DOS VÍRUS CAUSADORES DE GASTROENTERITE AGUDA

---

#### 1.3.1. Rotavírus (RV)

Os rotavírus da espécie A (RVA) são os principais agentes responsáveis pelas gastroenterites que acometem crianças menores de 5 anos de idade em várias regiões do mundo (Linhares et al. 2011; Giordano et al. 2011; Guarino et al. 2008). Globalmente, os RV causam mais de 500 000 mil mortes a cada ano, principalmente nos países em desenvolvimento (Figura 1.3.1.1) (Parashar et al. 2006). Nos países da América Latina e Caribe existem aproximadamente 10 milhões de casos, 2 milhões de visitas clínicas, 75 000 hospitalizações e 15 000 mortes anualmente causadas por gastroenterites associadas aos RV (Linhares et al. 2011).



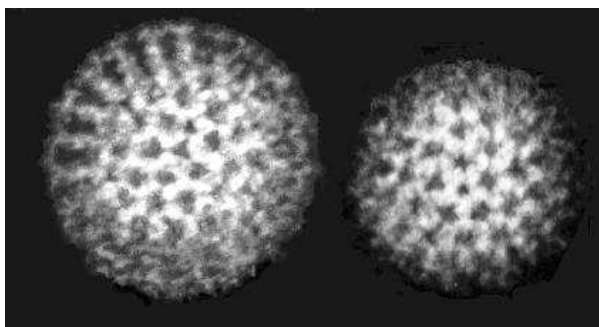
**Fig 1.3.1.1.** Distribuição global estimada de mortes relacionadas ao RV.

Cada ponto representa 1000 mortes relacionadas aos RV.

**Fonte.** Parashar et al. 2006.

Os Rotavirus pertencem ao gênero *Rotavirus* e são classificados na família *Reoviridae* (Linhares et al. 2011). Esses vírus possuem simetria icosaédrica, não são envelopados e possuem cerca de 70 nm de diâmetro. Quando observados em microscopia eletrônica (ME) eles apresentam um formato de “roda” (Figura 1.3.1.2).

O gênero *Rotavirus* inclui pelo menos 7 grupos (A-G) que podem ser distinguidos com base nas suas relações antigênicas e nos padrões de migração dos segmentos de RNAdf através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

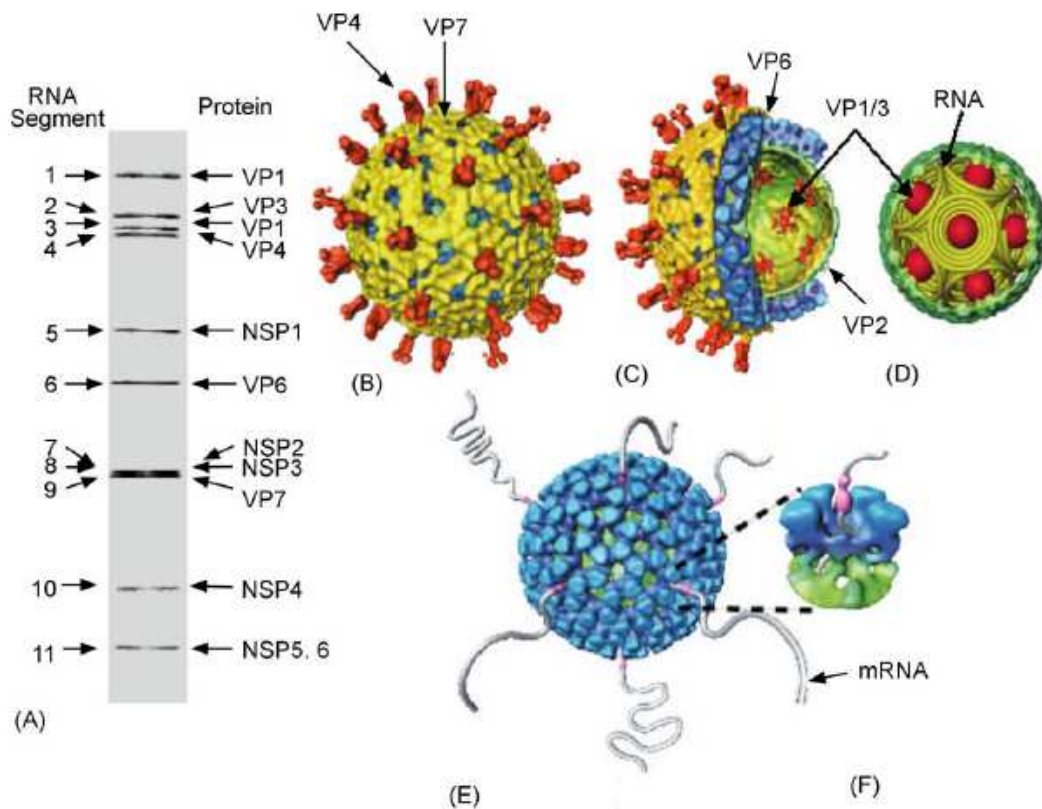


**Fig 1.3.1.2.** Micrografia eletrônica de RV humano

**Fonte.** ICTVdb. Disponível online :

(<http://ictvdb.bio-mirror.cn/Images/Safrica/rotaboth.htm>)

O genoma dos RV consiste de 11 segmentos de RNA dupla fita (df) que codificam 6 proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) e 6 proteínas não estruturais (NSP1 – NSP6). Com a exceção do segmento 11 o qual codifica 2 proteínas (NSP5 e NSP6), os segmentos do genoma são monocistrônicos. O genoma é circundado em uma partícula de camada tripla: camada interna consistindo da VP2 que cobre o genoma e 2 proteínas estruturais menores, VP1 e VP3, as quais formam o core. A camada do meio consiste da VP6 circundando o core, formando uma partícula de camada dupla e a camada externa que consiste da VP7 e projeções tipo espículas de VP4, formando a tricamada capsídica ou vírion infeccioso (Figura 1.3.1.3.).



**Fig 1.3.1.3.** Estrutura dos RV. (A) PAGE mostrando os 11 segmentos do genoma. Os segmentos são numerados à esquerda e as proteínas que eles codificam à direita. (B) Crio-ME demonstrando o triplo capsídeo. As proteínas VP4 são coloridas em laranja e a camada de VP7 em amarelo. (C) Corte do triplo capsídeo mostrando a VP6 em azul e a VP2 em verde e as enzimas transcricionais (vermelho) ancoradas na camada da VP2. (D) Esquema da organização do genoma de RV. Os segmentos do genoma estão representados como espirais cônicas invertidas circundando as enzimas transcricionais. (E e F) modelo em Crio-ME mostrando a dupla camada. A transcrição endógena resulta na liberação simultânea do RNAm transcrito dos canais localizados no vértice de 5 pontas da dupla camada do duplo capsídeo.

**Fonte.** Jayaram et al. 2004.

Historicamente a VP6 foi a primeira proteína de RV usada para a classificação. A VP6 apresenta diferentes epítomos os quais permitem diferenciar diferentes especificidades de subgrupos (SG) do grupo de RVA: SGI, SGII, SGI + II ou SG não I - não II, que são distinguidas de acordo com a reatividade com 2 anticorpos monoclonais (MABs) (Iturriza-Gomara et al. 2002; Thongprachum et al. 2009).

Em 1989 um sistema de classificação binário foi adotado. Os RV são classificados em sorotipos ou genótipos G (Glicoproteína) e sorotipos ou genótipos P (sensível à protease), definidos por análises sorológicas através da reação com anticorpos monoclonais ou de

acordo com a diversidade de sequências de genes relevantes da VP7 e VP4, respectivamente (Linhares et al. 2011). Até o momento, 19 genótipos G e 27 genótipos P têm sido descritos (Leite et al. 2008). Muitas combinações G/P são possíveis dentro do sistema binário utilizado para caracterizar os genótipos de RVA, entretanto, combinações de G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] são os genótipos mais comumente identificados ao redor do mundo (Leite et al. 2008).

Atualmente, um sistema de classificação compreendendo todos os 11 segmentos dos genes de RV tem sido recomendado (Matthijnsens et al. 2011). Este sistema fornece uma abordagem mais acurada para analisar relações evolucionárias interespecíes de RV e eventos de *reassortments* (reestruturação) de genes de RV.

Em março de 2006 uma vacina de RVA atenuado G1P[8] (Rotarix<sup>®</sup>–GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium) foi introduzida no calendário nacional de imunizações e o Brasil foi o primeiro país Latino-Americano a adotar esse programa de vacinação nacional (O’Ryan et al. 2011). Em 2008, a cobertura da vacinação foi de 89.9% (1<sup>a</sup> dose) e de 76.4% (2<sup>a</sup> dose) (Leite et al. 2008).

Os efeitos positivos da vacinação sobre a redução das taxas de morbidade e mortalidade no Brasil têm sido observados (CDC, MMWR, 2011a; O’Ryan et al. 2011). Entretanto, alguns estudos apontam para a complexidade dos padrões de evolução de RVA após o período de pós-vacinação, no qual alguns genótipos de RVA estariam emergindo ou re-emergindo (Gurgel et al. 2007, 2008; Nakagomi et al. 2008). O monitoramento constante de RVA selvagem ou de origem vacinal em amostras clínicas e ambientais é de suma importância no contexto atual (Leite et al. 2008., Fumian et al. 2011., Linhares et al. 2011).

### **1.3.2. *Norovírus (NoV)***

O NoV foi identificado primeiramente como a causa de um surto de gastroenterite em Norwalk, Ohio, em 1968 (Kapikian et al. 1972).

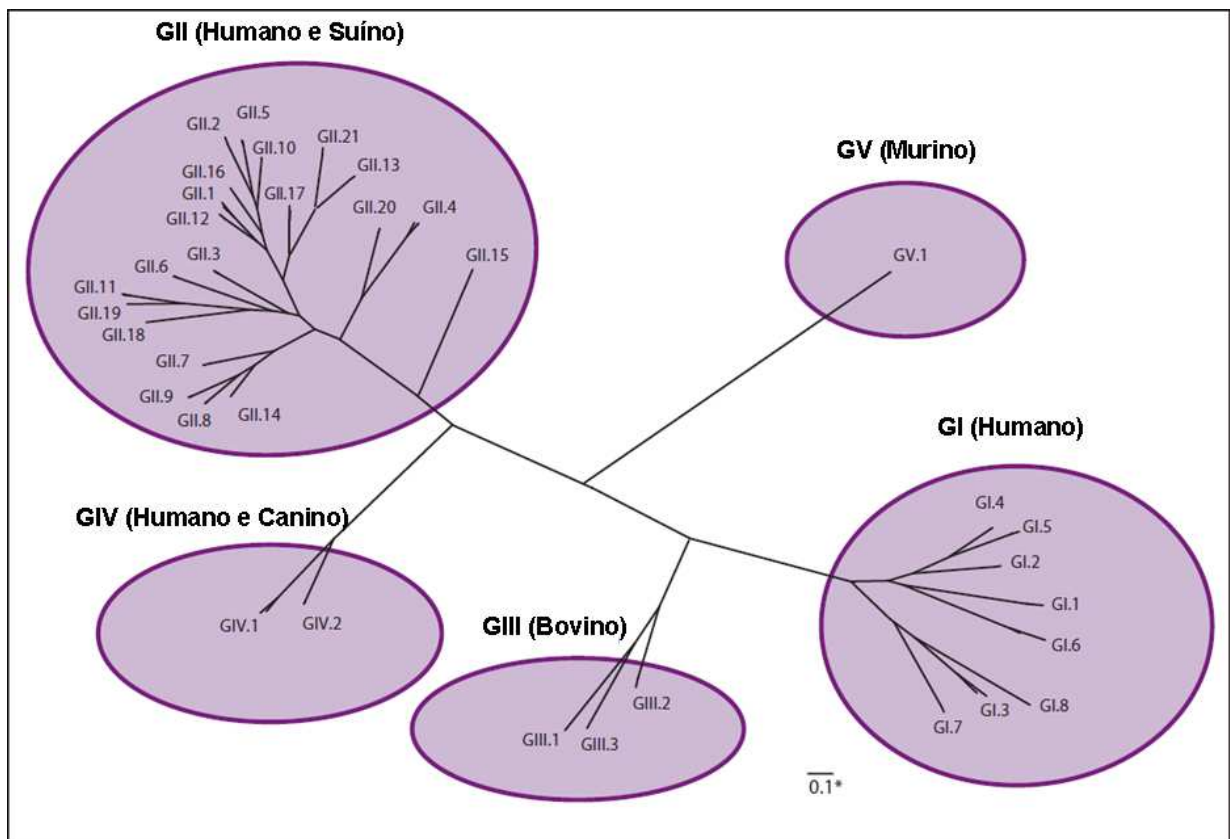
Diferentemente dos RVA, que afetam principalmente crianças menores de 5 anos de idade, os NoV causam gastroenterite aguda em pessoas de todas as idades. Esses agentes virais são reconhecidamente os principais responsáveis por surtos geralmente ocorrendo em

locais fechados (escolas, creches, hospitais, restaurantes, navios) e são transmitidos principalmente pela ingestão de água ou alimentos contaminados (Patel et al. 2008).

A doença tipicamente inicia após um período de incubação de 12 – 48 horas e é caracterizada por um início agudo, diarreia sem sangue, vômitos, náusea e cólicas abdominais. Algumas pessoas podem apresentar somente vomito ou diarreia. Febre baixa e dores no corpo também podem estar associadas com a infecção. Aproximadamente 10% das pessoas acometidas com gastroenterite causada por NoV requer atenção médica, podendo incluir até 5 dias de hospitalização (Ribeiro et al. 2008).

Os norovirus (NoV) são vírus com genoma de RNA de fita simples, não envelopado, classificado dentro do gênero *Norovirus* (previamente referido como *Norwalk-like viruses* – NLVs), da família *Caliciviridae* (Knipe et al. 2001). Outros gêneros dentro da família *Caliciviridae* incluem os *Sapovirus*, os quais também provocam gastroenterite aguda em humanos, bem como *Lagovirus* e *Vesivirus*, os quais infectam animais (Chen et al. 2004).

Os NoV podem ser divididos em 5 genogrupos, designados GI a GV, baseado sobre a identidade de aminoácidos da maior proteína estrutural (VP1) (Figura 1.3.2.1). As espécies que infectam humanos pertencem ao genogrupo GI, GII e GIV, enquanto espécies que infectam animais pertencem ao GIII e GV, respectivamente.



**Fig 1.3.2.1.** Classificação dos NoV em 5 genogrupos (GI – GV) e 35 genótipos baseados sobre a diversidade de sequências da proteína completa do capsídeo (VP1).

**Fonte.** CDC – MMWR, 2011b. Adaptado.

Uma potencial transmissão zoonótica incluindo a transmissão interespécies de NoV tem sido documentada (CDC, MMWR, 2011b).

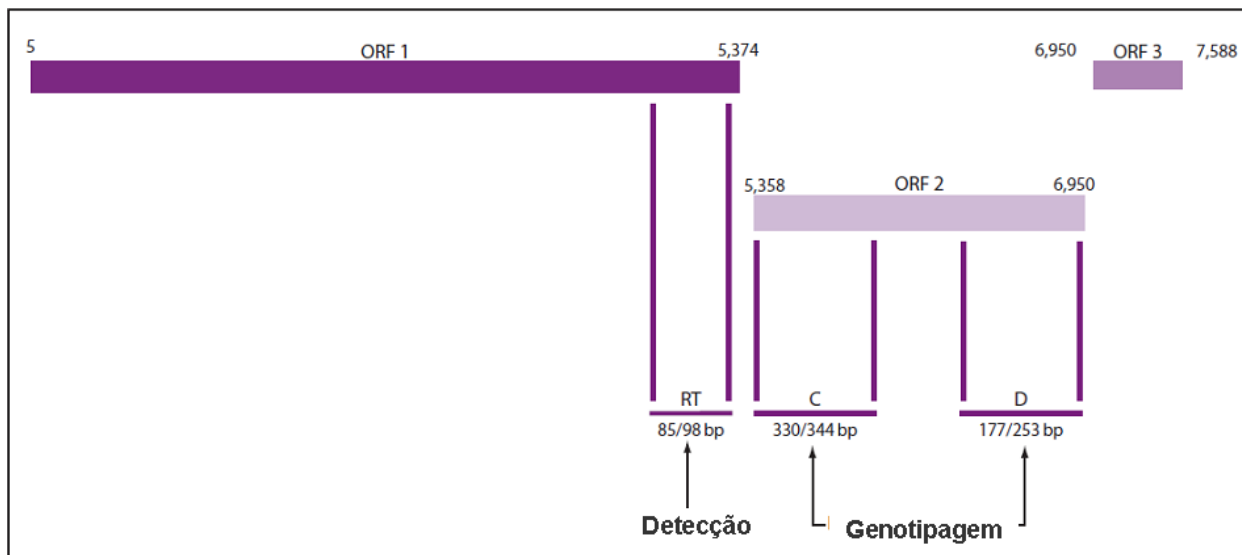
Desde 2001 o genótipo GII.4 de NoV tem sido associado com a maioria dos surtos de gastroenterites virais ao redor do mundo (Motomura et al. 2008). Estudos recentes têm demonstrado que esses vírus acumulam uma série de mudanças ao longo do tempo na sequência nucleotídica do gene que codifica a VP1, o qual permite evasão da imunidade na população humana (Siebenga et al. 2007).

Mais de 30% das infecções por NoV são assintomáticas, e pessoas assintomáticas podem excretar os vírus, embora em títulos menores do que pessoas sintomáticas (Barreira et al. 2010). A imunidade protetora aos NoV é complexa e a infecção não confere propriedade de proteção prolongada (Tan e Jiang, 2007).



A maioria dos laboratórios de virologia clínica realizam análise de RT-PCR, particularmente análise de PCR em tempo real para a detecção de NoV (CDC, MMWR, 2011b).

Quatro regiões diferentes (denominadas A-D) do genoma têm sido usadas com sucesso para a detecção e genotipagem de NoV (Figura 1.3.2.2).



**Fig 1.3.2.2.** Alvos de regiões genômicas de NoV usadas em análises de RT-PCR para detecção e genotipagem (ORF = *Open Reading Frame*; bp = pares de bases).

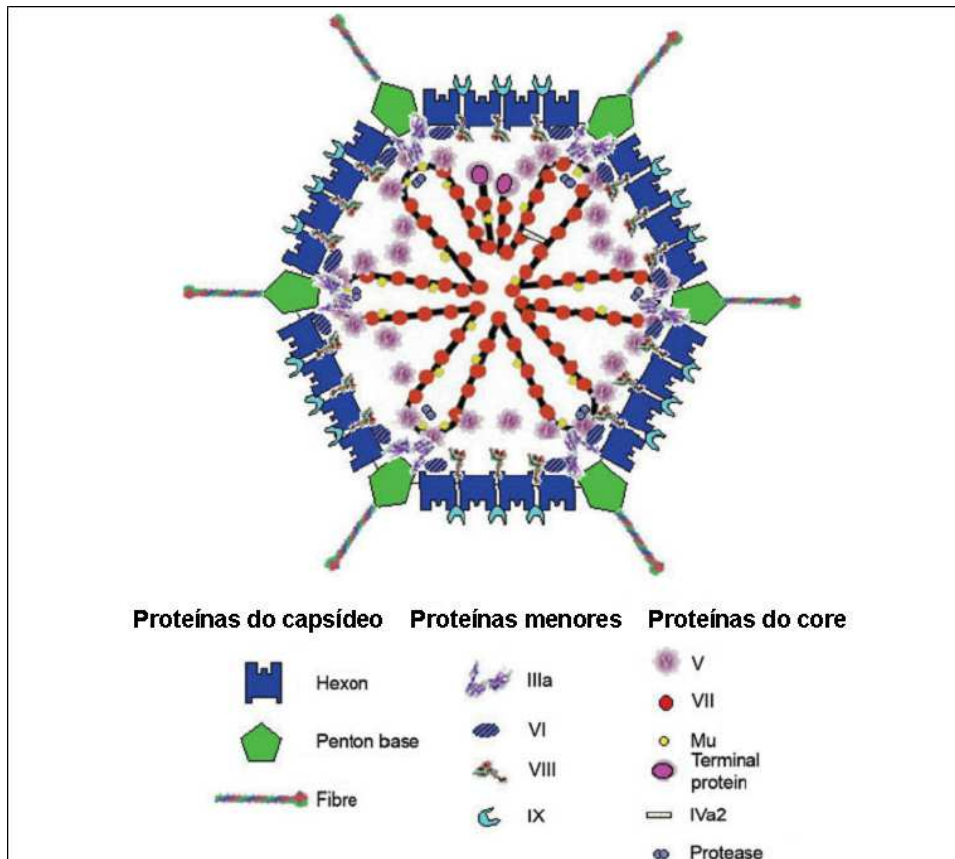
**Fonte.** CDC, MMWR, 2011b. Adaptado.

A higiene apropriada das mãos é a forma mais importante para prevenir a infecção por NoV e controlar a transmissão. O saneamento básico adequado também poderia contribuir para reduzir as rotas de disseminação desses vírus no ambiente.

### 1.3.3. Adenovírus (AdV)

Os AdV pertencem à família *Adenoviridae*, no gênero *Mastadenovirus* e são vírus não envelopados, com genoma de DNA dupla fita linear, com 26 a 45 Kpb (Russell, 2009., Smith et al. 2010). O capsídeo icosaédrico possui diâmetro de 70 a 100 nm, consistindo de 3 proteínas maiores (hexon, base penton e fibras) e numerosas proteínas menores compondo o capsídeo (Smith et al. 2010., Robinson et al. 2011) (Figura 1.3.3.1).





**Fig 1.3.3.1.** Estrutura do AdV baseada em microscopia crioeletrônica e cristalografia.

**Fonte.** Russell, 2009. Adaptado.

Os AdV infectam uma grande diversidade de espécies e possuem tropismo variado infectando vários sítios mucosos, incluindo o trato gastrointestinal, respiratório, genitourinário e superfícies oculares (Russell, 2009., Robinson et al. 2011).

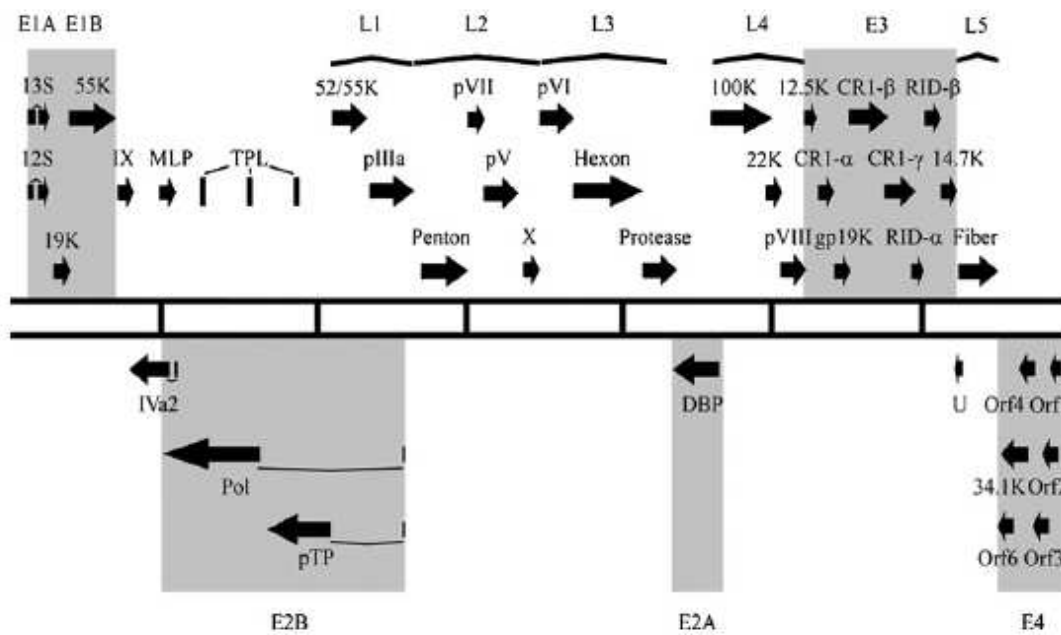
Existem 51 sorotipos de AdV humanos (Knipe et al. 2001) e, mais recentemente, mais 5 sorotipos foram descritos (Robinson et al. 2011). Esses sorotipos podem ser subdivididos em 6 espécies ou subgrupos (A a F) com base na sorologia ou análise do genoma (Russell, 2009). A espécie F (sorotipos 40 e 41) é responsável pela maioria dos casos de gastroenterite (Russell, 2009). A distribuição das espécies e sorotipos que causam diversas infecções é demonstrada na tabela 1.3.3.1.

**Tabela 1.3.3.1.** Sítios anatômicos de isolamento de AdV humanos e espécies e sorotipos envolvidos

Sítios anatômicos de isolamento de AdV	Espécies e sorotipos de AdV humanos envolvidos
Trato respiratório superior	<b>A:</b> 18 <b>B:</b> 3, 7, 11, 14, 16, 21 <b>C:</b> 1, 2, 5 <b>D:</b> 15, 19, 29, 30, 37 <b>E:</b> 4
Trato respiratório inferior	<b>A:</b> 12 <b>B:</b> 3, 7, 11, 14, 21, 35, 55 <b>C:</b> 1, 2, 5 <b>D:</b> 8, 19, 39, 56 <b>E:</b> 4
Superfície ocular	<b>B:</b> 3, 7, 11, 14, 16 <b>C:</b> 2, 5, 6 <b>D:</b> 8, 10, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 37, 53, 54, 56 <b>E:</b> 4
Trato geniturinário	<b>B:</b> 7, 11, 21, 34, 35 <b>C:</b> 1 <b>D:</b> 8, 37 <b>E:</b> 4
Trato gastrointestinal	<b>A:</b> 12, 18, 31 <b>B:</b> 3, 7, 50 <b>C:</b> 2 <b>D:</b> 9, 13, 20, 25, 26, 27, 28, 32, 33, 36, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51 <b>F:</b> 40, 41 <b>G:</b> 52
Coração	<b>C:</b> 2, 5, 6

**Fonte.** Robinson et al. 2011. Adaptado.

O genoma dos AdV humanos é dividido em regiões recentes, intermediárias e tardias, as quais correspondem ao ciclo infeccioso do vírus e reflete os padrões de transcrição. A região recente consiste de 4 famílias de transcritos (E1, E2, E3 e E4) que são necessárias para o estabelecimento da replicação viral. O gene intermediário consiste de 2 transcritos (IX e IVa2) e a região tardia do genoma contém 5 famílias de transcritos (L1, L2, L3, L4 e L5) que são envolvidas na produção do vírion maduro (Figura 1.3.3.2).



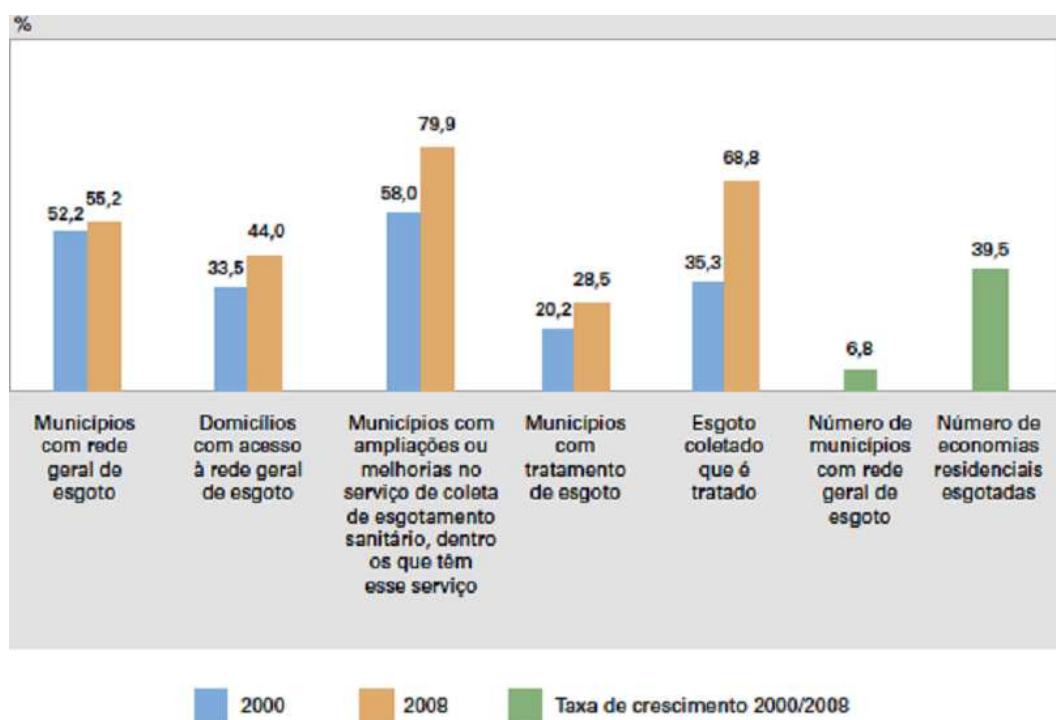
**Fig 1.3.3.2.** Mapa transcricional de AdV humano espécie D. As duas linhas centrais definem o comprimento do genoma com cada linha vertical representando 5000 pb. Setas pretas representam regiões codificantes de proteínas. Em cinza (unidades de transcrição recente (E) e unidades de transcrição tardia (L)).

**Fonte.** Robinson et al. 2011.

Em 1998, os AdV foram incluídos na “Lista de Contaminantes” como parte do *Safe Drinking Water Act* pela U.S. *Environmental Protection Agency* (U.S. EPA) por causa das suas implicações na saúde pública e às ocorrências frequentes em muitos ambientes aquáticos (Fong e Lipp, 2005). Atualmente estão sendo considerados bons indicadores da contaminação viral humana em ambiente (Bofill-Mas et al. 2006; Albinana-Gimenez et al. 2009).

## 1.4. TECNOLOGIAS DE TRATAMENTO DE ESGOTOS NO BRASIL

Embora as condições no acesso aos serviços de saneamento básico tenham avançado no Brasil nos últimos anos, sobretudo na cobertura do fornecimento de água potável, o mesmo não foi observado para a cobertura dos serviços de esgotamento sanitário (Figura 1.4.1).



**Fig 1.4.1.** Evolução percentual das principais variáveis de esgotamento sanitário – Brasil – 2000/2008

**Fonte.** IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – PNSB - 2000/2008.

Nota. O percentual de municípios com tratamento de esgoto em 2000 refere-se àqueles que o coletam e tratam.

É importante ressaltar que apenas 28,5 % dos municípios brasileiros possuem sistemas de tratamento de esgoto e uma parcela significativa dos esgotos coletados é descartada *in natura* em corpos de águas receptores, principalmente nos rios (IBGE, PNSB, 2008).

Os únicos estados com mais da metade dos domicílios atendidos por rede geral coletora de esgoto são: Distrito Federal (86,3%); São Paulo (82,1%); e Minas Gerais (68,9%). O Rio de Janeiro (49,2%) e o Paraná (46,3%), com quase metade dos domicílios atendidos, se situam acima da média nacional (44,0%), enquanto os demais apresentam menos de 35% de cobertura (IBGE, PNSB, 2008).

Dos sistemas de tratamento de esgotos disponíveis nos municípios, 49% representam sistemas biológicos secundários e apenas cerca de 8% teriam tratamento terciário ou avançado (IBGE, PNSB, 2008).

Dentre os sistemas de tratamento de esgoto secundários, as tecnologias anaeróbias são amplamente distribuídas, principalmente devido aos menores custos envolvidos na construção, manutenção e operação (Aiyuk et al. 2006). Entretanto, as tecnologias anaeróbias freqüentemente não produzem uma boa qualidade de efluentes considerando os limites de poluentes estabelecidos por regulações específicas na maioria dos países europeus (Zakkour et al. 2001). No Brasil resultados similares também têm sido descritos (Oliveira e Von Sperling, 2008).

No entanto, uma grande parcela dos sistemas de tratamento que operam no Brasil corresponde a diferentes tecnologias de aeração, predominando sistemas de valos de oxidação e lodo ativado, lagoas aeradas e filtros biológicos (IBGE, PNSB, 2008).

As tecnologias de aeração apresentam algumas vantagens em comparação aos processos anaeróbios, tais como maior eficiência na remoção de nutrientes (N e P) e, em alguns casos, microorganismos patogênicos (Zakkour et al. 2001; Oliveira and Von Sperling, 2008; Jamwal et al. 2009). As maiores desvantagens estão associadas ao consumo de energia devido à introdução de oxigênio através de aeradores mecânicos ou devido à adição de outros equipamentos mecanizados (Aiyuk et al. 2006) e custos relativamente mais elevados (Von Sperling, 2005).

Informações sobre o desempenho desses processos de tratamento na remoção de vírus de disseminação entérica ainda são limitadas no Brasil e todos os estudos publicados se referem a sistemas de tratamento de lodo ativado (Quadro 1.4.1). Isso significa que o desempenho de outros processos de tratamento anaeróbios e de aeração permanece desconhecido. O quadro 1.4.1 contém os dados dos trabalhos publicados sobre as concentrações de vírus de disseminação entérica obtidos em efluentes de ETEs no Brasil.

**Quadro 1.4.1.** Concentrações virais obtidas por qPCR em esgoto bruto e tratado em processos de lodo ativado no Brasil.

<b>Virus</b>	<b>Esgoto bruto</b>	<b>Efluentes tratados</b>	<b>Referências</b>
	<b>Média ou alcance</b>	<b>Média ou alcance</b>	
<b>Rotavirus</b>	$2.5 \times 10^4 - 1.6 \times 10^7 \text{ CG L}^{-1}$	-	Fumian et al. 2010
	$2.7 \times 10^4 - 1.6 \times 10^7 \text{ CG L}^{-1}$	$1.1 \times 10^3 - 3 \times 10^5 \text{ CG L}^{-1}$	Fumian et al. 2011
<b>Adenovirus</b>	$1.16 \times 10^7 \text{ CG L}^{-1}$	-	Rigotto et al. 2010
	$50 - 1.3 \times 10^4 \text{ CG ml}^{-1}$	-	Sch lindwein et al. 2010
<b>Norovirus</b>			
<b>GII</b>	$7.2 \times 10^3 \text{ CG L}^{-1}$	$3.4 \times 10^3 \text{ CG L}^{-1}$	Victoria et al. 2009*
<b>GI</b>	$2.4 \times 10^3 \text{ CG L}^{-1}$	$6.4 \times 10^2 \text{ CG ml}^{-1}$	Victoria et al. 2009*
<b>Polyomavirus (JCPyV)</b>	$1.2 \times 10^3 - 3.2 \times 10^5 \text{ CG 2 ml}^{-1}$	$2.6 \times 10^2 - 6.2 \times 10^3 \text{ CG ml}^{-1}$	Fumian et al. 2010*
<b>HAV</b>	$1.2 \times 10^2 - 8.9 \times 10^2 \text{ CG ml}^{-1}$	$1.7 \times 10^2 - 3.8 \times 10^2 \text{ CG ml}^{-1}$	Villar et al. 2007
	$3.4 \times 10^2 - 4.4 \times 10^2 \text{ CG ml}^{-1}$	NA	Sch lindwein et al. 2010

\* dados de processo de lodo ativado com remoção biológica de nutrientes; CG = cópias de genoma

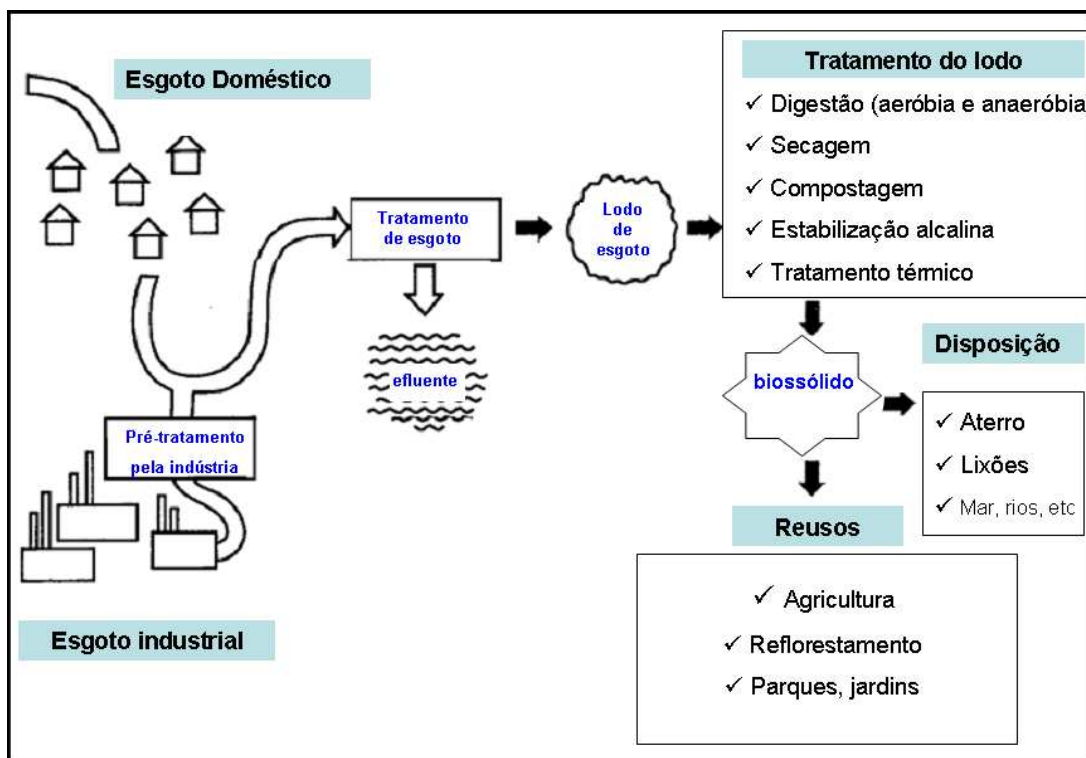
A resistência de vírus de disseminação entérica em processos de tratamento biológicos secundários de esgoto, bem como por tratamento de desinfecção final por cloração tem sido descrita (Bofill-Mas et al. 2006; Carducci et al. 2008; Katayama et al. 2008; Petrinca et al. 2009).

A cloração tem sido o processo mais utilizado em ETEs brasileiras para promover a desinfecção final de esgotos (Von Sperling, 2005). Esta tecnologia ainda é a mais barata e não necessita manutenção ou treinamento especializado para a aplicação. O completo domínio das tecnologias baseadas em UV e ozônio ainda não foram alcançados no Brasil e maiores aplicações seriam necessárias para confirmar o potencial desses processos na desinfecção de microorganismos patogênicos, incluindo a remoção de vírus em ETEs brasileiras (Von Sperling, 2005).

Os resíduos sólidos, que são o produto final dos processos de tratamento de esgotos, também necessitam de tratamento adequado para a remoção de matéria orgânica e microrganismos patogênicos. A seguir, a questão dos resíduos sólidos produzidos em ETEs será discutida.

## 1.5. BIOSSÓLIDOS PRODUZIDOS EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTOS (ETES)

O lodo de esgoto é um resíduo gerado durante o processo de tratamento de esgoto como consequência da sedimentação dos sólidos suspensos do esgoto (US EPA, 2003). Esse resíduo acumula matéria orgânica e uma variedade de contaminantes decorrentes do processo de tratamento. A figura 1.5.1 apresenta um esquema da geração desse resíduo.



**Fig 1.5.1.** Esquema geral do processo de tratamento de esgoto e biossólidos.

**Fonte.** USEPA, 2003. Adaptado.

Além da composição química característica (Quadro 1.5.1) esses resíduos acumulam diversos tipos de contaminantes, principalmente metais pesados e microrganismos patogênicos (bactérias, vírus, protozoários e helmintos).

**Quadro 1.5.1.** Composição química típica do lodo bruto e digerido

<b>Composição</b>	<b>Lodo bruto</b>	<b>Lodo digerido</b>
	<b>Variação</b>	<b>Variação</b>
Sólidos totais ST (%)	2 – 7	6 - 12
Sólidos voláteis (%)	60 – 80	30 - 60
Graxas e gorduras solúveis (%)	6 - 30	5 - 20
Proteínas (%)	23 – 30	15 - 20
Nitrogênio (%)	1,5 – 4	1,6 - 6
Fósforo (%)	0,8 – 2,8	1,5 - 4
Potássio (%)	0 – 1	0 - 30
Celulose (%)	8 - 15	8 - 15
Ferro	2 - 4	3 - 8
Sílica (SiO <sub>2</sub> ) (%)	15 – 20	10 - 20
pH	5 – 8	6,5 – 7,5
Alcalinidade mg l <sup>-1</sup>	500 - 1500	2500 - 3500
Ác. Orgânico mg l <sup>-1</sup>	200 – 2000	100 - 600

**Fonte.** Andreoli et al. 1998.

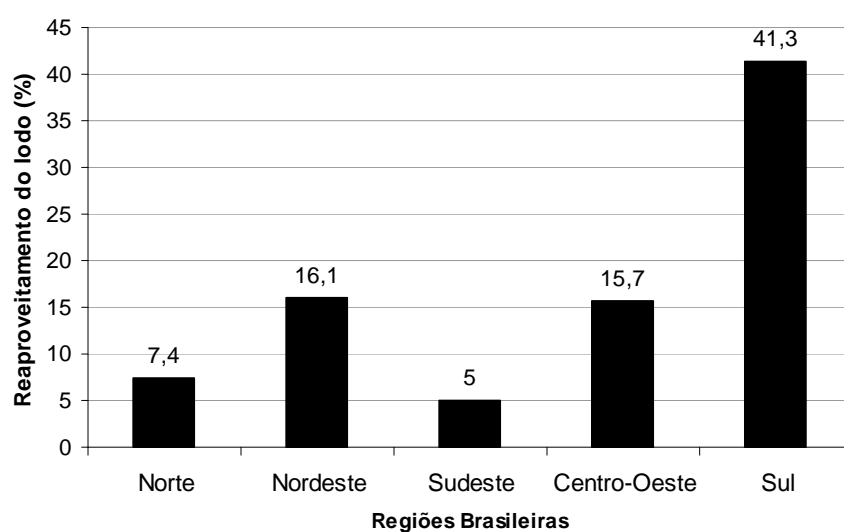
Toneladas de lodo de esgoto são produzidas diariamente em ETEs em todo o mundo (Wang et al. 2008). A produção de lodo no Brasil está estimada entre 150 mil e 220 mil



toneladas de matéria seca por ano (Andreoli, 2001). Uma das maiores questões recorrentes no gerenciamento das ETEs se refere ao tratamento, disposição e/ou reutilização desse resíduo.

No Brasil aproximadamente 40% dos biossólidos gerados em ETEs são dispostos em aterros sanitários, mas, aproximadamente 15% são descartados diretamente nos rios, 8% em terrenos baldios, 1% em oceanos e 15% são reaproveitados (IBGE, PNSB, 2008).

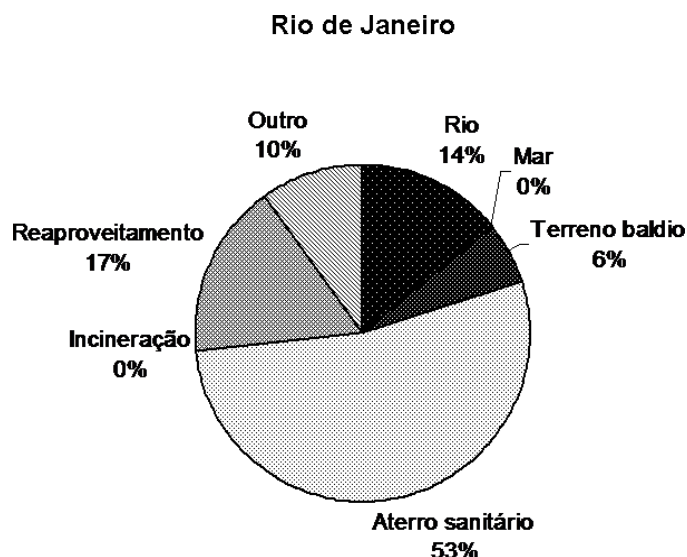
Os estados do sul do país são os que mais praticam as formas de reuso desses resíduos (Figura 1.5.2).



**Fig 1.5.2.** Distribuição do reaproveitamento do lodo de esgoto (%) gerado em processos de tratamento de esgoto segundo as grandes regiões brasileiras

**Fonte.** Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – PNSB, IBGE, 2008. Adaptado.

No Rio de Janeiro, os tipos de disposição dos biossólidos são demonstrados na figura 1.5.3.



**Fig 1.5.3.** Destino ou disposição do lodo de esgoto gerado pelos processos de tratamentos de esgoto no Rio de Janeiro – Brasil, 2008.

**Fonte.** Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – PNSB, IBGE, 2008. Adaptado.

No entanto, a disposição em aterros está se tornando restrita como resultado da falta de disponibilidade de terra, oposição pública, lixiviados e problemas de emissão de gases de efeito estufa. Muitos países têm planejado evitar ou reduzir a aplicação dos biossólidos em aterros (Wang et al. 2008).

Das diversas alternativas para a adequada disposição do lodo, a reciclagem agrícola é a mais promissora tanto sob o aspecto ambiental quanto econômico, pois transforma um rejeito em um importante insumo agrícola (Andreoli, 2001; Corrêa et al. 2005; Wang et al. 2008).

O reuso completo decorrente da aplicação no solo implica em custo relativamente baixo. Por isso, a aplicação no solo poderia se tornar a opção de gerenciamento preferida onde existe possibilidade para a grande aplicação (países com grandes áreas de cultivo) (Wang et al. 2008).

O lodo de esgoto pode ser aplicado em culturas aráveis, pastagens, florestas, locais de contato público (parques), gramados e jardins de casas.

Entretanto, a aplicação no solo ou em outras superfícies de disposição de lodo de esgoto não adequadamente tratado cria um potencial para a exposição humana aos patógenos através do contato direto ou indireto (Singh e Agrawal, 2008).

O contato direto inclui o manuseio do resíduo, andanças na área, manuseio do solo onde o resíduo tem sido aplicado, contaminação através de aerossóis (vento, durante a aplicação, etc).

O contato indireto pode acontecer pelo consumo de alimentos que tenham sido cultivados em terras que receberam o resíduo como fertilizante ou condicionador do solo; através do consumo de leite ou outros produtos alimentícios advindos de animais que pastaram em terras que receberam o resíduo contaminado; pela ingestão de água que tenha sido contaminada por infiltração de patógenos até o aquífero subterrâneo ou pelo arraste através de água de chuva em locais próximos da aplicação; através do contato com vetores que podem carrear os patógenos (ex. insetos, animais domésticos, etc) (USEPA, 2003; Sidhu e Toze, 2009). Dessa forma, a redução da concentração de patógenos é essencial para evitar riscos ambientais e de saúde pública.

O lodo que tem sido estabilizado (tratado) para reduzir o conteúdo de matéria orgânica, microrganismos patogênicos e tem potencial de aplicação benéfica é denominado biossólido (Viau e Peccia, 2009). No quadro 1.5.2 algumas formas de estabilização ou de tratamento de lodo comumente utilizadas para reduzir o número de patógenos são descritas.

Embora os processos descritos na tabela 1.5.2 sejam comumente usados para o tratamento do lodo, processos mais avançados têm sido desenvolvidos, tais como digestão aeróbia termofílica, radiação utilizando raios beta e gama e pasteurização (USEPA, 2003).

Os diferentes processos de tratamento de lodo diferem em eficiência quanto à remoção de microrganismos patogênicos (Quadro 1.5.3).

Alguns fatores que influenciam a sobrevivência dos microrganismos incluem: pH, temperatura, competição com outros microrganismos, luz UV, umidade e níveis da mistura do lodo (Rzezutka e Cook, 2004; Sidhu e Toze, 2009). Geralmente, vírus patogênicos e bactérias são inativados dentro de 1 a 3 meses em biossólidos. Os vírus podem sobreviver no solo em média 3 meses, mas podem atingir até 1 ano e de 1 a 2 meses sobre a superfície de plantas (USEPA, 2003).

**Quadro 1.5.2.** Processos de tratamento para reduzir o número de patógenos em lodo de esgoto

<b>Tipo de Tratamento</b>	<b>Características do Tratamento</b>
<b>Digestão aeróbia</b>	O lodo de esgoto é agitado com ar ou oxigênio para manter condições aeróbias em uma temperatura específica. A temperatura e tempo de residência do lodo deve ser entre 40 dias a 20°C ou 60 dias a 15°C.
<b>Secagem ao ar</b>	O lodo é seco em leitos de areia ou em bases pavimentadas ou não pavimentadas. O lodo deve ser seco por um mínimo de 3 meses e a temperatura média diária deve estar acima de 0°C.
<b>Digestão anaeróbia</b>	O lodo é tratado na ausência de ar por um tempo de residência e temperatura específica. O tempo de residência e temperaturas deve ser entre 15 dias de 35 a 55°C ou 60 dias a 20°C.
<b>Compostagem</b>	Pode ser usado um reator, uma pilha aerada estática ou compostagem. A temperatura do lodo é aumentada para 40°C ou mais e permanece a essa temperatura ou maiores por 5 dias.
<b>Estabilização alcalina</b>	Cal suficiente é adicionada ao lodo para elevar o pH a 12 por mais de 2 horas de contato.

**Fonte.** USEPA, 2003.

**Quadro 1.5.3.** Resumo de redução de patógenos em vários processos de tratamento de lodo

Tratamento	Redução em Log		
	Vírus entéricos	Bactérias coliformes	Parasitas
Digestão anaeróbica mesofílica	0.5 – 2	0.5 – 4	0
Digestão aeróbia	0.5 – 2	0.5 – 4	0
Compostagem	2 a 4	2 a > 4	2 a > 4
Secagem ao ar	0.5 a > 4	0.5 - 4	0.5 a > 4
Estabilização alcalina	> 4	2 a > 4	0

**Fonte.** Godfree e Farrell, 2005.

O gerenciamento adequado requer soluções ambientalmente corretas, economicamente viáveis e socialmente aceitáveis. Para proteger a saúde pública, muitos países regulam agora o uso e a disposição do lodo.

Em agosto de 2006 o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) implementou uma resolução (no. 375/2006) para definir os critérios e os procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgotos gerados em ETEs.

Nessa Resolução, além de parâmetros físico-químicos, também foi incluído o monitoramento de agentes patogênicos como os coliformes termotolerantes, ovos viáveis de helmintos, *Salmonella* e vírus entéricos (Quadro 1.5.4).

**Quadro 1.5.4.** Limites de patógenos permitidos em biossólidos de classe A e B (Conama, 375, 2006)

Tipo de Lodo	Concentração de patógenos
A	Coliformes termotolerantes < $10^3$ NMP/g de ST Ovos viáveis de helmintos < 0,25 ovo/g de ST <i>Salmonella</i> : ausência em 10g de ST Vírus < 0,25 UFP ou UFF / g ST
B	Coliformes termotolerantes < $10^6$ NMP / g ST Ovos viáveis de helmintos < 10 ovos /g ST

ST = Sólidos Totais; NMP = Número Mais Provável; UFP = Unidade Formadora de Placa; UFF = Unidade Formadora de Foco

As opções geralmente selecionadas para reduzir a carga de patógenos em biossólidos de classe A são: aquecimento-secagem, compostagem, estabilização alcalina e digestão aeróbica termofílica (Godfree e Farrell, 2005). A digestão anaeróbia mesofílica é reconhecida por produzir biossólidos com qualidade de classe B (Foster e Pérez, 2010), mas é amplamente utilizada no Brasil para realizar o tratamento do lodo (Andreoli, 2001).

Os vírus entéricos a serem pesquisados preferencialmente nesses resíduos devem ser: adenovirus e vírus do gênero *Enterovirus* (Poliovirus, Echovirus e Coxsackievirus). Em situações especiais – endêmicas ou epidêmicas (surto de diarreia, hepatite A e outras viroses de transmissão fecal-oral) deve-se pesquisar RV, HAV e outros que poderão ser definidos pelo órgão ambiental (CONAMA, 375, 2006).

A principal questão envolvendo o monitoramento de vírus entéricos em lodo é direcionada para a aplicação de metodologias adequadas de detecção. No próximo item questões relacionadas com os métodos geralmente usados para concentrar e detectar vírus entéricos em biossólidos serão discutidas.

---

## 1.6. MÉTODOS PARA DETECÇÃO VIRAL EM ESGOTO, LODO DE ESGOTO E BIOSSÓLIDOS

---

As etapas básicas para a análise virológica em amostras ambientais incluem: concentração dos vírus e purificação da amostra, isolamento viral utilizando cultura de células, ou mais recentemente, a detecção de ácidos nucléicos virais por técnicas moleculares.

Durante as últimas décadas, uma grande variedade de técnicas moleculares tem emergido e as técnicas de amplificação de ácidos nucléicos (notadamente a reação em cadeia da polimerase - Polymerase Chain Reaction - PCR e a PCR quantitativa (qPCR) ou PCR em Tempo Real (Real-time PCR), são atualmente os métodos mais usados para a análise de vírus em ambiente (Bosch et al. 2008; Girones et al. 2010).

A aplicação desses métodos apresenta a vantagem de tornar a análise mais rápida e custo-efetiva, servindo para uma série de propósitos: a) identificar vírus fastidiosos ou que não produzem efeito citopático em culturas de células convencionais, b) para a enumeração, c) a caracterização molecular de microrganismos (genotipagem), d) para o rastreamento de fontes de contaminação humana e animal e, em alguns casos, para detectar patógenos emergentes (Jofre e Blanch, 2010., Girones et al. 2010).

No entanto, a grande diversidade de amostras, a alta dispersão das partículas virais nesses ambientes e a presença de inibidores naturais que afetam a reação de amplificação de ácidos nucléicos são apontadas como os principais entraves para obter resultados seguros (Guzmán et al. 2007a; Rock et al. 2010).

Nesse sentido as etapas de concentração e purificação da amostra são cruciais para o bom desempenho da detecção utilizando métodos moleculares. Em geral, os métodos de concentração em água e esgoto são bem estabelecidos e podem ser baseados nos seguintes princípios: adsorção-eluição em filtros de membrana carregados positivamente ou negativamente, ultrafiltração, floculação físico-química e separação em fase ou por cromatografia de afinidade (Wyn-Jones e Sellwood, 2001).

Entretanto, os métodos usados para processar lodo de esgoto ou biossólidos ainda não são otimizados ou de eficiência comprovada. O lodo de esgoto contém numerosos compostos orgânicos e inorgânicos (ácidos húmicos, fúlvicos, polifenóis, metais pesados) que são tóxicos

e são capazes de formar complexos com os ácidos nucleicos ou inibir as enzimas de amplificação em reações de PCR (Rock et al. 2010).

De modo geral, a concentração viral em lodo ou biossólidos requer duas etapas principais: a aplicação de reagentes eluentes (para desagregar os vírus adsorvidos na matéria sólida) e purificação através de estratégias de centrifugação.

Vários reagentes eluentes são testados para promover a eluição viral do lodo, entre eles: extrato de carne, glicina, caseína, lisina, ácido aspártico, Tween 80, EDTA e enzimas hidrolíticas (Farrah et al. 1981., Mignotte et al. 1999., Monpoeho et al. 2001., 2004., Belguith et al. 2006., Sano et al. 2003., Rock et al. 2010).

Esses reagentes podem ser divididos em pelo menos duas categorias baseadas nos seus modos de ação. A primeira categoria inclui materiais proteínicos os quais competem com as proteínas das partículas de vírus pelos sítios de ligação no material adsorvente (Hurst et al. 2002). O extrato de carne é o reagente mais conhecido e aplicado dessa categoria. A segunda categoria de eluentes consiste de compostos que alteram a favorabilidade de adsorção e incluem soluções que contêm várias substâncias ativas, entre os quais glicina, ou detergentes como Tween 80 e EDTA, os quais servem como agentes quelantes de metais (Hurst et al. 2002).

Métodos de concentração secundária podem ser aplicados para reduzir o volume de amostra eluída e aumentar a eficiência de recuperação, tais como a floculação orgânica (Katzenelson et al. 1976) ou etapas subsequentes de centrifugação ou ultracentrifugação. Para purificar a amostra e evitar a contaminação por bactérias, uma filtração em filtros Millipore (0.22  $\mu\text{m}$ ) pode ser uma alternativa (Guzmán et al. 2007a).

Após a concentração e purificação de amostras, as próximas etapas consistem na extração seguida da detecção de ácidos nucleicos.

A maioria das técnicas moleculares aplicadas é baseada em protocolos de amplificação dos ácidos nucleicos *in vitro*, dos quais a PCR é a mais frequentemente utilizada (Jofre e Blanch, 2010; Girones et al. 2010).

No entanto, a PCR quantitativa (qPCR) está rapidamente se tornando estabelecida no setor ambiental. A qPCR comumente usa corantes fluorescentes, tais como SYBR Green conhecido por intercalar entre as moléculas de DNA para a detecção de um segmento



amplificado. Entretanto, *molecular beacons* ou outras sondas fluorescentes tais como TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) conferem maior especificidade por serem baseadas no uso de sondas complementares para a quantificação do segmento do genoma selecionado (Girones et al. 2010). Esses métodos são conhecidos por apresentarem alta sensibilidade e especificidade para identificar e quantificar baixas concentrações virais presentes em amostras ambientais.

Entretanto, a quantificação acurada de cópias de genoma virais identificados nas matrizes ambientais demanda o controle de passos cruciais tais como eficiência dos procedimentos de extração dos ácidos nucléicos virais e das enzimas envolvidas na amplificação molecular. Além dos controles positivos e negativos específicos nas reações de PCR, outros controles são requeridos.

A alternativa adotada é o uso de um controle interno nas reações para monitorar a eficiência de todas as etapas de detecção. O controle deve apresentar características físico-químicas similares aos microrganismos alvos e, de preferência, não serem encontrados nos ambientes avaliados. Os melhores candidatos para esse propósito são vírus de RNA com capsídeo, tais como vírus de RNA animal ou bacteriófagos de RNA (Bosch et al. 2008).

Outra estratégia muito utilizada para garantir que resultados falso-negativos não estejam sendo obtidos é diluir os ácidos nucléicos antes das etapas de amplificação para avaliar a presença de inibidores potenciais que podem afetar a precisão da quantificação (Girones et al. 2010).

A avaliação precisa da eficiência desses métodos de detecção e quantificação é necessária principalmente para estabelecer estudos de análises de risco mais acuradas e inferir quais limites virais são aceitáveis para garantir padrões de segurança atuais que determinem a qualidade da água, bem como de efluentes e resíduos de ETEs.

## 2. RELEVÂNCIA

---

O controle da qualidade virológica da água e a avaliação do desempenho de sistemas de tratamento e processos de desinfecção de água e esgoto são temas pertinentes e atuais no contexto da saúde ambiental. No entanto, o monitoramento viral ainda não é realizado regularmente para analisar a qualidade microbiológica da água, de efluentes e resíduos de Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) e existe a necessidade de intensificar estudos nesse campo, principalmente diante do aumento da degradação dos ecossistemas aquáticos e das novas necessidades de reuso de efluentes e resíduos.

Além da limitação de informações, sobretudo sobre a qualidade de efluentes e resíduos sólidos produzidos em ETEs, um dos maiores desafios para aperfeiçoar estudos nesse campo são o desenvolvimento e a padronização de metodologias de detecção que possam ser eficientemente utilizadas em análises de rotina.

Tal abordagem é particularmente importante para amostras com altos níveis de contaminação ou inibidores naturais que interferem, sobretudo, quando a identificação é realizada através da detecção de ácidos nucleicos. As técnicas moleculares, especialmente a PCR e, subsequentemente, a PCR quantitativa (qPCR) estão se tornando comumente utilizadas para a detecção viral em matrizes ambientais. No entanto, resultados falso negativos frequentemente são observados, o que comprometeria uma análise confiável de risco à saúde pública.

A ineficiência ou a falta de confiabilidade dos resultados obtidos são particularmente importantes no estudo de detecção viral em amostras mais complexas, com alto conteúdo de contaminantes e matéria sólida. Esse é o caso dos resíduos sólidos produzidos em ETEs, mais especificamente do lodo de esgoto e biossólidos. Os métodos de concentração e purificação dessas amostras teriam papel crucial na remoção dos contaminantes, permitindo que as reações de amplificação de ácidos nucleicos ocorram com o mínimo de interferências.

Um bom método de recuperação deve ser simplificado, economicamente viável, reprodutível e eficiente para recuperar grupos virais distintos. Nesse sentido, torna-se necessário realizar análises comparadas sobre a eficiência desses métodos para recuperar uma grande variedade de vírus. O estabelecimento de indicadores utilizados para avaliar a

contaminação virológica em resíduos também é importante, uma vez que em análises de rotina a detecção simultânea de vários patógenos virais se torna inviável.

Algumas medidas estão sendo estabelecidas para garantir resultados mais confiáveis quando análises de biologia molecular são adotadas. Uma delas seria o uso de um controle interno nas reações para monitorar a eficiência de todas as etapas envolvidas no processo de detecção. Nesse estudo optou-se por incluir como controle interno um bacteriófago (PP7) que infecta *Pseudomonas aeruginosa*, pois vinha sendo reportado como adequado para esse propósito (Rajal et al. 2007). Esse bacteriófago tem propriedades similares a alguns vírus entéricos e não é detectado em amostras ambientais.

Uma outra questão relevante sobre o assunto refere-se à ausência de dados informando os limites de detecção dos métodos utilizados, principalmente para matrizes sólidas. Por isso, muitas vezes, a real presença de vírus patogênicos nesses resíduos pode ser subestimada.

A avaliação da contaminação de lodo de esgoto ou biossólidos é necessária diante das formas de disposição ou reuso, principalmente quando o destino final é a aplicação em solos agrícolas. A ocorrência de RVA e NoV ainda não foi descrita em biossólidos produzidos no Brasil.

A prevalência e a concentração de vírus de disseminação entérica presentes em amostras ambientais pode ser variável com o tipo de amostra e com o perfil epidemiológico das comunidades. A análise da disseminação desses patógenos no ambiente pode subsidiar políticas mais adequadas de saúde pública para prevenir a transmissão desses agentes infecciosos em uma dada localidade.

## 3. OBJETIVOS

---

### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a ocorrência de vírus de disseminação entérica em amostras ambientais (esgoto e lodo de esgoto primário e tratado) produzidos em diferentes Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) (hospitalares e urbana) da cidade do Rio de Janeiro através da detecção, quantificação e caracterização molecular de rotavírus (RV-A), adenovírus (AdV), norovírus (NoV) e vírus da hepatite A (HAV), assim como determinar a eficiência de diferentes metodologias de recuperação viral para amostras de lodo de esgoto primário e tratado.

### **3.2. Objetivos específicos**

**1** – Avaliar os níveis de contaminação de efluentes hospitalares produzidos em dois processos distintos de tratamento: **i**) sistema anaeróbio (reator UASB com pós-tratamento por três filtros anaeróbios dispostos em série); **ii**) sistema de aeração (lodo ativado de aeração prolongada), comparando as cargas virais detectadas para RV-A, AdV, NoV GI e GII e HAV em cada sistema e o potencial de remoção alcançado por essas tecnologias (**Artigo 1**).

**2** – Avaliar a disseminação e a eficiência de remoção de HAV em uma ETE de grande porte (ETE Alegria, Caju, RJ) que utiliza tratamento por lodo ativado convencional pelo monitoramento de afluentes e efluentes tratados durante o período de 1 ano (agosto de 2009 a julho de 2010) (**Artigo 2**).

**3** – Determinar a influência dos processos de sedimentação primária e secundária na remoção de RVA, AdV, NoV GII e HAV em amostras obtidas durante estágios distintos do processo de tratamento de esgoto por lodo ativado convencional e avaliar a eficiência de métodos de recuperação viral em lodo de esgoto (ETE Alegria – Caju, RJ) (**Artigo 3**).

**4** – Avaliar diferentes metodologias de concentração de RVA, AdV, NoV GII e HAV em amostras de lodo de esgoto tratado por digestão anaeróbica mesofílica, pela utilização de controle interno, testes de inibição, assim como pela caracterização dos diferentes concentrados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada com sistema EDS (**Artigo 4**).

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

As metodologias utilizadas nos estudos estão descritas nos trabalhos que constam no ítem 5 da tese.

A configuração e os parâmetros de operação das ETEs analisadas neste estudo estão descritas na seção de anexos (item 10.1). A metodologia envolvida na análise dos resíduos sólidos através de MEV está descrita na seção de anexos (ítem 10.3).

---

## 5. RESULTADOS

---

A metodologia e os resultados obtidos na tese estão apresentados na forma de manuscritos publicados ou submetidos à publicação.

***5.1. Quantification and Molecular Characterization of Enteric Viruses Detected in Two Hospital Wastewater Treatment Plants. (Revista: Water Research, vol. 45. Pg 1287-1297, 2011)***



ELSEVIER

Available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)

## Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants

Tatiana Prado<sup>a,\*</sup>, Dalton M. Silva<sup>c</sup>, Wilma C. Guilayn<sup>c</sup>, Tatiana L. Rose<sup>b</sup>, Ana Maria C. Gaspar<sup>a</sup>, Marize P. Miagostovich<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Technological Development in Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Av. Brazil 4.365, Mangueiras, CEP 21040-360, Rio de Janeiro RJ, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro RJ, Brazil

<sup>c</sup>Department of Sanitation and Environmental Health, Public Health National School, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro RJ, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 May 2010

Received in revised form

2 September 2010

Accepted 12 October 2010

Available online 20 October 2010

#### Keywords:

Hospital wastewater

Upflow anaerobic sludge

blanket (UASB)

Anaerobic filters

Activated sludge

Enteric viruses

Molecular characterization

### ABSTRACT

Hospital wastewater has been described as an important source of spreading pathogenic microorganisms in the environment. However, there are few studies reporting the presence and concentrations of gastroenteric viruses and hepatitis A viruses in these environmental matrices. The aim of this study was to assess the contamination by viruses responsible for acute gastroenteritis and hepatitis derived from hospital wastewater treatment plants (WWTPs). Rotavirus A (RV-A), human adenoviruses (HAdV), norovirus genogroup I and II (NoV GI/GII) and hepatitis A viruses (HAV) were detected and quantified in sewage samples from two WWTPs located in Rio de Janeiro (Brazil) that operates different sewage treatments. WWTP-1 uses an Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB reactor) and three serial anaerobic filters while WWTP-2 uses aerobic processes, activated sludge with extended aeration and final chlorination of the effluents. Viruses' detection was investigated by using conventional PCR/RT-PCR, quantitative real-time PCR (qPCR) and partial sequencing of the genome of the viruses detected. Rate of viruses detection ranged from 7% (NoV GI in WWTP-1) to 95% (RV-A in WWTP-2) and genome from all viruses were detected. The most prevalent genotypes were RV-A SG I, HAdV species D and F, NoV GI/4 and HAV subgenotype IA. Mean values of viral loads (genome copies (GC)/ml) obtained in filtered effluents from anaerobic process was  $1.9 \times 10^3$  (RV-A),  $2.8 \times 10^3$  (HAdV) and  $2.4 \times 10^3$  (NoV GI). For chlorinated effluents from activated sludge process, the mean values of viral loads (GC/ml) was  $1.2 \times 10^5$  (RV-A),  $1.4 \times 10^3$  (HAdV),  $8.1 \times 10^2$  (NoV GI) and  $2.8 \times 10^4$  (HAV). Data on viral detection in treated effluents of hospital WWTPs confirmed the potential for environmental contamination by viruses and could be useful to establish standards for policies on wastewater management.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Tel./fax: +55 21 2562 1711.

E-mail address: [tprado@ioc.fiocruz.br](mailto:tprado@ioc.fiocruz.br) (T. Prado).

0043-1354/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2010.10.012



## 1. Introduction

Several sources of sewage could contribute to the load of pollutants released in water bodies, particularly hospital sewage, as they carry a large amount of toxic substances and pathogenic microorganisms (Emmanuel et al., 2005, 2009; Prado et al., 2008). Wastewater treatment plants (WWTPs) have played an important role in microbiological reduction, minimizing the risks associated with pathogen circulation into the environment, although viruses still pose a challenge in wastewater treatment and disinfection.

Enteric viruses transmitted by the fecal-oral route are often involved in infection resulted by the ingestion of contaminated food and water, although the global impact of water related disease is difficult to assess. Those viruses are shed in large quantities and disseminate widely in the environment representing a potential risk to human health, mainly due to their stability under adverse conditions (Bosch et al., 2008). In this context it was demonstrated the importance of studies on the efficiency of virus removal in WWTPs mainly in developing countries that often present high rates of morbidity or mortality associated to infectious diseases of fecal-oral transmission such as hepatitis and gastroenteritis (Parashar et al., 2006; Leite et al., 2008; Vitral et al., 2008).

Viral detection, molecular characterization and removal efficiency of pathogenic viruses from WWTPs have been reported in Brazil (Villar et al., 2007; Barrella et al., 2009; Ferreira et al., 2009; Victoria et al., 2009), however none study specifically for hospital WWTPs. Studies on environmental contamination from hospital WWTP should be considered a priority since the major consume of water in these institutions results in a significant volume of wastewater carrying a high load of pathogenic viruses (Wang et al., 2005) and antimicrobial-resistant bacteria (Prado et al., 2008) as well as high levels of chemical substances such as pharmaceuticals, heavy metals, disinfectants, hormones, radionuclides and solvents (Emmanuel et al., 2005, 2009).

Molecular methods of virus detection such as PCR assays have improved environmental virology surveys due to their sensitivity, specificity and ability to detect quickly a wide group of viruses in environmental samples (Bofill-Mas et al., 2006; De Paula et al., 2007; Girones et al., 2010).

The aim of this study was to assess the environmental contamination by viruses responsible for acute gastroenteritis and hepatitis derived from hospital WWTPs. For purposes of

this study two hospital WWTPs using different sewage treatment processes were evaluated for the presence and quantification of rotavirus A (RV-A), human adenoviruses (HAdV), noroviruses (NoV) genogroup I and II (GI/GII) and hepatitis A viruses (HAV). It was used adsorption-elution method for virus concentration associated to molecular methods of genome amplification. Viruses molecular characterization was also used for genotyping and demonstration of the prevalent strains disseminated in the study area.

## 2. Material and methods

### 2.1. Characterization of the sewage treatment plants and sampling

A total of 34 samples were collected from two hospital WWTPs in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil over a period between 2005 and 2008 (section 3.2, Tables 3 and 4). While offering different characteristics of services, both hospitals have laboratories, rehabilitation and dialysis units, hospitalization, pediatrics, surgery, clinics, laundry, cafeteria and restaurants. Effluents from both WWTP are discharged in the municipal drainage system that flows across Guanabara Bay (WWTP-1) and empties into Jacarepagua Lagoon (WWTP-2), both eutrophic ecosystems located in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro.

WWTP-1 serves an average of 2.000 patients per month and has 800 regular employees. It uses an anaerobic treatment process (Upflow Anaerobic Sludge Blanket, UASB reactor) with a hydraulic retention time of 8 h, followed by post-treatment in three serial anaerobic filters (with crushed stone number four for fill support) with a hydraulic retention time of 4 h. The mean influent flow was of 2.54 l/s. Fourteen samples were collected from the following sampling points: influent (raw sewage), UASB reactor effluent and treated effluent (filtered effluent).

WWTP-2 was built to serve 12.000 patients monthly but now serves an average of 22.000 patients per month. It uses an aerobic treatment process (activated sludge with extended aeration and disinfection of final effluent by chlorination) with a hydraulic retention time of 18h in the aeration tank, and a mean influent flow of 5.0 l/s. Twenty sewage samples were collected from influent (raw sewage), sedimentation tank effluent and final effluent after chlorination.

**Table 1 – Viruses analyzed. PCR assay types, genomic regions of amplification on the genome, lengths of the amplicons and references.**

Viruses	PCR assay	Region on the genome	Lengths of the amplicons	References
RV-A	RT-PCR	VP6	379 bp	Iturriza-Gómara et al. (2002)
	RT-qPCR	NSP3	86 bp	Zeng et al. (2008)
HAdV	Nested PCR	Hexon gene	171 bp	Allard et al. (2001)
	qPCR	Hexon gene	139 bp	Heim et al. (2003)
NoV (GI/GII)	Semi-nested RT-PCR	RdRp	188 bp (GI) and 237 bp (GII)	Boxman et al. (2006)
	Multiplex RT-PCR	ORF-I-ORF-2 junction region	85 bp (GI) and 98 bp (GII)	Pang et al. (2005)
HAV	Nested RT-PCR	VP1/2A junction region	247 bp	De Paula et al. (2002)
	RT-qPCR	Non-coding region 5'(NC)	83 bp	De Paula et al. (2007)



**Table 2 – Mean physicochemical parameters obtained at each sampling point from wastewater treatment plants (WWTPs).**

WWTP	Stages of sewage treatment process	pH mean/SD	BOD <sub>5</sub> mg/l mean SD	COD mg/l mean/SD	Ammonium mg/l mean/SD
1	RS (n = 4)	7.0/0.09	40.4/12.08	157.0/57.98	9.7/3.29
	Ue (n = 4)	7.0/0.05	7.7/7.5	61.7/10.22	12.1/7.39
	FE (n = 4)	6.9/0.31	4.0/5.47	28.4/14.37	3.1/3.60
	Total removal (%)		(90.0)	(81.9)	(74.3)
2	RS (n = 6)	7.0/0.05	95.9/4.59	285.6/75.06	8.3/3.01
	ES (n = 6)	6.1/0.22	17.5/2.14	52.8/8.42	1.5/1.55
	Chl.E (n = 6)	6.2/0.15	13.7/4.31	70.5/33.92	1.3/1.10
	Total removal (%)		(85.7)	(75.3)	(84.3)

RS = raw sewage; Ue = UASB effluent; FE = filtered effluent; ES = effluent from sedimentation tank; Chl.E = chlorinated effluent; BOD = biochemical oxygen demand; COD = chemical oxygen demand; SD = standard deviation.

At each sampling point, 2 l of sewage were collected in sterile plastic bottles, kept at 4 °C and transported to the laboratory for immediate analysis.

## 2.2. Physicochemical parameters

pH, BOD<sub>5</sub> (biochemical oxygen demand over 5 days), COD (chemical oxygen demand) and ammonium (N-NH<sub>3</sub>) were evaluated. These physicochemical parameters were performed according to the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998).

## 2.3. Concentration method

The adsorption-elution method used a type-HA negatively charged membrane filter (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) of a 0.45-µm pore size, 142-mm of diameter and a vacuum-pump filtration of samples, as described by Katayama et al. (2002). The sewage samples were pre-filtered through an AP 20 membrane (Millipore) (retention rate, 0.8–8 µm) before adding to the type-HA negatively charged membrane filter. Decontamination was done using a free chlorine solution (0.3 mM) for 15 min. Recirculation of distilled sterile water was done through the vacuum-pump system and was performed before each viral concentration procedure. The concentrated samples were stored at -70 °C until molecular analysis.

## 2.4. Viral genomic extraction

Viral RNA was extracted from 140 µl of the eluate to obtain a final volume of 60 µl, using the QIAmp Viral RNA kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions.

## 2.5. Reverse transcription (RT) reaction

cDNA synthesis was carried out by RT using a random primer (PdN<sub>6</sub>; 50A<sub>260</sub> units; Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK) for RV-A, NoV (GI/GII) and HAV. 2 µl of dimethyl sulfoxide (Sigma, St. Louis, MO) and 10 µl of RNA were mixed briefly, heated at 97 °C for 7 min, and chilled on ice for 4 min. The components of the mixture and their final concentrations for a 50-µl RT reaction were as follows: 2.5 mM each deoxynucleoside triphosphate (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200U of Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen), and 1 µl of PdN<sub>6</sub>. The RT

reaction mixture was incubated in a thermal cycler (PTC-100 Programmable Thermal Controller; MJ Research, Inc., Watertown, MA) at 25 °C for 5 min, 50 °C for 60 min and 70 °C for 20 min.

## 2.6. Conventional (c) and quantitative (q)PCR protocols for viral detection

PCR protocols for viruses' detection and quantification, as well as the target region on the genome and lengths of the amplicons generated can be found in Table 1.

To avoid false-positive results, quality control measures such as using separate rooms were adopted and each set of amplifications included negative and positive controls.

cPCR was performed using a thermal cycler (PTC-100 Programmable Thermal Controller; MJ Research, Inc., Watertown, MA). PCR products were separated on 1.5% electrophoresis-grade agarose gel (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) and stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml). Images were obtained using an image capture system (BioImaging Systems) and Labworks 4.0 software (UVP, Inc., Upland, CA). qPCR was carried out using an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, USA). For all viruses a standard curve (SC; 10<sup>7</sup> to 10<sup>1</sup> copies per reaction) was generated using tenfold serial dilutions of pCR2.1 vectors (Invitrogen, USA) containing the target region. The concentration of the primers and probes used in the qPCR reaction were described previously (Table 1). The qPCR reaction was performed in a final volume of 25 µl by using Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). Amplification data were collected and analyzed using Sequence Detection Software version 1.0 (Applied Biosystems, CA, USA). All reactions were performed in duplicate.

## 2.7. Nucleotide sequencing

cPCR products were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) or QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions, and quantified by a 2.0% agarose gel electrophoresis with a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). PCR amplicons were sequenced in both directions with the Big Dye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, CA, USA) in an ABI Prism 3730 Genetic Analyzer<sup>®</sup> (Applied Biosystems, CA, USA) as described by Otto et al. (2008), with the same primers used in the amplification reactions.



**Table 3 – Results of cPCR, qPCR (genome copies/ml) and molecular characterization obtained at each sampling point from anaerobic process (WVWTP-1).**

Samples	Date (day/mo/yr)	Viral results													
		RV-A				HAdV				NoV GII				HAV	
		cPCR	qPCR	Subgroup		cPCR	qPCR	Specie		cPCR	qPCR	Genotype	cPCR	qPCR	Subgenotype
RS	04/10/2005	(-)	$2.08 \times 10^4$		(-)	$1.7 \times 10^2$		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	ND	
Ue		(+)	$5.5 \times 10^3$	a	(-)	(-)		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	ND	
FE		(-)	(-)		(-)	(-)		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	ND	
RS	08/05/2006	(-)	(-)		(-)	(-)		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	ND	
Ue		(-)	(-)		(-)	(-)		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	ND	
RS	22/05/2006	(-)	$1.1 \times 10^4$	a	(-)	$2.1 \times 10^3$		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	ND	
Ue		(+)	(-)		(-)	$2.1 \times 10^3$		(-)	(-)	(-)		(+)	(+)	ND	IA
FE		(-)	(-)		(-)	$4.4 \times 10^3$		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	ND	IB
RS	05/06/2006	(+)	$8.7 \times 10^3$	SG1	(+)	(-)	D	(-)	(-)	(-)		(+)	(+)	ND	IA
Ue		(-)	$4.5 \times 10^3$		(+)	$6.0 \times 10^3$	D	(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	ND	
FE		(+)	$7.9 \times 10^3$	SG1	(+)	$2.2 \times 10^3$	D	(+)	(+)	(+)		(-)	(-)	ND	
RS	14/08/2006	(+)	(-)	a	(+)	$2.3 \times 10^3$	a	(-)	(-)	(-)		(+)	(+)	ND	IB
Ue		(-)	(-)		(+)	$2.9 \times 10^3$	a	(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	ND	
FE		(-)	(-)		(-)	$4.6 \times 10^3$		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	ND	
n positive/n total (%)		5/14 (35.7)	6/14 (42.8)		5/14 (35.7)	9/14 (64.2)		1/14 (7.1)	4/14 (28.5)			4/14 (28.5)	4/14 (28.5)	ND	
n positive/n total (%) <sup>b</sup>		7/14 (50.0%)			10/14 (71.0%)			4/14 (28.5%)				4/14 (28.5%)			

RS = Raw Sewage; Ue = UASB effluent; FE = Filtered effluent after post-treatment by three anaerobic filters; ND = not determined; GenBank accession numbers: HM244916–HM244917 (RV-A); HM244884–HM244886 (HAdV); HM244881 (NoV); HM244903–HM244906 (HAV).

a Not confirmed by nucleotide sequencing.

b Total frequency of detection using cPCR and qPCR assays.

**Table 4 – Results of cPCR, qPCR (genome copies/ml) and molecular characterization obtained at each sampling point from activated sludge process (WWTP-2).**

Samples	Date (day/mo/yr)	Viral results														
		RV-A				HAdV				NoV GII				HAV		
		cPCR	qPCR	Subgroup	cPCR	qPCR	Species/serotype	cPCR	qPCR	Genotype	cPCR	qPCR	Subgenotype			
317 RS	01/07/2008	(+)	$3.5 \times 10^6$	SG1	(+)	$4.1 \times 10^5$	D	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
318 ES		(+)	$2.9 \times 10^6$	SG1	(+)	$2.1 \times 10^5$	F/40	(-)	$7.4 \times 10^3$	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
319 RS	08/07/2008	(-)	$5.9 \times 10^3$		(+)	(-)	F/40	(-)	$9.7 \times 10^2$	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
320 ES		(+)	$3.1 \times 10^6$	SG1	(+)	$7.9 \times 10^2$	F/40	(-)	$1.1 \times 10^4$	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
321 ChLE		(-)	(-)		(-)	(-)		(-)	$2.3 \times 10^5$	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
322 RS	15/07/2008	(+)	$8.06 \times 10^6$	SG1	(+)	$1.2 \times 10^5$	C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	$1.3 \times 10^5$	(-)	(-)
323 ES		(+)	$3.8 \times 10^6$	SG1	(+)	$4.3 \times 10^5$	C	(+)	$2.3 \times 10^3$	GII/4	(+)	(+)	(+)	$6.8 \times 10^4$	(+)	IA
324 ChLE		(+)	(-)	SG1	(+)	$1.3 \times 10^5$	C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	$5.2 \times 10^4$	(-)	(-)
334 RS	18/07/2008	(+)	$1.03 \times 10^6$	SG1	(+)	$1.9 \times 10^5$	F/41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	$1.5 \times 10^4$	(+)	IA
335 ES		(+)	$2.9 \times 10^6$	SG1	(+)	(-)	F/41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	$6.1 \times 10^4$	(+)	IA
336 ChLE		(+)	$3.3 \times 10^6$	SG1	(-)	$1.3 \times 10^5$	F/41	(-)	$4.9 \times 10^2$	(-)	(-)	(-)	(-)	$5.7 \times 10^4$	(+)	IA
337 RS	22/07/2008	(+)	$9.6 \times 10^6$	SG1	(+)	(-)	F/41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	$2.1 \times 10^5$	(+)	IA
338 ES		(+)	$2.8 \times 10^6$	SG1	(+)	$2.7 \times 10^5$	D	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	$7.5 \times 10^3$	(+)	IA
339 ChLE		(+)	$7.1 \times 10^5$	SG1	(+)	$6.09 \times 10^5$	D	(+)	$2.1 \times 10^3$	GII/4	(+)	(+)	(+)	$5.5 \times 10^4$	(+)	IA
340 RS	24/07/2008	(+)	$7.04 \times 10^6$	SG1	(+)	$1.7 \times 10^2$	D	(-)	$1.2 \times 10^8$	(-)	(-)	(-)	(-)	$1.6 \times 10^5$	(-)	(-)
341 ES		(+)	$6.2 \times 10^6$	SG1	(+)	(-)	F/41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	$1.2 \times 10^3$	(-)	(-)
342 ChLE		(+)	$1.5 \times 10^4$	SG1	(+)	(-)	D	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	$5.9 \times 10^5$	(+)	IA
355 RS	29/07/2008	(-)	$3.5 \times 10^3$		(+)	(-)		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
356 ES		(+)	$1.5 \times 10^6$	SG1	(+)	$1.9 \times 10^5$	F/41	(-)	$7.6 \times 10^2$	(-)	(-)	(-)	(-)	$2.2 \times 10^3$	(-)	(-)
357 ChLE		(+)	$1.06 \times 10^4$	SG1	(-)	(-)		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
n positive/n total (%)		17/20 (85.0)	18/20 (90.0)		16/20 (80.0)	12/20 (60.0)		2/20 (10.0)	9/20 (45.0)		9/20 (45.0)	13/20 (65.0)		14/20 (70.0%)		
n positive/n total (%) <sup>a</sup>		19/20 (95.0%)		17/20 (85.0%)				9/20 (45.0%)								

RS = Raw Sewage; ES = effluent from sedimentation tank; ChLE = Chlorinated effluent.  
 GenBank accession numbers: HM244918–HM244934 (RV-A); HM244887–HM244902 (HAdV); HM244882–HM244883 (NoV); HM244907–HM244915 (HAV).  
<sup>a</sup> Total frequency of detection using cPCR and qPCR assays.



## 2.8. Sequence and phylogenetic analysis

Nucleotide (nt) sequences were edited and aligned with BioEdit® Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). The sequences were compared with their prototypes as well as with other sequences of the National Center for Biotechnology Information (NCBI/GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Phylogenetic trees were constructed using MEGA v.4.0 (Tamura et al., 2007) with the neighbor-joining method, using genetic distance corrected by the Kimura two-parameter model with 2,000 pseudoreplicates.

## 2.9. Nucleotide sequence accession numbers

The Genbank accession numbers for the sequences obtained in this study are HM244916 to HM244934 (RV-A), HM244884 to HM244902 (HAdV), HM244881 to HM244883 (NoV) and HM244903 to HM244915 (HAV).

## 2.10. Statistical analysis

For each type of virus analyzed, the total frequency of detection obtained in the same WWTP using conventional and/or quantitative PCR assays were compared by using chi-square test or Fisher's exact test at a significance level of 0.05. The same procedure was carried out for viruses' comparison between different WWTPs. The same statistical analysis was performed to determine the significant differences between cPCR or qPCR for each viral group found in the same WWTP. These analyses were made by use EPI InfoTM version 3.5.1 program, available in (<http://www.cdc.gov/epiinfo/epiinfo.htm>).

# 3. Results

## 3.1. Physicochemical parameters

The pH values obtained from both sedimentation tank and chlorinated effluent in WWTP-2 were slightly acidic. The BOD<sub>5</sub>/COD ratios in WWTP-1 and WWTP-2 were of 0.25 and 0.33, respectively, indicating that chemical substances could be present at relative high concentrations despite satisfactory removal efficiencies of BOD<sub>5</sub>, COD and ammonium (Table 2).

## 3.2. Virus detection

Table 3 (WWTP-1) and 4 (WWTP-2) present the total detection frequency of each viral group using cPCR and qPCR. According to results, at least one virus was detected in 86% of samples in WWTP-1 and 100% in WWTP-2. HAdV was found the most prevalent in WWTP-1, followed by RV-A, HAV and NoV GII (Table 3). The differences in the total frequencies of viruses' detection in WWTP-1 were significant between HAdV and NoV GII ( $p = 0.02$ , Chi-square) and HAdV and HAV ( $p = 0.02$ , Chi-square).

In WWTP-2, RV-A was found the most prevalent virus, followed by HAdV, HAV and NoV GII (Table 4). Similarly to WWTP-1, the frequency of detection between RV-A and HAdV was not significant ( $p = 0.30$ , Fisher), but differences were significant between RV-A and NoV GII ( $p = 0.0005$ , Chi-

square), RV-A and HAV ( $p = 0.04$ , Fisher) and between HAdV and NoV GII ( $p = 0.008$ , Chi-square).

NoV GI was identified by qPCR in one raw sewage sample (1/14 [7.0%]) from WWTP-1 and in two effluent samples (2/20 [10.0%]) from sedimentation tank in WWTP-2, where NoV GII was statically more frequent ( $p = 0.01$ , Chi-square) than NoV GI.

The comparison of the viruses detection obtained from different WWTPs showed higher frequencies detection for all viruses in WWTP-2 than WWTP-1, but these differences were statistically significant only for RV-A ( $p = 0.003$ , Fisher) and HAV ( $p = 0.01$ , Chi-square).

In both WWTP no significant statistical differences were found between cPCR and qPCR detection frequencies for all viruses, except for NoV GII found in WWTP-2, where qPCR was more sensitive ( $p = 0.01$ , Chi-square).

The mean values of viral loads (genome copies (GC)/ml) obtained from each stage of the sewage treatment processes are shown in Table 5. Viral loads were observed even after post-treatment by three anaerobic filters in WWTP-1 and after disinfection by chlorination in WWTP-2 for almost all viruses analyzed (Table 5). Higher viral loads were obtained for RV-A in all stages in both WWTPs compared with other viruses analyzed in these treatment systems. HAV presented the second-highest mean viral loads in all stages in WWTP-2 (Table 5). The mean values (GC/ml) of NoV GI were lower ( $1.4 \times 10^1$  GC/ml) than other viruses analyzed in both WWTPs.

## 3.3. Molecular characterization

Molecular characterization of the viruses detected was based on the nt sequence of cPCR products obtained according methods described previously (section 2.8). Nt sequences were compared to respective prototypes and other strains available in GenBank/NCBI in order to genotype strains as demonstrated at Tables 3 and 4. All RV strains sequenced were determined to belong to RV-A SG I with nt-identity ranging 92.6%–95.9% (WWTP-1, Table 3) and 94.1%–95.9% (WWTP-2, Table 4) with prototype strain (EF426124 GenBank accession number).

For HAdV, the partial sequence of genome characterized 3 species D (WWTP-1, Table 3); 8 species F distinctly clustered (3 serotype 40 and 5 serotype 41), 5 species D and 3 species C (WWTP-2, Table 4). For specie F (serotype 40) the percentages of nt-identity ranged from 99.4% to 100.0% and for serotype 41 the nt-identity ranged from 92.6% to 95.4% with prototype strain (NC001454 GenBank accession number), for specie D (WWTP-1) and (WWTP-2) the nt-identity ranged from 98.8% to 99.4% and 96%–97.7%, respectively, with prototype strain (NC002067 GenBank accession number) and for specie C, the nt-identity ranged 98.3%–98.8% with prototype strain (NC001405 GenBank accession number). HAdV specie C (322 – WWTP-2) ranged 100.0% nt-identity with adenovirus type 2 (EU334498 – GenBank accession number) obtained from children with acute respiratory disease in Brazil.

All NoV strains sequenced (Tables 3 and 4) clustered with GII/4 genotype, ranging 91.1% of nt-identity with GII/4 prototype (X76716 – Bristol – GenBank accession number). NoV strain sequenced from WWTP-1 (Table 3) obtained a high homology (98.2% nt-identity) with NoV GII/4 (AB447453 – GenBank accession number) isolated from clinical sample in



**Table 5 – Arithmetic mean value (genome copies/ml) obtained from different stages of sewage treatment processes using real time PCR.**

WWTPs	Stages of sewage treatment processes (n = total samples)			RV-A			HADV			NoV GI			HAV		
	n positive	Mean/SD	n positive	Mean/SD	n positive	Mean/SD	n positive	Mean/SD	n positive	Mean/SD	n positive	Mean/SD			
1	RS (n = 5)	1.7 × 10 <sup>3</sup> /3.8 × 10 <sup>5</sup>	3	5.0 × 10 <sup>3</sup> /1.0 × 10 <sup>4</sup>	1	3.6 × 10 <sup>2</sup> /8.0 × 10 <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	Ue (n = 5)	4.2 × 10 <sup>3</sup> /4.5 × 10 <sup>3</sup>	3	1.0 × 10 <sup>3</sup> /1.3 × 10 <sup>3</sup>	2	2.2 × 10 <sup>3</sup> /4.8 × 10 <sup>2</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	FE (n = 4)	1.9 × 10 <sup>3</sup> /3.9 × 10 <sup>3</sup>	3	2.8 × 10 <sup>3</sup> /2.1 × 10 <sup>3</sup>	1	2.4 × 10 <sup>3</sup> /4.8 × 10 <sup>3</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	RS (n = 7)	4.1 × 10 <sup>3</sup> /4.0 × 10 <sup>6</sup>	4	1.0 × 10 <sup>3</sup> /1.5 × 10 <sup>3</sup>	2	3.1 × 10 <sup>3</sup> /5.3 × 10 <sup>2</sup>	4	2.1 × 10 <sup>4</sup> /4.8 × 10 <sup>4</sup>	5	1.9 × 10 <sup>4</sup> /3.0 × 10 <sup>4</sup>	4	2.8 × 10 <sup>2</sup> /2.8 × 10 <sup>4</sup>			
	ES (n = 7)	8.3 × 10 <sup>3</sup> /1.3 × 10 <sup>8</sup>	5	1.6 × 10 <sup>3</sup> /1.5 × 10 <sup>3</sup>	4	3.0 × 10 <sup>3</sup> /4.3 × 10 <sup>3</sup>	3	8.1 × 10 <sup>2</sup> /1.0 × 10 <sup>3</sup>	4	2.8 × 10 <sup>2</sup> /2.8 × 10 <sup>4</sup>	4	2.8 × 10 <sup>2</sup> /2.8 × 10 <sup>4</sup>			
	Chl.E (n = 6)	1.2 × 10 <sup>5</sup> /2.8 × 10 <sup>5</sup>	3	1.4 × 10 <sup>3</sup> /2.3 × 10 <sup>3</sup>	3	8.1 × 10 <sup>2</sup> /1.0 × 10 <sup>3</sup>									

RS = raw sewage; Ue = UASB effluent; FE = filtered effluent; ES = effluent from sedimentation tank; Chl.E = chlorinated effluent; SD = standard deviation; ND = not determined; WWTP-1 = anaerobic process; WWTP-2 = activated sludge process.

Japan, 2006, that appointed the circulation of new variants of NoV during that period.

For HAV, 2 strains from WWTP-1 belonged to subgenotype IA (94.6% and 94.0%) nt-identity with prototype strain (HAS-15 – X15464 GenBank accession number), and two strains were characterized as subgenotype IB (Table 3), ranging from 91% to 92.2% of nt-identity with respective prototype strain (HM-175 – M14707 GenBank accession number). In WWTP-2, all strains sequenced fall into subgenotype IA with percentages of nt-identity ranging from 94.6% to 95.2% with prototype strain HAS-15.

## 4. Discussion

### 4.1. Hospital WWTPs and viral detection

The load of pathogenic viruses found in effluents from WWTPs used in healthcare facilities are not well known yet as well as its potential to eliminate these agents. The pollution of water bodies and dissemination of pathogens in the environment could be minimized by suitable alternative sewage treatments. However, the construction, maintenance and operation of hospital WWTPs can mean additional costs to health systems meaning therefore that such systems should be more economically viable.

Anaerobic processes for wastewater treatment are encouraged in Brazil, and a system of alternative treatment (UASB reactor with post-treatment by three anaerobic filters) was designed to treat sewage from a hospital in Rio de Janeiro. However, UASB reactors with post-treatment by three anaerobic filters arranged in series are not commonly reported and data on the effectiveness of such treatment in the removal of organic matter and pathogenic microorganisms should be validated. A previous study on the use of sewage samples from the same WWTP-1 evaluated the presence of multidrug-resistant Enterobacteriaceae to antibiotics and demonstrated the potential for spread of multidrug-resistant bacteria in the environment (Prado et al., 2008).

In this study the potential of environmental contamination by organic matter and enteric viruses present in treated effluents from hospital WWTP-1 (anaerobic process) was compared with viruses' detection found in treated effluents from another hospital WWTP-2 (activated sludge process).

Regarding analysis of physicochemical parameters it was demonstrated that concentrations of BOD<sub>5</sub> and COD found during the stages of sewage treatment processes were lower when compared to data observed in other studies (Rezaee et al., 2005; Emmanuel et al., 2005, 2009). In both WWTPs the COD concentrations were higher than BOD<sub>5</sub>. At BOD<sub>5</sub>/COD < 5, persistent chemical substances could be present in these effluents and delay biological treatment processes (Emmanuel et al., 2005). However, drugs, disinfectants and other chemical substances possibly present in hospital wastewater did not seem to affect the systems' performance.

The high viral load found in effluents from both WWTPs indicates that these hospital wastewaters contain great loads of enteric viruses, mainly RV-A and HAV found in WWTP-2. The excessive number of patients at this hospital and higher inflow of wastewater seems to have influenced the results.



Mean viral loads of HAV found in hospital wastewaters in WWTP-2 were approximately 2 log higher than mean values of HAV quantified in wastewaters of an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil (Villar et al., 2007).

The viral concentrations detected in treated effluents from UASB reactor corroborated for data about the limited effectiveness of the system in the removal of pathogenic microorganisms (Ottoson et al., 2006; Prado et al., 2008). Post-treatment with three anaerobic filters is relatively inexpensive to build, operate, and maintain as a complementary treatment for removal of organic matter. However, high viral loads were detected even after post-treatment with anaerobic filters, suggesting that these treatment processes do not have a good performance to eliminate pathogenic viruses.

Membrane bioreactor (MBR) processes, have been suggested as better alternatives for removal of pathogenic microorganisms, including some viruses (Ottoson et al., 2006; Zhang and Farahbakhsh, 2007). However, high installation and maintenance costs may limit their use in developing countries, particularly considering hospital settings.

Results also suggest that chlorination of the effluents in WWTP-2 do not enable a satisfactory removal of viruses. Resistance of viruses in chlorinated effluents from WWTPs has been reported (Tyrrell et al., 1995; Carducci et al., 2008; Petrinca et al., 2009) and could be due to the presence of organic matter in effluents (Petrinca et al., 2009), which could facilitate the aggregation of virus.

Some factors could be attributed to disinfection of viruses using chlorination: chlorine concentration  $\times$  contact time (CT values), temperature (Lim et al., 2010), ionic strength and pH (Cromeans et al., 2010). Also, viral inactivation can be variable according to intrinsic characteristics of each type of virus and among different environmental samples (Espinosa et al., 2008; Cromeans et al., 2010).

Moreover, Lim et al. (2010) appointed that a great proportion of viruses detected by PCR after disinfection with chlorine could be related to the lengths of the amplicons (short templates) used in the amplification reactions by PCR, which underestimates viral inactivation. A controversial study demonstrated that virus infectivity was correlated with the persistence of viruses' genetic material detected by PCR after chlorination in water samples, suggesting that molecular techniques would be suitable for detecting viruses in water (Espinosa et al., 2008).

#### 4.2. Methods for detecting enteric viruses in hospital wastewater

The method that uses a type-HA negatively charged membrane filter (Katayama et al., 2002) seems appropriate for concentrating enteric viruses in hospital sewage samples. However, the pre-filtration of sewage samples (2 l) through an AP 20 membrane filter (Millipore) retained part of the suspended solids in which some viruses could be aggregated. There is a hypothesis that viral concentration obtained in this study, mainly in raw sewage samples would be probably higher than the observed. Katayama et al. (2008) evaluated the effectiveness of this concentration method for detecting poliovirus type 1 (PV-1) in sewage samples from WWTPs and found mean recovery yields of 23.0% for PV-1 recovered from

100 mL of raw sewage, 80.0% and 65.0% for PV-1 recovered in 1000 mL of secondary treated effluents and treated effluents, respectively. The evaluation of recovery yields of viruses using different concentration methods should be important for studies of viral removal efficiency in WWTPs.

This study has evaluated the applicability of molecular methods to detect gastroenteric viruses and HAV in hospital sewage samples. No statistically significant difference was found between cPCR and qPCR for detecting viruses, except with NoV GI. The improvement of qPCR over cPCR for detecting NoV in sewage samples was also found by Victoria et al. (2009). The lengths of the amplicons obtained by qPCR (very short template) could explain a better performance when using this method in relation to cPCR used for amplifying the polymerase region of NoV. Similar results were not observed for RV detection, where the length of the amplicons obtained by qPCR was found lower than the one obtained by cPCR. Studies have demonstrated that different PCR protocols and primer sets may result in varying detection and quantification results (Bofill-Mas et al., 2006; Ferreira et al., 2009; Victoria et al., 2009). Moreover, qPCR is not always more sensitive than conventional PCR (Bastien et al., 2008), and an ongoing assessment of these methods are needed for detecting different types of viruses in environmental samples.

Generally, PCRs have been considered as useful tools in environmental virology studies, especially due their specificity and sensitivity to detect a few viral genomic copies in several environmental matrices (Girones et al., 2010). Molecular methods can also be used to detect viruses that are not traditionally cultivable in cell cultures, such as human norovirus (NoV), and fastidious viruses such as rotavirus (RV-A) and human hepatitis A virus (HAV).

Some studies have demonstrated that there are a great proportion of viral genomes detected by PCR in environmental samples that corresponds to infectious viral particles (Espinosa et al., 2008; Barrella et al., 2009). Moreover, viral concentration methods could play an important role in the recovery of intact virions versus naked genomes. Haramoto et al. (2007a) demonstrated that the adsorption-elution method using a type-HA negatively charged membrane filter for viral concentration in water samples is appropriate for detecting intact viral particles predominantly.

Methods that combine features of cell culture and molecular methods for a rapid, sensitive detection of infective virus particles detected in water samples have been developed (Cantera et al., 2010) and is found promising to be used in the future.

#### 4.3. Molecular characterization

RV is the leading cause of acute gastroenteritis in children worldwide (Parashar et al., 2006). Viral genome detection in environmental samples could contribute to the characterization of RV-A load in several geographic settings, mainly for monitoring prevalent genotypes after the introduction of the rotavirus national vaccination program, in March 2006 (Leite et al., 2008).

In this study, RV-A detection in two hospital WWTPs showed high frequencies of detection and viral loads, suggesting that these viruses remain disseminated widely in our



region. Higher prevalence of RV-A in relation to other gastroenteric viruses in environmental samples has been reported in Brazil (Miagostovich et al., 2008; Ferreira et al., 2009). Molecular characterization based on partial amplification of VP6 gene demonstrated that the circulation of RV-A SG I differed from results obtained from RV-A detected in sewage samples, in Rio de Janeiro 2005, in which all RV-A strains belonged to SG II (Ferreira et al., 2009).

VP6 is a trimeric protein that interacts with the inner-layer protein VP2 and with the two outer-layer proteins VP7 and VP4 (Iturriza Gómara et al., 2002). Previous study provided evidence on independent segregation of the genes encoding VP7 and VP4 in reassortant rotavirus strains, where G1 P[8] strains are associated with a VP6 of SG II, while G2 P[4] strains are associated with a VP6 of SG I (Iturriza Gómara et al., 2002). In fact, in last years there has been a remarkable reemergence of G2 P[4] RV-A in Brazil, but it seems to reflect a continental phenomenon (Leite et al., 2008) that is not associated necessarily with vaccination. Further epidemiological studies should be conducted to look for additional changes in the post-vaccination era.

HAdV is also one of the main causes associated with different clinical syndromes including gastroenteritis, respiratory diseases, conjunctivitis, hemorrhagic cystitis and exanthema (Ishiko et al., 2008). HAdV was the most prevalent pathogen detected in WWTP-1 and the second most prevalent in WWTP-2. None statistically significant difference was obtained between detection frequencies of effluents from both WWTPs, indicating that this type of virus would be regularly excreted in these environments. The variety of species and serotypes that cause several diseases could contribute for wide dissemination of HAdV in the environment.

Interestingly, specie F (enteric serotypes 40 and 41) was not detected in WWTP-1, as expected in environmental samples (Haramoto et al., 2007b), but it was detected in 50% of HAdV strains sequenced from WWTP-2. The prevalence of enteric serotype (40 and 41) of HAdV had been reported in acute gastroenteritis cases in hospitalized children from Rio de Janeiro and Salvador, Brazil (Pereira-Filho et al., 2007). HAdV species C and D, that include serotypes associated frequently with respiratory tract infections and nosocomial keratoconjunctivitis cases (Ishiko et al., 2008) were detected in 50% of samples analyzed from WWTP-2 indicating that the prevalence of species can vary according to the type of environment evaluated.

NoV is transmitted mainly through contaminated water or food and has been related in outbreaks that occur frequently in schools, hospital, restaurants, among others (Tan and Jiang, 2007). The low detection of NoV GI found in this study is in accordance with other studies that reports lower frequencies of this genogroup when compared to GII in clinical and sewage samples in Rio de Janeiro, Brazil (Victoria et al., 2007, 2009). The clustering of NoV strains obtained in this study with NoV GI/4 prototypes corroborates with data that demonstrates that this genotype is the most prevalent worldwide (Siebenga et al., 2007).

Economic development combined with improvement of sanitation services, mainly drinking and piped water supply, has contributed to a shift from a high to medium endemicity of HAV infection in Brazil (Vital et al., 2008). Although all

forms of viral hepatitis are considered diseases of compulsory notification, data on the incidence of HAV in the country are still incomplete due to insufficient information on notified cases and the fact that sometimes the aetiology of the infection is not investigated fully in the country (Vital et al., 2008). In fact, HAV outbreaks have been occurring in Brazilian communities, considering water as the source of infection (De Paula et al., 2002, 2007), mainly in locations with less sanitation (Silva et al., 2007) showing a high detection of HAV obtained from Brazilian environmental samples (De Paula et al., 2007; Villar et al., 2007).

The most of human HAV strains have been found belonging to genotype I, in which subgenotype IA predominates over subgenotype IB in South American countries (Costa-Mattioli et al., 2001), corroborating with data obtained in this study. However, the co-circulation of IA and IB subgenotypes in clinical and environmental samples in Brazil have also been identified as well as reported in this study carried out with hospital wastewaters samples in 2006, providing important information on the circulating genotypes of HAV strains in Brazil (De Paula et al., 2002, 2007; Villar et al., 2007).

## 5. Conclusion

- (1) Results showed that both WWTPs are not suitable systems for removal of gastroenteric viruses and HAV present in hospital wastewaters.
- (2) Hospital wastewaters can be contaminated by high load of enteric viruses, but the frequencies of detection and quantification results could be variable according to virus' type and effluents coming from different health care centers.
- (3) RV-A could be considered the main responsible for acute gastroenteritis cases in the periods analyzed.
- (4) The prevalence of viral genotypes in hospital sewage samples demonstrated that environmental and molecular approach could provide viruses' distribution, mainly in the absence of an accurate clinical diagnostic. Viral circulation pattern into the environment could be influenced by each geographic region and the epidemiological community profile. Other species of HAdV, associated generally with respiratory tract diseases and keratoconjunctivitis cases could be easily detected in hospital wastewaters.
- (5) This is the first study concerning the detection, quantification and molecular characterization of several types of gastroenteric viruses and HAV in effluents from different hospital WWTPs carried out in Brazil. Studies on the performance of current WWTP processes for removing pathogenic microorganisms should be encouraged to support the sanitary authorities to improve policies on wastewater management.

## Acknowledgements

This work was financially sponsored by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil and by CGVAM/Ministry of Health, Brazil. The authors thank the staff of PDTIS DNA Sequence Platform at FIOCRUZ (RPT01A) for technical support in sequencing reactions.



## REFERENCES

- Allard, A., Albinsson, B., Wadell, G., 2001. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 498–505.
- American Public Health Association–APHA, 1998. *Standard Methods for the Examination Water and Wastewater*, twentieth ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Barrella, K.M., Garrafa, P., Monezi, T.A., Hársi, C.M., Salvi, C., Violante, P.A.B.C., Mehnert, D.U., 2009. Longitudinal study on occurrence of adenoviruses and hepatitis A virus in raw domestic sewage in the city of Limeira, São Paulo. *Braz. J. Microbiol.* 40, 102–107.
- Bastien, P., Procop, G.W., Reischl, U., 2008. Quantitative Real-Time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1897–1900.
- Bofill-Mas, S., Gimenez, N.A., Casares, P.C., Hundesa, A., Manzano, J.R., Allard, A., Calvo, M., Girones, R., 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7894–7896.
- Bosch, A., Guix, S., Sano, D., Pintó, R.M., 2008. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19 (3), 295–301.
- Boxman, I.L.A., Tilburg, J.J.H.C., Te Loeke, N.A.J.M., Vennema, H., Jonker, K., Boer, E., Koopmans, M., 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 391–396.
- Cantera, J.L., Chen, W., Yates, M.V., 2010. Detection of infective poliovirus by a simple, rapid, and sensitive flow cytometry method based on fluorescence resonance energy transfer technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 584–588.
- Carducci, A., Morici, P., Pizzi, F., Battistini, R., Rovini, E., Verani, M., 2008. Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Water Sci. Technol.* 58, 893–897.
- Cromeans, T.L., Kahler, A.M., Hill, V.R., 2010. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (4), 1028–1033.
- Costa-Mattioli, M., Ferré, V., Monpoeho, S., Garcia, L., Colina, R., Billaudel, S., Vega, I., Perez-Bercoff, R., Cristina, J., 2001. Genetic variability of hepatitis A virus in South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemic outbreaks. *J. Gen. Virol.* 82, 2647–2652.
- De Paula, V.S., Baptista, M.L., Lampe, E., Niel, C., Gaspar, A.M.C., 2002. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro. *Braz. J. Med. Virol.* 66, 22–27.
- De Paula, V.S., Diniz-Mendes, L., Villar, L.M., Luz, S.L.B., Silva, L.A., Jesus, M.S., Da Silva, N.M.V.S., Gaspar, A.M.C., 2007. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res.* 41, 1169–1176.
- Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J.M., Vermande, P., 2005. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J. Hazard. Mater.* 117, 1–11.
- Emmanuel, E., Pierre, M.G., Perrodin, Y., 2009. Groundwater contamination by microbiological and chemical substances released from hospital wastewater: health risk assessment for drinking water consumers. *Environ. Int.* 35, 718–726.
- Espinosa, A.C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., Arias, C.F., 2008. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Res.* 42, 2618–2628.
- Ferreira, F.F.M., Guimarães, F.R., Fumian, T.M., Victoria, M., Vieira, C.B., Luz, S., Shubo, T., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., 2009. Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type, G-type and subgroup characterization. *Water Sci. Technol.* 60, 633–642.
- Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa, A.B., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas, 2010. Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 44, 4325–4339.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S., 2007a. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *J. Virol. Methods* 142, 169–173.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S., 2007b. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2153–2159.
- Heim, A., Ebnet, C., Harste, G., 2003. Pring-Akerblom, P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J. Med. Virol.* 70, 228–239.
- Ishiko, H., Shimada, Y., Konno, T., Hayashi, A., Ohguchi, T., Tagawa, Y., Aoki, K., Ohno, S., Yamazaki, S., 2008. Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J. Clin. Microbiol.* 46 (6), 2002–2008.
- Iturriza-Gómara, M.I., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U., Gray, J., 2002. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates, correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J. Virol.* 76, 6596–6601.
- Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of a virus concentration method and its Application to detect of Enterovirus and Norwalk virus from Coastal Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1033–1039.
- Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S., 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.* 42, 1441–1448.
- Leite, J.P.G., Carvalho-Costa, F.A., Linhares, A.C., 2008. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience – A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103 (8), 745–753.
- Lim, M.Y., Kim, J.M., Ko, G., 2010. Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. *Water Res.* 44, 3243–3251.
- Miagostovich, M.P., Ferreira, F.F.M., Guimarães, F.R., Fumian, T.M., Diniz-Mendes, L., Luz, S.L.B., Silva, L.A., Leite, J.P.G., 2008. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 375–382.
- Otto, T.D., Vasconcellos, E.A., Gomes, L.H.F., Moreira, A.S., Degraive, W.M., Mendonça-Lima, L., Alves-Ferreira, M., 2008. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet. Mol. Res.* 7, 861–871.
- Ottoson, J., Hansen, A., Bjorlenius, B., Norder, H., Stenstrom, T.A., 2006. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. *Water Res.* 40, 1449–1457.
- Pang, X.L., Preiksaitis, J.K., Lee, B., 2005. Multiplex real-time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J. Clin. Virol.* 33, 168–171.
- Pamshar, U.D., Gibson, C.J., Breesee, J.S., Glass, R.I., 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2), 304–306.



- Pereira-Filho, E., Faria, N.R.C., Fialho, A.M., Assis, R.S., Almeida, M.M.S., Rocha, M., Galvão, M., Santos, F.B., Barreto, M.L., Leite, J.P.G., 2007. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J. Med. Microbiol.* 56, 313–319.
- Petrinca, A.R., Donia, D., Pierangeli, A., Gabrieli, A.M., Degener, A. M., Bonanni, E., Diaco, L., Cecchini, G., Anastasi, P., Divizia, M., 2009. Presence and environment circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1608–1617.
- Prado, T., Pereira, W.C., Silva, D.M., Seki, L.M., Carvalho, A.P.D., Asensi, M.D., 2008. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 136–141.
- Rezaee, A., Ansari, M., Khavanin, A., Sabzali, A., Aryan, M.M., 2005. Hospital wastewater treatment using an integrated anaerobic aerobic fixed film bioreactor. *Am. J. Environ. Sci.* 1 (4), 259–263.
- Siebenga, J.J., Vennema, H., Renckens, H., Bruin, E., Van der Veer, B., Siezen, R.J., Koopmans, M., 2007. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J. Virol.* 81, 9932–9941.
- Silva, P.C., Vitral, C.L., Barcellos, C., Kawa, H., Gracie, R., Rosa, M.L. G., 2007. Hepatitis A in the city of Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological pattern and socio-environmental variables. In: Cross-analysis of SINAN and population census data, vol. 23. *Cad. Saude Publica, Rio de Janeiro.* 1553–1564.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA 4: molecular Evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Tan, M., Jiang, X., 2007. Norovirus-host interaction: implications for disease control and prevention. *Expert Rev. Molecular Medicine* 9 (19), 1–22.
- Tyrrill, S.A., Rippley, S.R., Watkins, W.D., 1995. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. *Water Res.* 29 (11), 2483–2490.
- Victoria, M., Carvalho-Costa, F.A., Heinemann, M.B., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., 2007. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26, 602–606.
- Victoria, M., Guimarães, F.R., Fumian, T.M., Ferreira, F.F.M., Vieira, C.B., Shubo, T., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., 2009. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Water Health* 8, 158–165.
- Villar, L.M., De Paula, V.S., Diniz-Mendes, L., Guimarães, F.R., Ferreira, F.F.M., Shubo, T.C., Miagostovich, M.P., Lampe, E., Gaspar, A.M.C., 2007. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 168–173.
- Vitral, C.L., Souto, F.J., Gaspar, A.M.C., 2008. Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: reassessing immunization policy. *J. Viral. Hepat.* 15 (Suppl. 2), 22–25.
- Wang, X.W., Li, J., Guo, T., Zhen, B., Kong, Q., Yi, B., Li, Z., Song, N., Jin, M., Xiao, W., Zhu, X., Gu, C., Yin, J., Wei, W., Yao, W., Liu, C., Li, J., Ou, G., Wang, M., Fang, T., Wang, G., Qiu, Y., Wu, H., Chao, F., Li, J., 2005. Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from in XiaoTang Shan Hospital and the 309th Hospital of the Chinese People's liberation army. *Water Sci. Technol.* 52 (8), 213–221.
- Zeng, S.Q., Halkosalo, A., Salminen, M., Szakal, E.D., Puustinen, L., Vesikari, T., 2008. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J. Virol. Methods* 153, 238–240.
- Zhang, K., Farahbakhsh, K., 2007. Removal of native coliphages and coliform bacteria from municipal wastewater by various wastewater treatment processes: implications to water reuse. *Water Res.* 41, 2816–2824.



**5.2. Monitoring Hepatitis A Virus in Urban Wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. (Revista: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 106, pág 104-109, 2012 )**

Author's personal copy

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 106 (2012) 104–109



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Transactions of the Royal Society of  
Tropical Medicine and Hygiene

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/trstmh>



## Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil

Tatiana Prado<sup>a,\*</sup>, Tulio M. Fumian<sup>b</sup>, Marize P. Miagostovich<sup>b</sup>, Ana Maria C. Gaspar<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Technological Development in Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 April 2011

Received in revised form 5 October 2011

Accepted 5 October 2011

Available online 17 November 2011

#### Keywords:

Hepatitis A virus

Activated sludge process

Subgenotypes

### ABSTRACT

Hepatitis A is a viral disease with a significant public health impact, especially in developing countries. Improvements in sewage services could prevent hepatitis A virus (HAV) dissemination into the environment and minimize the risk of infection. The aim of this study was to monitor HAV for one year in urban sewage samples from the largest wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil to assess environmental contamination with HAV and its dissemination after treatment by an activated sludge process. For this purpose, 48 samples (24 raw sewage samples and 24 treated effluent samples) were collected from August 2009 to July 2010 for HAV detection.

Using quantitative real-time PCR 14 (58%) raw sewage samples were positive for HAV, and the highest viral genome loads were detected in the spring and summer. HAV was not detected in treated effluent samples, which suggests that the viral loads observed could be easily removed by the activated sludge process, thus preventing the dissemination of HAV into the environment. All of the HAV strains sequenced belonged to subgenotype IA, which clustered closely with Brazilian and Argentine HAV strains. These data demonstrate that environmental monitoring can be a useful tool in epidemiological studies.

© 2011 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Hepatitis A virus (HAV) is a non-enveloped RNA virus that is 27 to 32 nm in diameter, has icosahedral symmetry, and belongs to the genus *Hepatovirus* of the *Picornaviridae* family. Hepatitis A virus has a single-stranded, 7.5 kb genome with positive polarity.<sup>1,2</sup>

Genetic analysis of the selected genome regions has suggested that distinct genotypes can be found in different locations. At least seven HAV genotypes have been identified around the world, initially including four human

genotypes (I, II, III and VII) and three simian genotypes (IV, V and VI).<sup>3</sup> However, further investigation has suggested that genotype VII should be reclassified as a subgenotype of genotype II, based upon analysis of the complete virion protein (VP1) sequence.<sup>4</sup> Genotype I (subdivided into two subgenotypes IA and IB) is prevalent among the HAV strains that are detected in human infections worldwide.<sup>1,3,5</sup>

Hepatitis A virus is commonly transmitted by the faecal-oral route, either directly from person to person or via contaminated food or water.<sup>2</sup> Contaminated water is frequently considered a potential source of HAV transmission, and some studies have demonstrated that the virus is present in polluted aquatic environments in Brazil.<sup>6–8</sup>

In Latin America, 350 000–400 000 new cases of HAV infection are estimated to occur per year, and the mortality rate in patients under 15 years of age is

\* Corresponding author. Present address: Av. Brasil 4.365 Manguinhos CEP 21040-360 Rio de Janeiro RJ Brazil. Tel.: +5521 2562 1900; fax: +5521 2562 1711.  
E-mail address: [tprado@ioc.fiocruz.br](mailto:tprado@ioc.fiocruz.br) (T. Prado).



3000 deaths/year.<sup>9</sup> In Brazil, between 2000 and 2005, approximately 14 000–21 000 cases of hepatitis A are reported annually, and the incidence of infection is variable across the distinct geographical regions, with the highest rates in the north and northeast regions.<sup>10</sup>

Due to economic development and improvements in sanitation conditions, mainly affecting the drinking water supply, the endemicity pattern has decreased from a high to an intermediate level in Brazil.<sup>10</sup> As a consequence of this changing pattern, infection susceptibility has proportionally increased which has resulted in a higher incidence among older people who are at risk of developing more severe disease symptoms.<sup>11</sup>

Brazil has not adopted a routine vaccination policy<sup>10</sup> and plans to prevent infection through better sanitation conditions in the poorest regions.<sup>11</sup> Monitoring HAV in environmental samples is not a common practice in Brazil, and there is little information on either viral contamination levels in aquatic environments or the efficacy of virus removal through wastewater treatment plants (WWTPs) that operate at full-scale.<sup>7,8,12</sup>

Therefore, the aim of this study was to monitor HAV for one year in urban wastewater samples from the largest WWTP in Rio de Janeiro, Brazil to assess environmental contamination with HAV and its dissemination after an activated sludge process. The HAV genome load was measured using real-time PCR, and the positive samples were submitted for partial amplification of the virion protein 1 and 2A genes (VP1/2A) and nucleotide sequencing to confirm the quantitative real-time PCR (qPCR) results and determine the prevalent genotypes in the study area.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Wastewater treatment plants and sample collection

The urban WWTP analysed in this study is located in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, which is served by a separate sewer system. This WWTP is the largest in Rio de Janeiro and receives urban sewage from approximately 1 500 000 inhabitants (24.6% of the population), including those residents in the central and peripheral regions of the city.<sup>13</sup>

The plant employs a secondary treatment process (an aerobic process using conventional activated sludge) with a mean inflow of  $2500\text{ l s}^{-1}$ . The treatment process begins with a preliminary treatment and primary sedimentation at a hydraulic retention time (HRT) of 2 h. There are four aeration tanks in parallel ( $11\,500\text{ m}^3$  per tank) that have the capacity to treat  $625\text{ l s}^{-1}$  of effluent at an HRT of 5 h. Secondary sedimentation is performed in four secondary settling tanks ( $8800\text{ m}^3$  each) with an HRT of 4 h. The total HRT for the system is approximately 12 h. The final effluents are not chlorinated.

Treated effluent from the WWTP is discharged into Guanabara Bay ( $22^{\circ}40'–23^{\circ}00'$  S and  $43^{\circ}00'–43^{\circ}20'$  W; area:  $380\text{ km}^2$ ), which is an ecosystem that surrounds a large part of the city, including the ports. Fishing, recreational practices and tourism are frequent in this ecosystem.

During this study, a total of 48 sewage samples were collected bi-monthly (at 15 day intervals) for one year (August 2009 to July 2010). Twenty-four samples from raw sewage and 24 samples from treated effluents were collected. For each sample, 100 ml of sewage was collected in sterile plastic bottles, stored at  $4^{\circ}\text{C}$  and transported to the laboratory for immediate analysis.

### 2.2. Concentration method

The viruses were concentrated using an ultracentrifugation-based method, as previously described.<sup>14</sup> For the procedure, 42 ml of each sewage sample was concentrated to a final volume of 2 ml. All of the concentrated samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until the molecular biology analysis.

### 2.3. Viral genomic extraction and reverse transcription reaction

Nucleic acids were extracted from  $300\text{ }\mu\text{l}$  of concentrated sample using the glass powder method described previously<sup>15</sup> to extract the RNA in  $60\text{ }\mu\text{l}$ .

cDNA synthesis was performed using reverse transcription (RT) with a random primer (PdN<sub>6</sub>; 50A<sub>260</sub> units; Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK). First,  $2\text{ }\mu\text{l}$  dimethyl sulphoxide (Sigma, St. Louis, MO, USA) and  $13\text{ }\mu\text{l}$  RNA were mixed briefly, heated at  $97^{\circ}\text{C}$  for 7 min, and chilled on ice for 4 min. The components of the mixture and their final concentrations in a  $50\text{-}\mu\text{l}$  RT reaction were as follows:  $2.5\text{ mM}$  each deoxynucleoside triphosphate (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA),  $1.5\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ , 200 U Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen), and  $1\text{ }\mu\text{l}$  of PdN<sub>6</sub>. The RT reaction mixture was incubated in a thermal cycler (PTC-100 Programmable Thermal Controller; MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) at  $25^{\circ}\text{C}$  for 5 min,  $50^{\circ}\text{C}$  for 60 min and  $70^{\circ}\text{C}$  for 20 min.

### 2.4. Quantitative real-time PCR

The 5' noncoding region of the HAV genome was used for amplification and absolute quantification via the TaqMan qPCR assay. The primers and probe, amplification positions on the genome, standard curve and thermal cycling conditions have been described previously.<sup>6,16</sup> The qPCR reaction was performed with  $5\text{ }\mu\text{l}$  of cDNA at a final volume of  $25\text{ }\mu\text{l}$  using the Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). The amplification data were collected and analysed using Sequence Detection Software version 1.0 (Applied Biosystems). All of the reactions were performed in duplicate and the samples were considered positive when one or two tubes fluoresced and had a cycle threshold (Ct) value lower than 40. To avoid false-positive results, quality control measures such as using separate rooms were adopted, and each set of amplifications included positive and negative controls.

The number of viral genomes was determined by adjusting the values according to the volumes used in each step of the procedure (extraction, cDNA synthesis and qPCR reaction). The number of genome copies (GC) that were observed is reported in ml per concentrated sample.



### 2.5. Reverse transcription-nested PCR

The samples that were positive in the qPCR analysis were further analysed using RT-nested PCR. The VP1/2A coding junction region was amplified using primers for which the sequence gene position and reaction conditions have been described elsewhere.<sup>17</sup> In all of the reactions, positive and negative controls were included and separate rooms were used for each set of amplifications (RT-PCR and RT-nested PCR). The products from the second round of PCR were loaded onto a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide ( $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) to detect bands (expected length, 244 bp) after electrophoresis. Products were visualised in an ultraviolet transilluminator (GEL Logic 212 Imaging System KODAK), and the images were analysed using the image capture system software (Molecular Imaging Software KODAK).

### 2.6. Nucleotide sequencing

The RT-nested PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and quantified by electrophoresis using a 2.0% agarose gel with a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). The PCR amplicons were sequenced in both directions using the Big Dye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems) in an ABI Prism 3730 Genetic Analyzer<sup>®</sup> (Applied Biosystems) as described by Otto et al.<sup>18</sup> with the same primers that were used for the second round of RT-nested PCR.

### 2.7. Sequence and phylogenetic analysis

The nucleotide sequences were edited and aligned using the BioEdit<sup>®</sup> Sequence Alignment Editor.<sup>19</sup> The sequences were compared with their prototypes and other sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI/GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The phylogenetic tree was constructed using MEGA v.4.0<sup>20</sup> with the neighbour-joining method and the genetic distance was corrected using the Kimura two-parameter model with 2000 pseudoreplicates.

## 3. Results

HAV was detected throughout the year; 58% (14/24) of the total raw sewage samples collected were positive using qPCR (Figure 1) and none (0/24) of the treated effluent samples were positive. Analysis of the raw sewage samples showed that the mean viral loads were highest during the spring and summer periods (October to March), and reached the highest peak in October ( $3.7 \times 10^3 \text{ GC ml}^{-1}$ ) (Figure 1).

All 14 positive samples that were identified by qPCR were analysed using RT-nested PCR, and only 4 positive (28.5%) raw sewage samples were detected using this method (Figure 2).

The results of nucleotide sequencing revealed that all of the HAV strains belonged to subgenotype IA, and formed distinct sequence clusters with high nucleotide similarity (Figure 2). HAV isolates had nucleotide identities

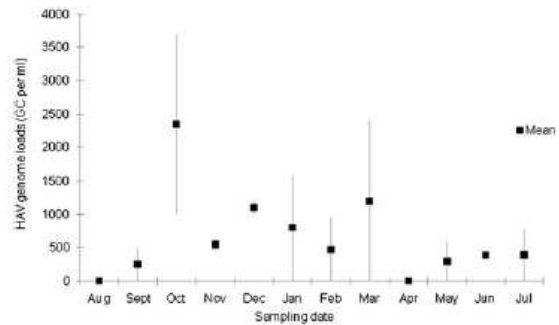


Figure 1. Mean hepatitis A virus (HAV) genome loads detected in raw sewage samples from the wastewater treatment plant. Bars: Maximum and minimum values.

ranging from 96.5% to 97% with the prototype strain HAS-15 and from 96% to 100% homology with sequences available in GenBank (Figure 2). Three identical HAV strains sequences (RJ 521, 524, 553) were obtained and they differed from the HAV strain RJ 616 by 3.5% at the nucleotide level. A BLAST search was performed and the most similar sequences were included in the phylogenetic analysis. The identical HAV sequences had maximum homology with the HAV strains commonly circulating in Brazil (100% nucleotide identity with sequences reported in the northeastern regions, including Maranhão (MA), Pernambuco (PE) and Bahia (BA) and southeastern region, including Rio de Janeiro (RJ). A distinct HAV strain (RJ 616) was closely related (nucleotide identity 99–99.5%) to HAV isolates from Argentina (Arg.) and the southeastern and northeastern regions of Brazil (RJ and BA, respectively) (Figure 2). The amino acid sequences from the Brazilian HAV isolates were compared with each other and the prototypical subgenotype IA strain (HAS-15). The heterogeneity observed at the nucleotide level did not yield amino acid substitutions.

## 4. Discussion

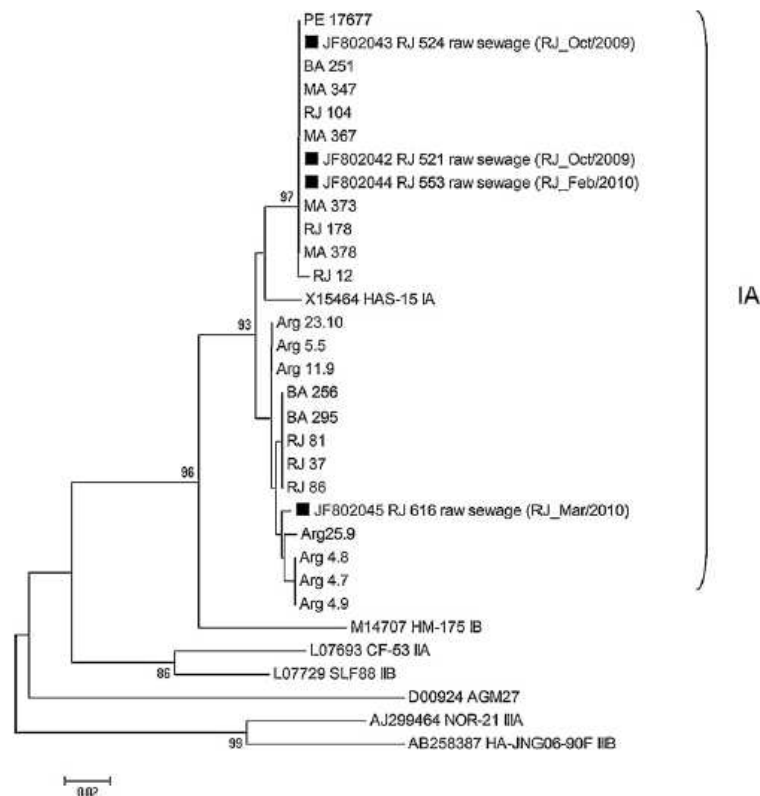
Improvements in sanitation conditions are an important preventive measure against the acquisition of HAV infection, especially in regions where a routine immunization policy is not employed.<sup>21</sup>

In Brazil, sewage networks and WWTP construction have expanded in recent years according to Brazilian Institute of Geography and Statistics, to overcome a historical deficiency in this sector.<sup>22,23</sup>

Viruses are not regularly monitored as part of a standard procedure to assess the microbiological quality of effluents. However, new monitoring parameters are emerging primarily due to the increased degradation of the aquatic ecosystems and the environmental and health impacts from global climate change, a scarcity of water resources and new alternatives for effluent disposal and reuse.

Guanabara Bay has historically been recognized as containing high levels of pollution, principally from domestic and industrial sewage that are directly discharged without effective treatment. The recent introduction of a secondary treatment at this WWTP is part of a major government





**Figure 2.** Phylogenetic tree of hepatitis A virus (HAV) isolates from sewage samples obtained in this study (represented with ■). Phylogeny was based on an analysis of 200-bp segments of the VP1/2A genome junction region (nucleotide position 2880–3079). Bootstrap percentages >70% are shown. The HAV strains obtained in this study and the prototypes are indicated by the GenBank access numbers on the tree. The location, month and year of isolation are indicated in parentheses. GenBank accession numbers for other nucleotide sequences included in the phylogenetic analysis are: RJ 12 (AY323034), RJ 37 (AY322840), RJ 81 (AY322841), RJ 86 (AY322839), RJ 178 (AY323023), RJ 104 (AY323022), BA 251 (AY323033), BA 256 (AY322842), BA 295 (AY322838), MA 347 (AY323039), MA 367 (AY323036), MA 373 (AY323035), MA 378 (AY323037), PE 17677 (DQ002558), Arg 4.7 (AY257997), Arg 4.8 (AY257998), Arg 4.9 (AY257999), Arg 5.5 (AY258000), Arg 11.9 (AY314891), Arg 23.10 (AY924965), Arg 25.9 (AY678465). Arg: Argentina, BA: Bahia, MA: Maranhão, PE: Pernambuco, RJ: Rio de Janeiro. Bar: genetic distance.

project to decontaminate Guanabara Bay (Guanabara Bay Decontamination Program (GBDP)).<sup>13</sup> The presence of HAV has not been investigated in this environment, and the data obtained in this study could be useful to address adequate strategies for wastewater management.

To detect HAV, sewage samples were concentrated using an ultracentrifugation protocol. This method is appropriate for concentrating enteric viruses from wastewater (the mean recovery rate was 47% for rotavirus A (RV-A) and has a higher recovery efficiency than the adsorption-elution method, which is commonly employed for enteric viruses recovery from wastewater.<sup>24</sup> Using this ultracentrifugation-based method a mean of  $1.9 \times 10^6$  RV-A genomes per l of raw sewage was detected using the TaqMan qPCR assay, which detected a positive result through a ten-fold dilution.<sup>24</sup>

The TaqMan qPCR assay has a high sensitivity for detecting HAV in water samples (the detection limit is 60 genome copies (GC) per ml).<sup>16</sup> This qPCR assay is considered suitable to detect these viruses in raw sewage and treated effluent samples.<sup>7,12</sup>

Using the TaqMan qPCR assay, HAV was detected in 58% of the raw sewage samples analyzed, which demonstrates the potential of this wastewater to disseminate viruses into the environment.

However, our data were compared with a previous study in which HAV was detected in 88% (22/25) of the raw sewage samples that were collected during one year (2005) in Rio de Janeiro using the same qPCR assay.<sup>7</sup> The statistical program EPI Info™ version 3.5.1 (<http://www.cdc.gov/epiinfo/epiinfo.htm>) was used to confirm whether there was a significant difference in the HAV detection frequency observed between the studies. Using this program, we observed a significant reduction in the HAV detection frequency (from 2005<sup>7</sup> to 2009/2010) for Rio de Janeiro wastewater (p-value 0.01,  $\chi^2$  test, significance level 0.05).

Moreover, the HAV genome was not observed in the treated effluent samples, which demonstrated that the activated sludge process efficiently removed approximately two log units of HAV in the raw sewage, which is an advance in HAV dissemination control for the period

evaluated. Nevertheless, viral genome loads below the qPCR assay detection limit could be present in treated effluents samples.

The quality of the effluent produced by the activated sludge processes could be related to the WWTP's variable design and operational conditions, including the hydraulic retention time in the aeration tanks, adequate aeration, the percentage of the flow treated, protozoan predation and the characteristics of the sewage being treated.<sup>25</sup> Moreover, the WWTP size is an important factor in the pollutant removal performance because compact treatment units are subject to more instability because of the variation in influent characteristics.<sup>26</sup> For this reason, the activated sludge process that was analyzed in this study may have a higher stability and better HAV removal compared with other activated sludge processes in Brazil.<sup>7,12</sup>

Socio-environmental variables have an important role in HAV epidemiology, especially in countries with tropical climates. During this study the highest HAV genome loads were observed in warmer and rainy seasons, which corroborates data from a previous study.<sup>7</sup>

Some authors have explained that rainfall events lead to overflow in the streams, rivers and open sewage channels that surround communities and increase the number of infections in this region during these seasons.<sup>27</sup> The habits of the population, such as swimming in aquatic environments during warmer periods, also contributes to HAV outbreaks in Rio de Janeiro.<sup>28</sup>

Hepatitis A virus genome loads were obtained of the sewage samples using the qPCR assay, which has been reported to be more sensitive than conventional PCR in many cases,<sup>7,16</sup> as was observed in this study.

Molecular characterization of the HAV nucleotide sequences demonstrated that genotype I was prevalent, within which only subgenotype IA was observed. The prevalence of HAV subgenotype IA has been reported in South American countries.<sup>29</sup>

The Brazilian isolates in this study were either genetically closely related or identical to isolates in Brazil and Argentina. Identical HAV sequences clustered with HAV strains have been observed primarily in Maranhão (MA) state and form a distinct cluster of subgenotype IA compared with HAV isolates from other regions in Brazil.<sup>5</sup>

The incidence of HAV infection remains high in areas with lower socio-economic conditions and less sanitation, such as the north and northeast regions<sup>10,22</sup> in which only 3.8% and 22.4% of households, respectively, have access to a sewage network.<sup>22</sup>

The HAV strain RJ 616 had a higher nucleotide similarity to Brazilian and Argentine HAV isolates. The Argentine HAV strains that were included in the phylogenetic analysis have been isolated since 1998, indicating a relatively high degree of genetic conservation among the HAV strains circulating in these regions. These data suggest that an endemic HAV population is circulating in several South American regions, as reported by other authors.<sup>29</sup>

A limited number of South American HAV isolates have been characterized at the genomic level.<sup>17,29</sup> Improvements in molecular approaches, including sequencing of the other regions on the genome, such as entire VP1 region,<sup>2</sup> should allow researchers to establish more

accurate epidemiological relationships between HAV isolates from South America in the near future.

The data herein indicate that a large activated sludge processes that is operating normally may be suitable to control HAVs that are circulating in wastewaters from Rio de Janeiro and other locations where the viral loads that are detected in urban wastewaters are similar to this study.

In recent years certain measures have been taken to expand the coverage and efficiency of sewage services in Brazil, such as an effective interconnection with the areas of public health, water resources management and urban planning.<sup>30</sup> The Ministry of Health has encouraged activities in environmental health surveillance, including integrated information and monitoring systems.<sup>30</sup> These systems should include environmental health conditions indicators and data on the effectiveness of the basic sanitation services, which involve setting goals to ensure service quality and prevent an environmental impact and public health risk.

**Authors' contributions:** All authors designed the study. TP wrote the article and performed the PCR assays, the analysis and interpretation of the nucleotide sequencing. TMF performed the concentration, nucleic acid extraction and cDNA synthesis. MPM and AMCG revised the article, and all authors read and approved the final manuscript. TP, MPM and AMCG are guarantors of the paper.

**Acknowledgements:** The authors thank the staff of CEDAE (Companhia Estadual de Água e Esgoto do Rio de Janeiro - RJ) for kindly providing sewage samples and the PDTIS DNA Sequence Platform at FIOCRUZ (RPT01A) for technical support with the sequencing reactions.

**Funding:** This work was financially sponsored by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/PAPES V, Brazil and by CGVAM/Ministry of Health, Brazil. This research work is within the scope of the activities of FIOCRUZ as a collaborating center of PAHO/WHO of Public and Environmental Health.

**Conflicts of interest:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

## References

- Costa-Mattioli M, Di Napoli A, Ferré V, Billaudel S, Perez-Bercoff R, Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 2003;**84**:3191–201.
- Nainan OV, Xia V, Vaughan G, Margolis HS. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Reviews* 2006;**19**:63–79.
- Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992;**73**:1365–77.
- Lu L, Ching KZ, De Paula VS, Nakano T, Siegl G, Weitz M, et al. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J Gen Virol* 2004;**85**:2943–52.
- De Paula VS, Lu L, Niel C, Gaspar AMC, Robertson BH. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J Med Virol* 2004;**73**:378–83.
- De Paula VS, Diniz-Mendes L, Villar LM, Luz SLB, Silva LA, Jesus MS, et al. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res* 2007;**41**:1169–76.



7. Villar LM, De Paula VS, Diniz-Mendes L, Guimarães FR, Ferreira FFM, Shubo TC, et al. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol* 2007;**45**:168–73.
8. Schlindwein AD, Rigotto C, Simões CMO, Barardi CRM. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Sci Technol* 2010;**61**:537–44.
9. Gentile A. The need for an evidence-based decision-making process with regard to control of hepatitis A. *J Viral Hepat* 2008;**15**:16–21.
10. Vitral CL, Souto FJ, Gaspar AMC. Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: reassessing immunization policy. *J Viral Hepat* 2008;**15**(Suppl. 2):22–5.
11. Hendrickx G, Van Herck K, Vorsters A, Wiersma S, Shapiro C, Andrus JK, et al. Has the time come to control hepatitis A globally? Matching prevention to the changing epidemiology. *J Viral Hepat* 2008;**15**:1–15.
12. Prado T, Silva DM, Guilayn WC, Rose TL, Gaspar AMC, Miagostovich MP. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Res* 2011;**45**:1287–97.
13. CEDAE- Water and Wastewater Company of Rio de Janeiro state. Guanabara Bay Decontamination Program - GBDP [Portuguese]. <http://www.cedae.com.br/> [accessed 20 January 2011].
14. Pina S, Jofre J, Emerson SU, Purcell RH, Girones R. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol* 1998;**64**:4485–8.
15. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;**28**:495–503.
16. Villar LM, de Paula VS, Diniz-Mendes L, Lampe E, Gaspar AMC. Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *J Virol Methods* 2006;**137**:169–76.
17. De Paula VS, Baptista ML, Lampe E, Niel C, Gaspar AMC. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 2002;**66**:22–7.
18. Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, et al. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 2008;**7**:861–71.
19. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;**41**:95–8.
20. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. Molecular genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;**24**:1596–9.
21. Rodríguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Carratala A, Buti M, et al. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J Water Health* 2010;**8**:346–54.
22. IBGE- Brazilian Institute of Geography and Statistics. National Survey of Sanitation [Portuguese]. Brasília, Brazil: IBGE 2008. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pnsb2008/default.shtm> [accessed 20 January 2011].
23. Heller L. Basic sanitation in Brazil: lessons from the past, opportunities from the present, challenges for the future. *J Comp Soc Welf* 2007;**23**:141–53.
24. Fumian TM, Leite JPG, Castello AA, Gaggero A, Caillou MSL, Miagostovich MP. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods* 2010;**170**:42–6.
25. Jamwal P, Mittal AK, Mouchel J-M. Efficiency evaluation of sewage treatment plants with different technologies in Delhi (India). *Environ Monit Assess* 2009;**153**:293–305.
26. Oliveira SC, Von Sperling M. Reliability analysis of wastewater treatment plants. *Water Res* 2008;**42**:1182–94.
27. Villar LM, De Paula VS, Gaspar AMC. Seasonal variation of hepatitis A virus infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002;**44**:289–92.
28. Santos DRL, Villar LM, De Paula VS, Lima GS, Gaspar AMC. Hepatitis A virus subgenotypes dissemination during a community outbreak in a surrounding region of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;**103**:254–8.
29. Munné MS, Vladimirovsky S, Otegui L, Soto S, Brajterman L, Castro R, et al. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from Argentina. *J Med Virol* 2007;**79**:887–94.
30. Ministry of Health, Brazil. Subsidies for construction of the National Environmental Health. [Portuguese]. Brasília: Ministério da Saúde; 2007 [ISBN 978-85-334-1328-3].

*5.3. Assessment of enteric viruses in a wastewater treatment plant and comparison of concentration methods for virus recovering. I. Primary sludge.*

**ASSESSMENT OF ENTERIC VIRUSES IN A WASTEWATER TREATMENT PLANT AND COMPARISON OF CONCENTRATION METHODS FOR VIRUS RECOVERING. I. PRIMARY SLUDGE.**

Tatiana Prado<sup>a\*</sup>, Wilma C. Guilayn<sup>b</sup>, Ana Maria Coimbra Gaspar<sup>c</sup>, Marize Pereira Miagostovich<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brazil

<sup>b</sup> Department of Sanitation and Environmental Health, Public Health National School, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

<sup>c</sup> Laboratory of Technological Development in Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brazil

\*Corresponding author.

Mailing address: Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Pavilhão Helio & Peggy Pereira, Avenida Brasil 4.365, CEP 21040-360, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Phone : 5521-2562-1782 / Fax: 5521-2562-1875. E-mail address: [tprado@ioc.fiocruz.br](mailto:tprado@ioc.fiocruz.br) (T. Prado)

**Running headline:** Assessment of enteric viruses in WWTP and methods for virus recovering from primary sludge

Surveys on enteric viruses in effluents and solid waste from wastewater treatment plants (WWTP) have demonstrated environmental contamination by those viruses as well as the difficulty to eliminate them once spread in the environment. This study, presented in two parts, aims to assess rotavirus A (RV-A), adenovirus (AdV), norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV) concentrations in samples obtained from different stages of a large urban WWTP using an activated sludge process. The ultracentrifugation method used in this study was also compared to other viral concentration methods for recovering those viruses from primary

sludge (part I) and biosolids (part II) samples. The use of a bacteriophage PP7 was also evaluated as an internal control (IC) in all procedures.

## **ABSTRACT**

**Purpose:** The aim of this study was to evaluate concentrations of rotavirus A (RV-A), adenovirus (AdV), norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV) in environmental samples from an urban wastewater treatment plant (WWTP) that uses an activated sludge process, located in Rio de Janeiro, Brazil. Virus recovery rates and detection limits of sludge samples were evaluated by using two different virus concentration methods.

**Methods:** the ultracentrifugation based method was performed for recovering enteric viruses from raw sewage, primary sludge, primary, treated effluents and biosolid samples. A second virus concentration method based in beef extract elution was tested for recovering enteric viruses from primary sludge and biosolids (part II). An internal control (PP7 bacteriophage) was included in these analyses to avoid false-negative results. Virus concentrations were determined by quantitative real-time PCR (qPCR) assays.

**Results and conclusions:** Ultracentrifugation is suitable for detecting enteric viruses from sewage samples, but a beef extract based-method was more suitable for detecting viruses from naturally contaminated primary sludge, although recovery efficiency is lower than 10%. Viral genome loads in primary sludge are expected to be 1 - 2  $\log_{10}$  units higher than found in raw sewage. Treated effluent samples and anaerobically digested sludge pose a risk for environmental contamination since viral genomes are not eliminated by treatment processes. AdV were present in 90% of the analyzed primary sludge samples and could be considered good indicators for evaluating the presence of enteric viruses in these residues.

**Key-words:** enteric viruses, primary sludge, activated sludge process, virus concentration methods.

## **1. Introduction**

Activated sludge process is the most widespread technique for biological wastewater treatment (Potier et al. 2005). In general, the biological stage is performed in three units: primary settling tank, aeration tank and secondary settling tank. Data have demonstrated that these systems do not present a good performance in virus removal and the resistance of these agents by secondary biological treatment processes and final disinfection by chlorination have



been described in several studies (Bofill-Mas et al. 2006; Fumian et al. 2011; Katayama et al. 2008; Petrinca et al. 2009; Prado et al. 2011a; Victoria et al. 2010).

Some mechanisms have been proposed for explaining virus removal by the secondary treatment process (Wen et al. 2009). The main mechanisms involve adsorption of viruses onto the biological flocs, settling to the sludge phase and predation by other microbes, such as protozoa and metazoans (Silva et al. 2007; Wen et al. 2009). However, many questions remain to be elucidated, such as attachment properties of viruses onto sludge flocs and variable removal rates for different viruses, as suggested elsewhere (Silva et al. 2007).

Nowadays, there is a scarcity of information about the destination and release of several enteric viruses in conventional current WWTPs, including viral analysis in sewage sludge and biosolids (Simmons and Xagorarakis 2011). The viral monitoring is fundamental to support an adequate management of the solid wastes generated in WWTPs in order to avoid both environmental and human contamination (Sidhu and Toze, 2009).

Nowadays, molecular biology methods, notably polymerase chain reaction (PCR) and their subsequent development in quantitative real-time PCR (qPCR) are the most adequate for virus detection in environmental samples (Girones et al. 2010; Jofre and Blanch 2010). However, natural inhibitors affect PCR performance and commonly false negative results can be obtained, mainly when considering virus detection in sewage sludge (Jofre and Blanch 2010). Limits of detection of these methods should be obtained to ensure a reliable analysis of health public risks.

Therefore, the aim of this study was to evaluate concentrations of rotavirus A (RV-A), adenovirus (AdV), norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV) in environmental samples obtained from several stages of an urban wastewater treatment plant (WWTP) that uses an activated sludge process, located in Rio de Janeiro, Brazil. For this purpose an ultracentrifugation based-method widely used for wastewater samples (Pina et al. 1998; Bofill-Mas et al. 2006; Fumian et al. 2010) was applied for different samples including raw sewage, primary sludge, primary and treated effluents (part I) and biosolids (part I and II). An ultracentrifugation based method that had not been tested for virus recovery from sludge samples was compared with a second virus concentration method based in beef extract elution, virus recovery rates and detection limits of the assays were determined. In this study it was also evaluated the use of PP7 bacteriophage as an internal control.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Sampling collection at WWTP**

The urban WWTP analyzed in this study is located in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. The plant operates by a secondary treatment process (an aerobic process using conventional activated sludge) with a mean inflow of 1 600 l s<sup>-1</sup>. The treatment process begins with a preliminary treatment and primary sedimentation at a hydraulic retention time (HRT) of 2 h. There are 4 aeration tanks placed in parallel (11 500 m<sup>3</sup> per tank) that have the capacity to treat 625 l s<sup>-1</sup> of effluent at an HRT of 4 h. Secondary sedimentation is performed in secondary settling tanks at an HRT of 4 h. The total HRT for the system is approximately of 12 h. The final effluents are not chlorinated.

Raw sewage, primary effluent (after treatment in the primary settling tanks), sewage sludge from primary settling tanks, treated effluent samples (after secondary settling tanks) and biosolids were collected from January to July, 2011. Volumes of 100 ml of samples were collected in sterile plastic bottles, stored at 4°C and transported to the laboratory for immediate analysis.

## **2.2. Virus concentration methods**

Ultracentrifugation-based method initially described by Pina et al. (1998), was used for enteric viruses concentration for all samples. For primary sludge and biosolid samples, the minor modifications were performed. Briefly, 25 ml of sewage sludge was suspended in 10 ml of 0.25N glycine buffer (pH 9.5) whilst for biosolids, 5 g (dry matter (d.m.) - determined according to USEPA 625/R-92/013, 2003, Appendix H) was suspended in 15 ml of 0.25N glycine buffer (pH 9.5). After incubation in ice for 30 min., the solution was neutralized by the addition of 10 ml of 2 x phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). The mixture was centrifuged (12 000 x g for 15 min, 4°C) and the supernatant was submitted to an ultracentrifugation (Beckman ultracentrifuge equipped with a type 35 rotor) at 100 000 x g for 1h at 4°C. Pellet was resuspended in 1.0 ml of 1 x PBS pH 7.2.

For primary sludge samples another method based on elution with beef extract was also evaluated. This method was described by Guzmán et al. (2007), which consists of a simplified method, similar to USEPA 625/R-92/013, Appendix H (2003). Briefly, in 25 ml of sewage sludge 10% beef extract solution was added (LP029B, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hants., England), pH 7.2 at 1 :10 (v/v) or (w/v). The sample was stirred by magnetic stirring (500 rpm) for 20 min at room temperature. After, the sample was centrifuged at 4,000 x g for 30 min at 4°C. The supernatant was recovered and filtered through a low protein binding 0.22µm pore size membrane filters (Millipore) for decontamination.

### **2.3. Viruses and sludge spike experiments**

RVA G1P[8] (GenBank accession no. GU831596), NoV GII/4 strain (GenBank accession no. DQ997040) isolated from positive fecal suspension (10%) previously identified from acute gastroenteritis outbreaks in Brazil were used in spiked experiments. AdV serotype 5 propagated in cell culture (Hep-2) and HAV strain (HAF-203) in Rhesus kidney cell cultures (FRhK-4) were used to perform all experiments (Villar et al. 2006). A PP7 bacteriophage (ATCC 15692-B2) kindly provided by Dr. Verónica Rajal (Salta University, Argentina), was included as internal control (IC). The replication was performed by culture in the host *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692) using a previously described protocol (Rajal et al. 2007).

For spiked experiments, sludge samples were autoclaved at 121°C for 30 min for decontamination. Viruses were spiked in 25 ml of the sludge sample and adsorbed onto sludge flocs by adjusting the pH to  $3.5 \pm 0.1$  with HCl (1N), as described by Sano et al. (2003) and stirring with a magnetic stirrer for 30 min. The sludge samples were centrifuged (10,000 x g, 15 min, 4°C) and pellet generated in each experiment were analyzed through concentration methods and Real-Time PCR assay for determining virus recovery yields. Procedures were performed in triplicate and repeated at different dates. In all experiments, negative controls (decontaminated sewage sludge samples without viruses seeded) were also included

Detection limits of methods were tested diluting initial spiked viral titers to the samples. Viral titers varying from  $10^4$  to  $10^1$  viral particles were inoculated in all experiments performed in triplicate. High concentration (range:  $10^7 - 10^{10}$  GC ml<sup>-1</sup>) of PP7 bacteriophage were spiked in naturally contaminated samples.

### **2.4. Viral genomic extraction and reverse transcription (RT) reaction**

Nucleic acids were extracted from 140 µl of the eluate to obtain a final volume of 60µl, using the QIAamp Viral RNA (Qiagen, Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions.

cDNA synthesis was carried out by RT using a random primer (PdN<sub>6</sub>; 50A<sub>260</sub> units; Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK) for RV, NoV, HAV and PP7. 2µl of dimethyl sulfoxide (Sigma, St. Louis, MO) and 10µl of RNA were mixed briefly, heated at 97°C for 7 min, and chilled in ice for 4 min. The components of the mixture and their final concentrations for a 50-µl RT reaction were carried out as follows: 2.5 mM each deoxynucleoside triphosphate (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200U of Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen), and 1µl of PdN<sub>6</sub>. The

RT reaction mixture was incubated in a thermal cycler (PTC-100 Programmable Thermal Controller; MJ Research, Inc., Watertown, MA) at 25°C for 5 min, 50°C for 60 min and 70°C for 20 min.

## **2.5. Virus quantification by Real-Time PCR**

Real-time PCR protocols including sequence of primers and probes, region of amplification of the genome and references can be found in Table 1. For all viruses, a standard curve (SC;  $10^8$  to  $10^1$  copies per reaction) was generated using a tenfold serial dilution of pCR2.1 vectors (Invitrogen, USA) containing the target region. The qPCR reaction was performed in the final volume of 25  $\mu$ l by using 12.5  $\mu$ l of the Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) and 5  $\mu$ l of the cDNA on the following incubation conditions: 50°C for 2 min to activate UNG, initial denaturation at 95°C for 10 min, and then 40-45 cycles of 95°C for 15s and 50-60°C, depending on virus type, for 1 min. Amplification data were collected and analyzed using Applied Biosystems 7500 Software<sup>®</sup> v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). All reactions were performed in duplicate. Positivity was considered when samples signals crossed the threshold line, presenting a characteristic sigmoid curve. The number of viral particles was determined by adjusting the values according to the volumes used for each step of the procedure (extraction, cDNA synthesis and qPCR reaction). The values (genome copies – GC) found in each methodology were reported in ml or g of concentrated samples.

## **2.7. Virus recovery efficiency**

The virus titer after viral elution from sludge samples was determined by Real-Time PCR assays. The virus recovery efficiency from each method tested was calculated with the following previously described equation (Sano et al. 2003):

$$\text{Virus recovery efficiency (\%)} = \frac{\text{virus titer (GC ml}^{-1} \text{ or g}^{-1}) \text{ after the virus elution}}{\text{Titer of added viruses (GC ml}^{-1}) \text{ in sludge samples}} \times 100$$

## **2.8. Statistical analysis**

The frequency of detection of each tested virus obtained in raw sewage, sewage sludge, primary effluent and treated effluent samples were compared using a chi-square ( $X^2$ ) test and/or Fisher's exact test at a significant level of 0.05. For this purpose it was used an EPI Info<sup>™</sup> version 3.5.1 program, available in (<http://www.cdc.gov/epiinfo/epiinfo.htm>).

### 3. Results

#### 3.1. Viruses' detection in the stages from WWTP

Table 2 shows frequency of viruses' detection in all investigated samples by using an ultracentrifugation method. RV-A and NoV were the most detected in raw sewage followed by AdV, but no significant statistical difference was obtained for these enteric viruses ( $p > 0.5$ , Fisher exact test). AdV and RVA were prevalent in primary effluent samples (Table 2) and no significant statistical difference ( $p > 0.3$ , Fisher exact test) was found for their presence, but AdV were shown statistically more significant when compared with NoV detection ( $p < 0.01$ ,  $X^2$  test). Lower frequencies of detection were obtained for all gastroenteric viruses analyzed in the final treated effluent samples, but at relatively high concentrations (Figure 1). HAV was only detected in one raw sewage sample ( $7.7 \times 10^6 \text{ GC L}^{-1}$ ), one primary sludge (Table 2 and 4) and in one primary effluent sample ( $1 \times 10^7 \text{ GC L}^{-1}$ ) at the same sampling date (February 14<sup>th</sup>) but were not detected in the final treated effluent samples (Table 2). Frequencies of detection obtained for viruses in primary sludge and biosolid samples were lower than 45% using the ultracentrifugation method (Table 2). Figure 1 shows the average of virus concentration in different samples investigated by ultracentrifugation method. Mean viral loads were higher for AdV in raw sewage samples (mean:  $1.3 \times 10^5 \pm \text{SD } 2 \times 10^5 \text{ GC L}^{-1}$ ) than for RV-A (mean:  $1.2 \times 10^5 \pm \text{SD } 2.1 \times 10^5 \text{ GC L}^{-1}$ ) and NoV (mean:  $5.2 \times 10^4 \pm \text{SD } 7.4 \times 10^4 \text{ GC L}^{-1}$ ) (Figure 1). However, in primary effluent samples, mean viral loads were higher for RV-A (mean:  $1.1 \times 10^5 \pm \text{SD } 1.8 \times 10^5 \text{ GC L}^{-1}$ ) than for AdV (mean:  $5.2 \times 10^4 \pm \text{SD } 7.1 \times 10^4 \text{ GC L}^{-1}$ ) and NoV (mean:  $2.9 \times 10^4 \pm \text{SD } 5.1 \times 10^4 \text{ GC L}^{-1}$ ) (Figure 1). RV-A and AdV were detected in similar concentration in treated effluent samples ( $1.3 \times 10^4 \pm \text{SD } 2.7 \times 10^4$  and  $\pm \text{SD } 2.4 \times 10^4 \text{ GC L}^{-1}$ , respectively), while NoV showed lower viral load (mean:  $3.6 \times 10^3 \pm \text{SD } 8 \times 10^3 \text{ GC L}^{-1}$ ) (Figure 1).

#### 3.2. Spike experiments and natural occurrence of enteric viruses in primary sludge

Table 3 shows the results of virus recovery rates obtained by ultracentrifugation and beef extract methods used to concentrate primary sludge samples. According to results it was possible to observe that both methods present efficiency recovery lower than 10%. AdV was better recovered by the two concentration methods and initial spiked viral titers of NoV and HAV were not detected by method 2. RV-A was also very poorly recovered by this method.

All viruses analyzed were recovered by the ultracentrifugation method, but in relative low recovery rates.

Detection limits of the assays were tested diluting initial viral titers spiked into de sludge samples. RV-A, NoV and HAV were not detected by method 2 when viral concentrations of  $10^3$  GC ml<sup>-1</sup> were seeded in sludge samples, but AdV were detected (mean recovery concentrations:  $1.3 \times 10^2 \pm \text{SD } 2.1 \times 10^2$  GC ml<sup>-1</sup>). By using ultracentrifugation based-method, initial viral concentrations of AdV ( $4 \times 10^3$  GC ml<sup>-1</sup>), RVA ( $2.6 \times 10^3$  GC ml<sup>-1</sup>) and NoV ( $4 \times 10^3$  GC ml<sup>-1</sup>) were detected at mean recovery rates as following:  $1.2 \times 10^3 \pm \text{SD } 2 \times 10^3$  GC ml<sup>-1</sup> for AdV,  $8 \times 10 \pm \text{SD } 1.3 \times 10^2$  GC ml<sup>-1</sup> for RVA and  $3.3 \times 10^2 \pm \text{SD } 5.7 \times 10^2$  for NoV, but HAV was negative when  $10^3$  GC ml<sup>-1</sup> was spiked. In concentrations of  $10^2 - 10^1$  GC ml<sup>-1</sup> all analysis showed negative results for viruses detection in both methods evaluated. PP7 bacteriophage was the most recovered virus from two methods (Table 3) and was detected until  $2 \times 10^4$  GC ml<sup>-1</sup> initially spiked by method 2 (recovered rates:  $6.9 \times 10^3 \pm \text{SD } 7.8 \times 10^3$  GC ml<sup>-1</sup>) and until  $4 \times 10^5$  GC ml<sup>-1</sup> initially spiked by method 1 (recovered rates:  $2.1 \times 10^4 \pm \text{SD } 1.6 \times 10^4$  GC ml<sup>-1</sup>).

Table 4 shows the results for enteric viruses detected in sewage sludge samples using two concentration methods. Method 2 (based in beef extract elution) was suitable for detecting AdV and for recovering RV-A and NoV when compared with method 1. HAV was only detected in one sample by the ultracentrifugation method (Table 4). The total frequency of detection, independently of used methods, demonstrated that AdV was the most detected (91%) (range:  $1.8 \times 10^4$  to  $1.1 \times 10^5$  GC L<sup>-1</sup>), followed by RV-A (range:  $8 \times 10^3$  to  $8 \times 10^5$  GC L<sup>-1</sup>), NoV (range:  $1.6 \times 10^4$  to  $4.9 \times 10^5$  GC L<sup>-1</sup>) (both 50%) and HAV (8%) ( $8.6 \times 10^6$  GC L<sup>-1</sup>). AdV was significantly most prevalent than RVA, NoV ( $p < 0.03$ , Fishers' exact test) and HAV ( $p < 0.00004$ ,  $X^2$  test) in sewage sludge.

#### 4. Discussion

Enteric viruses are responsible to cause several waterborne infectious diseases, mainly affecting developing countries (Okoh et al. 2010). Several viral pathogens can be presented at high concentrations in wastewaters or polluted surface waters (Bosch et al. 2008; Girones et al. 2010; Jofre and Blanch 2010).

The use of traditional microbiological indicators used to predict the contamination of water by human fecal pollution or effluent quality produced in WWTPs (e.g. coliforms or

thermotolerants) has been found limited to evaluate the contamination caused by other pathogens, such as enteric viruses (Jofre and Blanch 2010).

A good performance of biological sewage treatment processes in virus removal is still a challenge (He et al. 2008) and there is still a scarcity of information about prevalence and viral concentrations in primary sewage sludge, which has been assumed to contain very high viral concentrations when compared with raw sewage (Sidhu and Toze 2009; Simmons and Xagorarakis 2011).

In this study, an ultracentrifugation based-method was firstly used for recovering enteric viruses from sewage and sludge samples because it has been showed to present advantages on the other concentration methods (Fumian et al. 2011). This concentration has a mean recovery rate of 47% for RV-A in raw sewage (Fumian et al. 2011). However, lower mean recovery rates have been found for detecting enteric viruses from primary sludge and biosolids (shown in part II).

The simplified method based in beef extract elution was suitable for detecting AdV in primary sludge and more suitable when compared with ultracentrifugation for detecting RV-A and NoV GII from naturally contaminated sewage sludge. This method is more simplified to be used in routine monitoring, avoiding addition of reagents and steps to improve the analysis.

An ultracentrifugation-based method has concentrated higher amounts of final precipitate with tested glycine buffer volume, which could include organic and inorganic matter. The higher presence of suspended solids in the final eluates should affect the nucleic acid extraction procedure and viruses could remain adsorbed onto particulate matter.

Based on virus recovery rates achieved by the two concentration methods, it is expected that these primary sludge samples are contaminated with higher viral genome loads than the observed. Primary sludge samples can contain viral concentrations at least 1 to 2 log units more elevated than the raw sewage ones.

The high frequency of detection for AdV indicates their large dissemination in these residues and supports the hypothesis that they are a suitable index for evaluating human viral contamination in sewage sludge (Bofill-Mas et al. 2006; Schilindwein et al. 2010).

The lower frequency of HAV detection in comparison with other enteric viruses in wastewaters and sludge is in accordance with other studies carried out in Brazil (Schilindwein et al. 2010). The improvement in sanitary conditions seems to be preventing the HAV dissemination into the environment, except when outbreak cases are involved, mainly during warmer and rainy seasons (Prado et al. 2011b).

The presence of high HAV genome loads present in primary effluent samples suggesting that primary sedimentation has not an important role for HAV removal in activated sludge process, at least when relatively high viral loads are circulating in these environments. None HAV genome load was detected in treated effluent samples (after secondary treatment process), similarly as presented in previous study (Prado et al. 2011b), but viral concentrations below the detection limit of qPCR (Villar et al. 2006) could have been observed. Elucidative mechanisms for HAV removal in conventional activated sludge processes need further investigations.

RV-A and AdV are the most disseminate enteric viruses in Brazilian aquatic environments and are resistant to sewage treatment processes (Fumian et al. 2011; Miagostovich et al. 2008; Prado et al. 2011a; Schilindwein et al. 2010).

RV-A was the most detected virus in raw sewage samples, while was poorly recovered in sewage sludge samples comparing with AdV present in these samples. Some authors have described that RV could poorly adsorb on solid fractions contained in sewage sludge (Arraj et al. 2005; Sidhu and Toze 2009) and this study supports this hypothesis, although the lower frequency of RV-A found in these residues could also be related to detect limits of the used methods.

The great dissemination of AdV in sewage sludge and effluents from WWTPs could be associated to a high resistance of inactivation in sewage treatment processes (Schilindwein et al. 2010). Although relative high viral loads have been found in treated effluent samples, the activated sludge process was able to remove approximately a mean of 1.0 to 1.5 units  $\log_{10}$  of viruses, as expected for this secondary biological treatment process (Godfree and Farrell 2005).

Initial viral concentrations found in raw sewage samples also seem to be important for virus removal efficiency in activated sludge processes, beyond adequate aeration, pH, conductivity and temperature (Nordgreen et al. 2009; Prado et al. 2011b; Wen et al. 2009). Moreover, adequate flocculating properties of sewage sludge and chemical constituents on their surfaces seem to have an important role for adsorption of viruses onto particulate matter (Wilén et al. 2003). Therefore, further studies combining physical-chemical properties of the wastewaters and sewage sludge with viruses' detection could be conducted to elucidate the responsible mechanisms to provide virus removal in conventional biological treatment processes.

The mesophilic anaerobic digestion (MAD) used to treat sewage sludge is not capable of eliminating enteric viruses and similar frequencies of viruses' detection can be found in



primary sludge and biosolid samples (Part II). An adequate wastewater management includes a correct monitoring and disposal of the solid wastes generated in WWTPs. Efficiency of the methods used for virus monitoring in these residues should be evaluate to avoid that the real presence of viruses are underestimated, as recently appointed by other study (Jebri et al. 2012). These issues are discussed with more details in part II of this manuscript.

Although the virus monitoring is not included in regulations to control water and effluent quality in Brazil, there is an international consensus about the importance for monitoring these pathogens in effluents produced by water and wastewater treatment processes (Girones et al. 2010; Jofre and Blanch 2010). Information about viruses' concentrations is required for various purposes: to ensure the quality for reusing water, to validate wastewater treatment processes and to design adequate strategies in wastewater management.

The Brazilian Ministry of Health has incentive actions to improve monitoring and information services to evaluate environmental health conditions and effectiveness of basic sanitation services. The knowledge about the mechanisms involved in virus removal of the current WWTPs could contribute to implement strategies or necessary alternatives to improve the performance of conventional sewage treatment processes and to ensure a better effluent quality in the near future.

**Acknowledgements:** The authors thank the staff of CEDAE (Companhia Estadual de Água e Esgoto do Rio de Janeiro - RJ) for kindly providing sewage samples. This work was financially sponsored by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) / PAPES V, Brazil and by CGVAM/Ministry of Health, Brazil. This research work is within the scope of the activities of FIOCRUZ as a collaborating center of PAHO / WHO of Public and Environmental Health.

## References

- Arraj A, Bohatier J, Laveran H, Traore O (2005) Comparison of bacteriophage and enteric virus removal in pilot scale activated sludge plants. *J Appl Microbiol.* 98: 516-524.
- Bosch A, Guix S, Sano D, Pintó RM (2008) New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr Opin Biotechnol.* 19 (3): 295-301.

Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R (2006) Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl Environ Microbiol.* 72(12): 7894-7896.

Fumian TM, Leite JPG, Castello AA, Gaggero A, Caillou MSL, Miagostovich MP (2010) Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods.* 170 (1-2): 42-46.

Fumian TM, Leite JPG, Rose TL, Prado T, Miagostovich MP (2011) One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Res.* 45(17): 5755-5763.

Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa AB, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S (2010) Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 44: 4325 – 4339.

Godfree A, Farrell J (2005) Processes for managing pathogens. *J Environ Qual.* 34: 105-113.

Guzmán C, Jofre J, Blanch AR, Lucena F (2007). Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil, and treated biowaste. *J Virol Methods.* 144 (1-2): 41-48.

Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P (2003) Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol.* 70: 228-239.

Jebri S, Jofre J, Barkallah I, Saidi M, Hmaied F. (2012) Presence and fate of coliphages and enteric viruses in three wastewater treatment plants effluents and activated sludge from Tunisia. *Environ Sci Pollut Res.* DOI 10.1007/s11356-011-0722-y

Jofre J, Blanch AR (2010) Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality. *J Appl Microbiol.* 109: 1853-1867.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi F, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K (2003) Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 41: 1548-1557.

Katayama H, Haramoto E, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S (2008) One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.* 42: 1441-1448.

Miagostovich MP, Ferreira FFM, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SLB, Silva LA, Leite JPG (2008) Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 74: 375-382.

Nordgren J, Matussek A, Mattson A, Suenson L, Lindgren PE (2009) Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Res.* 43: 1117-1125.

Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS (2010) Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int J Environ Res Public Health.* 7: 2620-2637.

Petrinca AR, Donia D, Pierangeli A, Gabrieli AM, Degener AM, Bonanni E, Diaco L, Cecchini G, Anastasi P, Divizia M (2009) Presence and environment circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. *J Appl Microbiol.* 106: 1608 – 1617.

Pina S, Jofre J, Emerson SU, Purcell RH, Girones R (1998) Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol.* 64: 4485-4488.

Potier O, Leclerc J-P, Pons M-N (2005) Influence of geometrical and operational parameters on the axial dispersion in an aerated channel reactor. *Water Res.* 39: 4454-4462.

Prado T, Silva DM, Guilayn WC, Rose TL, Gaspar AMC, Miagostovich MP (2011a) Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Res.* 45(3): 1287-1297.

- Prado T, Fumian TM, Miagostovich MP, Gaspar AMC (2011b) Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106(2): 104-109.
- Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S (2007) Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res.* 41: 1411-1422.
- Sano D, Fukushi K, Yoshida Y, Omura T (2003) Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. *Water Res.* 37: 3490-3498.
- Schlindwein AD, Rigotto C, Simões MO, Barardi CRM (2010) Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Sci Technol.* 61: 537-544.
- Sidhu JPS, Toze SG (2009) Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ International.* 35: 187-201.
- Silva AK, Le Saux J-C, Parnaudeau S, Pommepuy M, Elimelech M, Le Guyader FS (2007) Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl Environ Microbiol.* 73 (24): 7891-7897.
- Simmons FJ, Xagorarakis I (2011) Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. *Water Res.* 45: 3590-3598.
- USEPA 625/R-92/013 Environmental Protection Agency of United States (2003) Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. Under 40 CFR Part 503. Appendix H – Method for the recovery and assay of total culturable viruses from sludge.
- Victoria M, Guimarães FR, Fumian TM, Ferreira FFM, Vieira CB, Shubo T, Leite JPG, Miagostovich MP (2010) One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health.* 8(1): 158-165.

Villar LM, de Paula VS, Diniz-Mendes L, Lampe E, Gaspar AMC (2006) Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *J Virol Methods*. 137: 169-176.

Wen Q, Tutuka C, Keegan A, Jin B (2009) Fate of pathogenic microorganisms and indicators in secondary activated sludge wastewater treatment plants. *J Environ Management*. 90: 1442-1447.

Wilén B-M, Jin B, Lant P (2003) The influence of key constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Res*. 37: 2127-2139.

**Table 1** Viruses, PCRs assays, primers' sequences, genome region and references

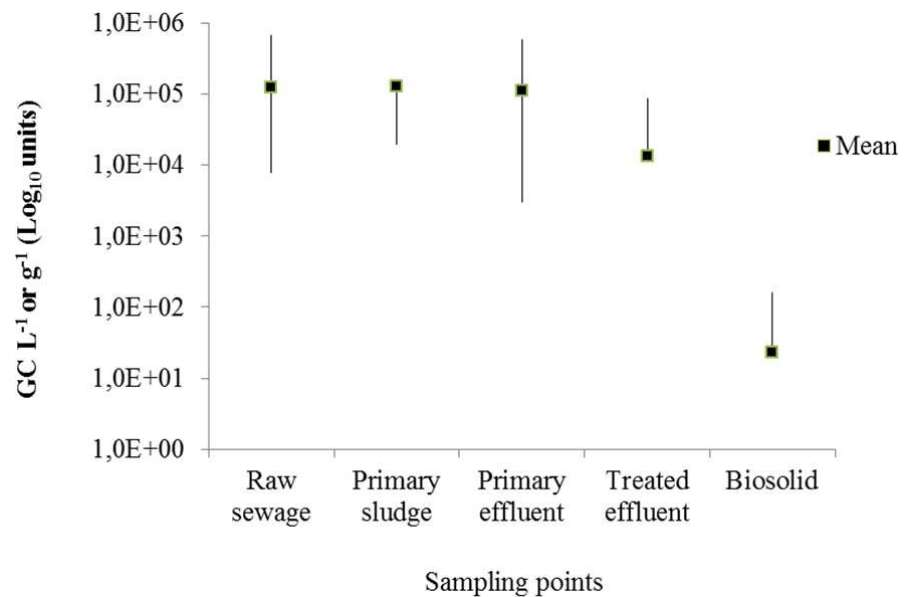
Viruses and qPCR assay	Primers and probe	Sequences 5' to 3'	Genome region	References
RV-A and PP7 multiplex RT-qPCR	NSP3 F	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG <sup>a</sup>	NSP3	Fumian et al. 2010
	NSP3 R	GGTCACATAACGCCCCTATAGC		
	NSP3 probe	VIC-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA		
	247 F	GTTATGAACCAATGTGGCCGTTAT	Replicase	
	320 R	CGGGATGCCTCTGAAAAAAG		
	274 probe	FAM-TCGGTGGTCAACGAGGAACTGGAAC-TAMRA		
HAdV qPCR	AQ1 F	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT	Hexon	Heim et al. 2003
	AQ2 R	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC		
	Probe	FAM-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-TAMRA		
NoV RT-qPCR	COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG <sup>a</sup>	ORF1-ORF2 junction region	Kageyama et al. 2003
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCA		
	RING2-probe	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA		
HAV RT-qPCR	Forward primer	CTGCAGGTTTCAGGGTTCTTAAATC	5' non-coding region (NC)	Villar et al. 2006
	Reverse primer	GAGAGCCCTGGAAGAAAGAAGA		
	Probe	FAM-ACTCATTTTTTCACGCTTTCTG		

<sup>a</sup> IUB code: W = A/T, R = A/G, B = C/G/T, Y = C/T, N = A/C/G/T.

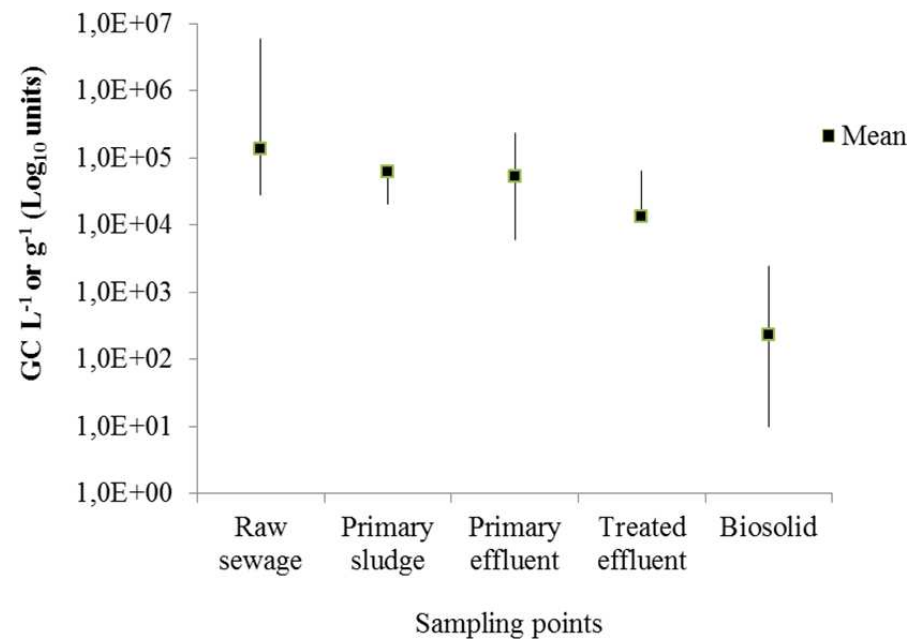
**Table 2** Detection (%) of RV-A, AdV, NoV GII and HAV in the samples obtained from different stages of the WWTP by ultracentrifugation method

Viruses	Number of positive samples / total samples (%)				
	Raw sewage	Primary sludge	Primary effluent	Treated effluent	Biosolid
<b>RV-A</b>	8/12 (66%)	1/12(8%)	8/11 (72%)	3/11 (27%)	3/11 (27%)
<b>AdV</b>	7/12 (58%)	3/12 (25%)	10/12 (83%)	4/12 (33%)	5/11 (45%)
<b>NoV</b>	8/12 (66%)	4/12 (36%)	4/11 (36%)	2/11 (18%)	4/11 (36%)
<b>HAV</b>	1/12 (8%)	1/12 (8%)	1/12 (8%)	0	1/11 (9%)

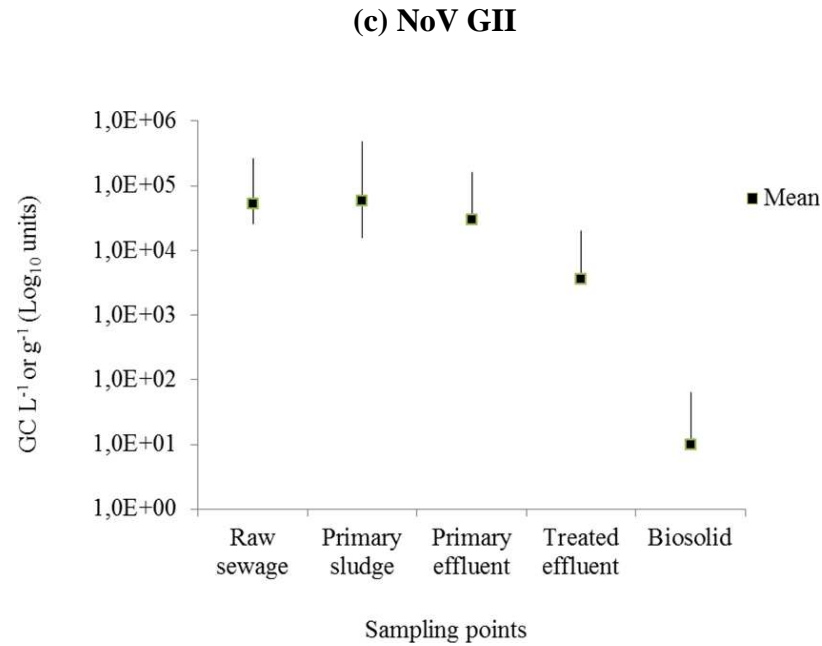
(a) RV-A



(b) AdV







**Fig 1** Quantification of enteric viruses: (a) RV-A, (b) AdV, (c) NoV GII in environmental samples obtained during several stages from activated sludge process. Bars = Min and Max value. ( $n = 12$ ).

**Table 3** Virus recovery efficiency (%) obtained by two concentration methods and qPCR results (GC ml<sup>-1</sup>) in primary sludge samples

Concentration method *	AdV	RV-A	NoV	HAV	PP7
<b>Method 1</b>					
Virus titers spiked	4.2 x 10 <sup>6</sup>	7.9 x 10 <sup>6</sup>	1.0 x 10 <sup>5</sup>	6.6 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>9</sup>
Virus recovered	3.1 x 10 <sup>5</sup> (±SD 4 x 10 <sup>5</sup> )	1.0 x 10 <sup>4</sup> (±SD 8.6 x 10 <sup>3</sup> )	8.3 x 10 <sup>2</sup> (±SD 1.4 x 10 <sup>3</sup> )	4.3 x 10 <sup>4</sup> (±SD 3.2 x 10 <sup>4</sup> )	2.7 x 10 <sup>8</sup> (±SD 1.4 x 10 <sup>8</sup> )
Efficiency recovery (%)	7.3	0.1	0.8	6.5	27
<b>Method 2</b>					
Virus titers spiked	4.2 x 10 <sup>6</sup>	7.0 x 10 <sup>6</sup>	1.5 x 10 <sup>4</sup>	6.0 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>
Virus recovered	1.8 x 10 <sup>5</sup> (±SD 1.4 x 10 <sup>5</sup> )	3.0 x 10 <sup>1</sup> (±SD 5.2 x 10 <sup>1</sup> )	0	0	8.7 x 10 <sup>6</sup> (±SD 4.6 x 10 <sup>6</sup> )
Efficiency recovery (%)	4.2	0.0004	0	0	8.7

\* Methods were run in triplicate, SD= standard deviation. Method 1 = ultracentrifugation, Method 2 = beef extract

**Table 4** Viral loads (GC L<sup>-1</sup>) in primary sludge obtained by the two concentration methods following detection using qPCR

Sampling date	Viral groups									
	AdV		RV-A		NoV		HAV		PP7	
Concentration method	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
31/01	2 x 10 <sup>4</sup>	7.4 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	ND	ND
14/02	0	9.4 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	8.6 x 10 <sup>6</sup>	0	ND	ND
28/02	0	1.8 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	4.8 x 10 <sup>8</sup>	ND
14/03	0	1.1 x 10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	9.6 x 10 <sup>8</sup>	2.6 x 10 <sup>3</sup>
28/03	0	4.9 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0	2.4 x 10 <sup>5</sup>	0	0	7.4 x 10 <sup>8</sup>	4.2 x 10 <sup>6</sup>
11/04	3.1 x 10 <sup>4</sup>	3.6 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	ND	1.3 x 10 <sup>9</sup>
25/04	0	2.5 x 10 <sup>4</sup>	0	8 x 10 <sup>5</sup>	0	4.6 x 10 <sup>5</sup>	0	0	7 x 10 <sup>8</sup>	1.4 x 10 <sup>9</sup>
16/05	0	1.1 x 10 <sup>5</sup>	0	8 x 10 <sup>3</sup>	2.4 x 10 <sup>4</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>	0	0	8,8 x 10 <sup>9</sup>	1.8 x 10 <sup>9</sup>
13/06	0	0	2 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	ND	1.6 x 10 <sup>9</sup>
27/06	0	8.7 x 10 <sup>4</sup>	0	2.4 x 10 <sup>5</sup>	1.6 x 10 <sup>4</sup>	5.4 x 10 <sup>4</sup>	0	0	8 x 10 <sup>8</sup>	2.6 x 10 <sup>3</sup>
11/07	0	5.3 x 10 <sup>4</sup>	0	4 x 10 <sup>5</sup>	4.9 x 10 <sup>5</sup>	1.2 x 10 <sup>5</sup>	0	0	1.3 x 10 <sup>10</sup>	1.3 x 10 <sup>9</sup>
25/07	2 x 10 <sup>4</sup>	7.4 x 10 <sup>4</sup>	0	1 x 10 <sup>5</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	2.4 x 10 <sup>4</sup>	0	0	1.4 x 10 <sup>10</sup>	ND
<b>Frequency of detection</b>	25%	91%	8%	41%	33%	50%	8%	0	100%	100%

Method 1 = ultracentrifugation, Method 2 = beef extract; ND = not done

*5.4. Assessment of enteric viruses in a wastewater treatment plant and comparison of concentration methods for virus recovering. II. Biosolids*

**ASSESSMENT OF ENTERIC VIRUSES IN A WASTEWATER TREATMENT PLANT AND COMPARISON OF CONCENTRATION METHODS FOR VIRUS RECOVERING. II. BIOSOLIDS**

Tatiana Prado<sup>a\*</sup>, Wilma C. Guilayn<sup>b</sup>, Ana Maria Coimbra Gaspar<sup>c</sup>, Marize Pereira Miagostovich<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brazil

<sup>b</sup> Department of Sanitation and Environmental Health, Public Health National School, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

<sup>c</sup> Laboratory of Technological Development in Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brazil

\*Corresponding author.

Mailing address: Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Pavilhão Helio & Peggy Pereira, Avenida Brasil 4.365, CEP 21040-360, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Phone : 5521-2562-1782 / Fax: 5521-2562-1875. E-mail address: [tprado@ioc.fiocruz.br](mailto:tprado@ioc.fiocruz.br) (T. Prado)

**Running headline:** Assessment of methods for virus recovering from biosolids

**ABSTRACT**

**Purpose:** The aim of this study was to evaluate different methods for recovering rotavirus species A (RVA), adenoviruses (AdV), norovirus genogroup II (NoV GII) and hepatitis A virus (HAV) from biosolid samples treated by mesophilic anaerobic digestion in a large urban WWTP in Brazil.

**Methods:** Real time quantitative PCR (qPCR) was used for spiking experiments in order to compare limits of detections of the elution with ultracentrifugation (method 1), beef extract

(method 2), and adsorption-elution with negatively HA-charged membrane filter methods (Method 3). Inhibition tests and an internal control – IC (PP7 bacteriophage) were also included to avoid false negative results.

**Results and conclusions:** Methods 1 and 2 showed higher virus recovery rates varying according to different viral groups, but a feasible method based on beef extract was better for detecting enteric viruses, mainly AdV from biosolid samples. This simplified method can be applicable for routine analysis followed by qPCR assay since virus recovery efficiency is determined in the study. Inhibition tests demonstrating that biosolid samples contain inhibitors that interfere in qPCR efficiency and the use of an IC can be interesting to indicate variable composition from biosolid. Natural occurrence of those viruses was also evaluated by both recommended methods and demonstrated AdV in 90% of the analyzed samples corroborating their potential as good indicators for the presence of enteric viruses in biosolids.

**Keywords :** enteric viruses, anaerobically digested sludge, concentration methods, virus recovery yields.

## **1.Introduction**

Wastewater treatment plants (WWTPs) generate large amounts of residual sludge as a consequence of the sewage treatment process. These residues are recognized to concentrate a series of contaminants, mainly heavy metals and pathogenic microorganisms, such as bacterial, viruses, protozoa and helminthes (Guzmán et al. 2007a, 2007b; Monpoeho 2001, 2004; Viau and Peccia 2009; Wong et al. 2010).

Enteric viruses, which are responsible to cause several diseases, including hepatitis and gastroenteritis, can be present at high concentrations in sludge and represents a potential health risk due to disposal and reuse practices (Sidhu and Toze 2009). In Brazil, about 40 % of sewage sludge generated in WWTPs are disposed in landfills, 15% are discharged in rivers, 8 % in wasteland, 2 % incinerated, 0.1 % in oceans and 15 % is reused (IBGE 2008).

There is a potential for the beneficial use of sewage sludge because these residues contain nutrients as well as organic matter and may be used as fertilizers or soil amendment (Godfree and Farrell 2005). However, land application of sewage sludge, under certain conditions, could lead to the contamination of surface water, groundwater, soil and the food chain.

Several stabilization treatments are used to reduce the organic matter and pathogens to generate a treated sludge, frequently named biosolids. Mesophilic anaerobic digestion

(MAD), aerobic digestion, composting, air drying and lime stabilization are among the commonly used stabilization treatments. Resistance of virus is variable according to different stabilization treatments (Godfree and Farrell 2005) and the presence of enteric viruses has been reported to be found in treated sewage sludge (Monpoeho et al. 2004; Viau and Peccia 2009; Wong et al. 2010).

Most concentration methods used for detecting viruses in sewage sludge involve, mainly, an elution and concentration step. Beef extract which is appointed as a referent eluant by U.S. EPA (625/R-92/013, 2003, Appendix H) has been reported to concentrate inhibitors in the final eluant affecting PCR efficiency (Rock et al. 2010; Sano et al. 2003).

Therefore, some concerns remain to be solved, such as standardization of simplified concentration methods that present a good performance to recover several enteric viruses using molecular detection methods and the establishment of detection limits of the assays to ensure a reliable health risk analysis (Girones et al. 2010). Moreover, very limited information is available on the presence and concentrations of RV and NoV in biosolids (Sidhu and Toze 2009).

The aim of this study was to determine the efficiency of an ultracentrifugation method used in a previous study (part I) as well as other methods described in literature, such as the beef extract elution and negatively charged membrane filtration, in order to check the viability of more suitable methods that could be easily employed in the viral monitoring in routine analysis. Natural occurrence of rotaviruses A (RVA), adenoviruses (AdV), noroviruses genogroup II\_(NoV GII) and hepatitis A viruses (HAV) were also investigated in anaerobically digested sludge samples from an activated sludge process.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Biosolid samples**

Digested mesophilic sludge samples (biosolids) were obtained from a large urban wastewater treatment plant (WWTP) located in Rio de Janeiro, Brazil, as previously described (part I). The WWTP employ an aerobic process (conventional activated sludge), including sewage sludge treatment by mesophilic anaerobic digestion (MAD) and dewatering. The final digested-dewatered sludge contained about 25 - 30 % of total solids. Eleven samples were collected after MAD from February to July, 2011. These solid wastes are the final product of the treatment process. Samples were collected in sterile plastic bags, kept at 4°C and transported to the laboratory for immediate analysis.

## 2.2. Virus concentration methods

Viruses were concentrated using three different techniques. Method 1 described by Pina et al. (1998) is an ultracentrifugation based-method, with minor modifications, as described in part I.

Method 2 described by Guzmán et al. (2007a) consist of a simplified method, similar to USEPA 625/R-92/013, Appendix H (2003). Briefly, 10% of beef extract solution (LP029B, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hants., England), pH 7.2 was added to 5 g (dry matter - d.m.) of sewage sludge at 1 :10 (v/v) or (w/v). The sample was stirred by magnetic stirring (500 rpm) for 20 min at room temperature. After, the sample was centrifuged at 4,000 x g for 30 min at 4°C. The supernatant was recovered and filtered through a low protein binding 0.22 µm pore size membrane filters (Millipore) for decontamination.

Method 3 described for virus recovery from coastal seawater and wastewater (Katayama et al. 2002, 2008), consists of an adsorption-elution method that uses a HA negatively charged membrane filter (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), with a 0.45µm pore size and a 142 mm diameter, and a vacuum pump system. This methodology was adapted, with minor modifications, for virus recovery from biosolid samples. In this method, 5 g (d.m.) of sewage sludge were dissolved in 2 l of distilled sterile water and  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  was added (in a final concentration of  $1200 \text{ mg l}^{-1}$ ) and pH adjusted to 5.0. The sample was filtered to adsorb the viruses in the negatively charged membrane filter. Subsequently, 15 ml of 1mM NaOH (pH 10.8) was used to elute viruses from the membrane. The eluate was recovered in a tube containing 50 µl of 50 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 1.0) and 100x Tris EDTA buffer (pH 8.0) for neutralization. The 15 ml of the eluate were then reconcentrated to 2 ml by centrifuging the samples in a Centriprep 50 Concentrator (YM-50 - Millipore) at 1,500 x g for 10 min.

All concentrated samples were stored at - 70°C until molecular biology analysis.

## 2.3. Spiked experiments, inhibition's tests and virus detection

For spiking experiments, the same virus strains, including an internal control (PP7bacteriophage) were used as described earlier (part I).

Biosolid samples were autoclaved at 121°C for 30 min for decontamination. Viruses were spiked in 5 g (d.m) of biosolid sample and the viruses titers (final concentrations) seeded into samples were determined by qPCR assay. Viruses were adsorbed onto sludge flocs only

by adjusting the pH to  $3.5 \pm 0.1$  with HCl (1N), as described by Sano et al. (2003), and stirred with a magnetic stirrer for 30 min. The biosolid samples were centrifuged (10,000 x g, 15 min, 4°C) and the portion of supernatant (1 ml) and pellet generated in each experiment were analyzed through of a qPCR assay for determining virus recovery yields. Procedures were performed in triplicate, repeated at different dates. In all experiments, negative controls were also included (decontaminated biosolid samples without viruses seeded). In all procedures, extracted nucleic acids were diluted in RNA/DNAse free water (tenfold serial dilution: 1:10 and 1:100) to verify the potential of inhibitors for PCR reactions. For PP7 used as an IC of field biosolid samples, high concentrations (ranged from  $10^7$  to  $10^9$  viral particles) were spiked. Initial viral titers used in spiked experiments were diluted to test limits of detection of the virus concentration methods and qPCR assays.

The extraction methodology, protocols for detection, viral quantification and calculation for recovering virus efficiency were described in part I.

### 3. Results

#### 3.1. Virus recovery efficiency

Three different virus concentration methods were tested to evaluate recovery efficiency according to each type of virus. PP7Bacteriophage was used as IC in all experiments. Mean values (genome copies – GC ml<sup>-1</sup>) of viruses detected in supernatant of spiked experiments (i.e. viruses not adsorbed onto sludge flocs) are shown in Table 1. All viruses analyzed were adsorbed onto sludge flocs in percentages higher than 99 % (Table 1). Negative results were obtained for all viruses analyzed in the negative control samples.

Mean viral loads (genome copies – GC g<sup>-1</sup> d.m.) obtained in each method performed, including inhibition tests, can be found in Figure 1. In general, higher mean viral loads were observed when nucleic acids were diluted at least once (1:10) (Figure 1). An adsorption-elution method (method 3) was performed once for HAV, and the viral load obtained was  $5.6 \times 10^2$  GC g<sup>-1</sup> and  $4 \times 10^2$  GC g<sup>-1</sup> when nucleic acids were diluted at 1:10. HAV was not detected in this method when nucleic acids were diluted at 1:100. PP7 was recovered in all analyzed samples and mean viral loads detected by method 1, 2 and 3 were as following:  $5.2 \times 10^6$  GC g<sup>-1</sup>  $\pm$  SD  $1.1 \times 10^6$ ,  $2.8 \times 10^6$  GC g<sup>-1</sup>  $\pm$  SD  $2.3 \times 10^6$  and  $3.4 \times 10^5$  GC g<sup>-1</sup>  $\pm$  SD  $2.9 \times 10^5$ , respectively.

Mean maximum value (GC g<sup>-1</sup>) obtained in each procedure performed in triplicate (including diluted nucleic acids at 1:10 or at 1:100) for each virus type was considered for



analysis of virus mean recovery rates (%) (Figure 2). Ultracentrifugation was better for recovering both RVA and HAV (Figure 2). NoV was recovered at similar rates by methods 1 and 2 (Figure 2). However, method 1 did not present the better recovery efficiency for AdV (Figure 2) which were better recovered through method 2, based on viral elution using beef extract. All viral groups were poorly recovered by HA-negatively charged membrane filter strategy (Figure 2).

Limits of detection of qPCR assays were tested for both 1 and 2 methods because of their better recovery efficiency. HAV showed the worst results in both methods, with limits of detection higher than  $10^3$  GC ml<sup>-1</sup>. For NoV, the limits of detection were of  $1.4 \times 10^2$  GC ml<sup>-1</sup> and  $4.8 \times 10^2$  GC ml<sup>-1</sup> for methods 1 and 2, respectively, as for AdV, the limits of detection were of  $1.1 \times 10^3$  GC ml<sup>-1</sup> and  $1.5 \times 10^2$  GC ml<sup>-1</sup>, with mean recovery rates of  $5.5 \text{ GC g}^{-1} \pm \text{SD } 9.6$  and  $5.9 \text{ GC g}^{-1} \pm \text{SD } 10.2$  for methods 1 and 2, respectively. Limits of detection for RVA was of  $3 \times 10^1$  GC ml<sup>-1</sup> with mean recovery rates ranging from  $14.9 \text{ GC g}^{-1} \pm \text{SD } 25.8$  to  $2 \text{ GC g}^{-1} \pm \text{SD } 3.4$  by methods 1 and 2, respectively. PP7 was recovered up until  $4 \times 10^3$  GC ml<sup>-1</sup> in both methods, at relatively high recovery rates (57%).

### 3.2. Natural occurrence of enteric viruses

Table 2 shows the viral load for AdV, RVA, NoV and HAV obtained from eleven biosolid samples collected in an activated sludge process. Elution with beef extract (method 2) was better for recovering AdV (90%) of the analyzed samples. The second most detected viruses were RVA and NoV (45%). RVA was detected at higher concentration by the ultracentrifugation method (Table 2) and NoV GII was only detected in May, June and July; and higher concentrations were obtained by the beef extract method (Table 2). HAV was only detected in two samples at relatively high concentrations (Table 2). PP7 was detected in all spiked field samples, with lower concentrations obtained in the samples collected in February and March (Table 2).

Samples that presented negative results were submitted to the second round of experiments based in the nucleic acids dilution (1:10 and 1:100). The dilution of nucleic acids (1:10) was able to detect NoV in one initially negative sample by method 1 (sampling date 11/04) (Table 2), and for one sample initially negative for RV-A (sampling date 27/06) by method 2 (Table 2). HAV was negative in all diluting nucleic acids (1:10) of analyzed samples. All samples analyzed with diluted nucleic acids (1:100) showed negative results for all viruses analyzed.

Results of pH showed a mean of 6.7 ( $\pm$  SD 0.5) in the biosolid samples (Figure 3), as expected for anaerobically digested sludge samples.

#### 4. Discussion

Viruses are charged particles and are expected to be highly concentrated in biosolids due to their aggregation and adhesion to sludge solids (Sidhu and Toze 2009). Several methods have been tested for detecting virus in sewage sludge samples (Belguith et al. 2006; Guzmán et al. 2007a; Monpoeho et al. 2001, 2004), but few comparisons among them have been made regarding recovery yields obtained for different viral groups, mainly HAV and other enteric viruses (Sidhu and Toze 2009). In some cases, negative results could be attributed to inefficiency of the used methods.

The choice of methods for this study has been recommended by the Resolution of the National Council of the Environment – CONAMA (Brazilian Ministry of Environment, Resolution no. 357, 2006) which provides guidelines for monitoring enteric viruses in biosolids. Similar to U.S. EPA (625/R-92/013, 2003) this guideline recommends the use of beef extract for concentrating virus in biosolids and also protocols based on ultracentrifugation for concentrating RNA virus. PCR is also appointed for detecting some viral groups, including RV and HAV (CONAMA, 357, 2006).

The primers and probes used in TaqMan qPCR assays target more conservative regions of the virus genome and have been considered suitable for detecting enteric viruses in several environmental matrices (Bofill-Mas et al. 2006; Fumian et al. 2010, 2011; Prado et al. 2011a; Simmons and Xagorarakis, 2011; Villar et al. 2006). However, there is a relative difficulty in amplifying target nucleic acids in biosolid samples due to the presence of a variety of inhibitors, such as humic and fulvic acids, fats, proteins, organic and inorganic compounds, including polyphenols and heavy metals that are recognized to form complexes with nucleic acids and inhibit amplification enzymes (Rock et al. 2010; Sano et al. 2003; Sidhu and Toze 2009).

Results obtained in this study indicate that different virus recovery rates are obtained according to distinct virus concentration methods. The higher mean recovery rates achieved by the method based in beef extract were of 6.2 and 6.3% for AdV and NoV, respectively and are quite similar to results obtained for Sano et al. (2003) that found 7% to recover poliovirus from sewage sludge following detection by RT-PCR.

Ultracentrifugation was considered the better alternative method for detecting RVA and HAV in the spiked experiments, although in naturally contaminated biosolid samples the use of beef extract was able to detect these viruses in similar frequency of detection than the ultracentrifugation based-method. However, mean recovered rate of AdV was very low using ultracentrifugation.

Rock et al. (2010) has reported that beef extract and glycine buffer can concentrate different inhibitors compounds responsible to cause different results using a qPCR assay. Nowadays, it's difficult to determine which characteristic would mainly interfere in qPCR efficiency. Since ultracentrifugation was used in this study as a final strategy to concentrate the viruses after the elution using 15 ml of glycine buffer, a considerable amount of precipitate was generated.

The presence of higher solids could contribute for stronger adsorption of AdV in this particulate matter since the virus size seems to be an important factor related to interactions between colloidal particles in environmental matrices (Down et al. 1998). Moreover, the presence of suspended solids in the final eluate, seems to raise difficulties in the procedure of nucleic acid extraction because, in many cases, these solids remain retained in the inner membrane of the column from the extraction Kit (Qiagen) affecting the elution and purification of nucleic acids.

Moreover, interaction mechanisms between virus and other colloidal particles in complex environmental matrices depend on several factors, such as ionic strength, pH of solution and the content of organic and inorganic matter (Quignon et al. 1998). The viral capsid proteins charge that determine specific isoelectric points can change in function of pH and these approaches need to be further investigated due to the difficulty in assessing data with the current methodologies (Michen and Graule 2010).

Adsorption-elution method based on membrane filtration has been used to concentrate viruses in several environmental matrices, including water samples with high turbidity (Katayama et al. 2008; Prado et al. 2011a). However, adsorption-elution method using a negatively charged membrane filter, presented very low virus mean recovery rates. The filters are quickly clogged and the passage of 2 L of water containing diluted sewage sludge is difficult. Large amounts of viruses can remain adsorbed onto particulate matter retained on the filter surface and NaOH used for virus elution can be inefficient. Despite the advantage this method offers by inorganic elution favoring detection of virus by enzymatic reaction amplification (Katayama et al. 2002), methods based on filtration are not recommended for sludge samples, as verified previously (Belguith et al. 2006).

Several strategies can be adopted to minimize or to predict the interference of environmental inhibitors for PCR reactions (Rock et al. 2010; Viau and Peccia 2009), but dilution of nucleic acids seems to be more simplified, avoiding addition of reagents. Nevertheless, differently of some results obtained from spiked experiments, when nucleic acids from the field samples were diluted at 1:100 none positivity was found, indicating a great dispersion of results when low viral loads are present in biosolid matrices.

The use of an internal control (PP7Bacteriophage) to monitor the stages of detection can be an interesting alternative to avoid false negative results, at least when high viral loads are spiked. High concentrations of PP7 were seeded in field samples and it was possible to observe that in some samples the viral loads recovered were low. It's possible that negative results obtained for some of the enteric viruses in these samples occurred due to biosolid variable composition.

Nevertheless, at least one virus was detected in all analyzed anaerobically digested sludge samples. Similar frequency of detection for AdV, RV-A, NoV and HAV obtained in primary sludge samples were found in biosolid samples using the same protocol of virus concentration and qPCR assays (data showed in part I). Therefore, these enteric viruses present at high concentrations in primary sewage sludge can be detected at similar recovery rates after mesophilic anaerobic digestion, which is recognized to remove 0.5 – 2 log<sub>10</sub> units of enteric viruses from sewage sludge (Godfree and Farrell 2005).

Comparatively, AdV were the most detected viruses (90% of positivity) demonstrating their large dissemination in treated sewage sludge. These results support the hypothesis that AdV could be good indicators for the presence of enteric viruses in biosolid samples (Bofill-Mas et al. 2006; Wong et al. 2010). While Bofill-Mas et al. (2006) reported similar virus concentrations than the ones found in this study but other investigations have found higher AdV genome loads in sewage sludge treated by MAD, with concentrations varying from 10<sup>4</sup> to 10<sup>6</sup> GC g<sup>-1</sup> (d.m.) (Viau and Peccia, 2009; Wong et al. 2010).

Although the RV-A have been found in 45% of the analyzed biosolid samples, higher frequencies of detection could be expected, since recent studies have showed a large dissemination of RV-A in wastewaters from Rio de Janeiro (Fumian et al. 2010, 2011; Prado et al. 2011a). However, there is a hypothesis that RV would poorly be adsorbed in solid fractions of sludge (Arraj et al. 2005; Sidhu and Toze 2009) and it could explain the lower frequency of detection and viral loads when compared with AdV observed in these samples.

Interestingly, NoV GII was predominantly detected in colder months, suggesting a higher burden and circulation of these viruses during this period, corroborating previous results about peaks of occurrence of NoV in sewage samples in Brazil (Victoria et al. 2010).

HAV was poorly recovered from biosolid samples, corroborating data from other studies (Simmons and Xagorarakis 2011; Wong et al. 2010). The lower frequency of HAV detection in biosolids can be expected since the improvement in sanitary and socio-economic conditions seems to be preventing the circulation of these viruses in the community, and consequently, in wastewaters, as recently verified in Rio de Janeiro, Brazil (Prado et al. 2011b). However, another explanation is related to the low recovery rates and high limits of detection of the methods used to detect HAV in biosolids, as demonstrated in this study. Then, the real presence of HAV in biosolids can be underestimated, mainly when low viral loads are circulating in these environments.

Although methods based in nucleic acid amplification are not being able to determine the infectivity of viruses, studies have confirmed that a great proportion of viral genomes detected by molecular methods correspond to viable infectious particles detected in sewage sludge or biosolids (Simmons and Xagorarakis 2011; Wong et al. 2010). Moreover, the aggregation of viruses onto sludge flocs could prevent viral inactivation (Sidhu and Toze 2009).

The mean recovery rates obtained by the virus concentration methods indicate that viral loads found could be higher than the reported in those environmental matrices. The knowledge of specific virus recovery rates achieved by the methods is important to avoid misunderstanding related to potential contamination and quantification of viruses in biosolids and also to ensure a reliable public health risk analysis. Although the virus recovery rates have been relatively low, the feasible concentration method based in beef extract elution followed by qPCR assay seems to be applicable for detecting enteric viruses, mainly AdV, in biosolids.

This is the first study in Brazil reporting the presence and concentrations of RVA, AdV, NoV GII and HAV from anaerobically digested sludge and can be useful to support other studies about virus contamination levels in treated sewage sludge by different stabilization processes using feasible concentration methods for enteric virus recovery by molecular methods.

## 5. Acknowledgements

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/PAPESV – 403530/2008-3) and IOC-FIOCRUZ. The authors thank Dr. Marise Dutra Asensi and MSc. Liliane Myiuki (Laboratory of Bacteriology - IOC/FIOCRUZ) for supporting bacteriophage PP7 replication and the WWTP staff for supplying the sewage samples, under the agreement between Fiocruz and the Water Company of Rio de Janeiro state (CEDAE). This research study is under the scope of the activities of Fiocruz as a Collaborating Center of PAHO/WHO of Public and Environmental Health.

## 6. References

Arraj A, Bohatier J, Laveran H, Traore O (2005) Comparison of bacteriophage and enteric virus removal in pilot scale activated sludge plants. *J Appl Microbiol.* 98: 516-524.

Belguith K, Hassen A, Aouni, M (2006) Comparative study of four extraction methods for enterovirus recovery from wastewater and sewage sludge. *Bioresour Technol.* 97(3): 414-419.

Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R (2006) Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl Environ Microbiol.* 72(12): 7894-7896.

CONAMA, 375 (National Council of Environment – Ministry of Environment) (2006) Guidelines and procedures for use of sewage sludge in agriculture soil. Available online: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf> [in Portuguese].

Dowd SE, Pillai, SD, Wang S, Corapcioglu MY (1998) Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. *Appl Environ Microbiol.* 62(2): 405-410.

Fumian TM, Leite JPG, Castello AA, Gaggero A, Caillou MSL, Miagostovich MP (2010) Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods.* 170 (1-2): 42-46.

- Fumian TM, Leite JPG, Rose TL, Prado T, Miagostovich MP (2011) One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Res.* 45(17): 5755-5763.
- Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa AB, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S (2010) Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 44: 4325 – 4339.
- Godfree A, Farrell J (2005) Processes for managing pathogens. *J Environ Qual.* 34: 105-113.
- Guzmán C, Jofre J, Blanch AR, Lucena F (2007a). Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil, and treated biowaste. *J Virol Methods.* 144 (1-2): 41-48.
- Guzmán C, Jofre J, Montemayor M, Lucena F (2007b) Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J Appl Microbiol.* 103: 2420-2429.
- Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P (2003) Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol.* 70: 228-239.
- IBGE, Brazilian Institute of Geography and Statistics (2008) National surveillance of basic sanitation – PNSB. Available online:  
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb2008/default.shtm> [in Portuguese]
- Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi F, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K (2003) Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 41: 1548-1557.
- Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S (2002) Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detect of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Appl Environ Microbiol.* 68(3): 1033 – 1039.



Katayama H, Haramoto E, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S (2008) One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.* 42: 1441-1448.

Michen B, Graule T (2010) Isoelectric points of viruses. *J Appl Microbiol.* 109(2): 388-397.

Monpoeho S, Maul A, Mignotte-Cadiergues B, Schwartzbrod L, Billaudel S, Ferré V (2001) Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 67(6): 2484-2488.

Monpoeho S, Maul A, Bonnin C, Patria L, Ranarijaona S, Billaudel S, Ferré V (2004) Clearance of human-pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes by Real-Time reverse transcription-PCR and cell culture. *Appl Environ Microbiol.* 70(9): 5434-5440.

Pina S, Jofre J, Emerson SU, Purcell RH, Girones R (1998) Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol.* 64: 4485-4488.

Prado T, Silva DM, Guilayn WC, Rose TL, Gaspar AMC, Miagostovich MP (2011a) Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Res.* 45(3): 1287-1297.

Prado T, Fumian TM, Miagostovich MP, Gaspar AMC (2011b) Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106(2): 104-109.

Quignon F, Thomas F, Gantzer C, Huyard A, Schwartzbrod L (1998) Virus adsorption in a complex system: an experimentally designed study. *Water Res.* 32 (4): 1222-1230.

Rock C, Alum A, Abbaszadegan M (2010) PCR inhibitor levels in concentrates of biosolid samples predicted by a new method based on excitation-emission matrix spectroscopy. *Appl Environ Microbiol.* 76 (24): 8102-8109.

Sano D, Fukushi K, Yoshida Y, Omura T (2003) Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. *Water Res.* 37: 3490-3498.

Sidhu JPS, Toze SG (2009) Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ International.* 35: 187-201.

Simmons FJ, Xagorarakis I (2011) Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. *Water Res.* 45: 3590-3598.

USEPA 625/R-92/013 Environmental Protection Agency of United States (2003) Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. Under 40 CFR Part 503. Appendix H – Method for the recovery and assay of total culturable viruses from sludge.

Viau E, Peccia J (2009) Survey of wastewater indicators and human pathogen genomes in biosolids produced by class A and class B stabilization treatments. *Appl Environ Microbiol.* 75 (1): 164-174.

Victoria M, Guimarães FR, Fumian TM, Ferreira FFM, Vieira CB, Shubo T, Leite JPG, Miagostovich MP (2010) One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health.* 8(1): 158-165.

Villar LM, de Paula VS, Diniz-Mendes L, Lampe E, Gaspar AMC (2006) Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *J Virol Methods.* 137: 169-176.

Wong K, Onan BM, Xagorarakis I (2010) Quantification of enteric viruses, pathogen indicators, and *Salmonella* bacteria in class B anaerobically digested biosolids by culture and molecular methods. *Appl Environ Microbiol.* 76 (19): 6441-6448.

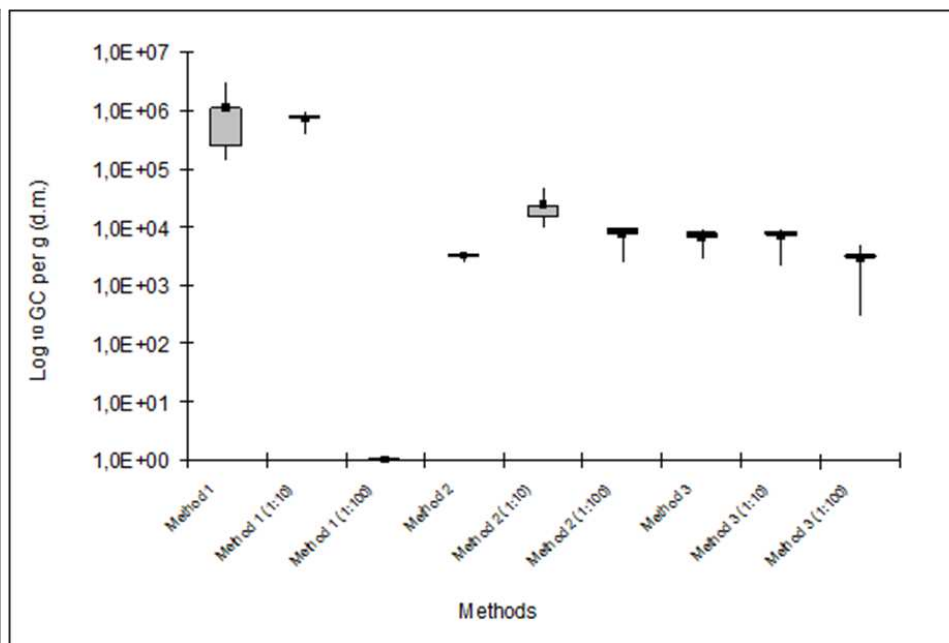
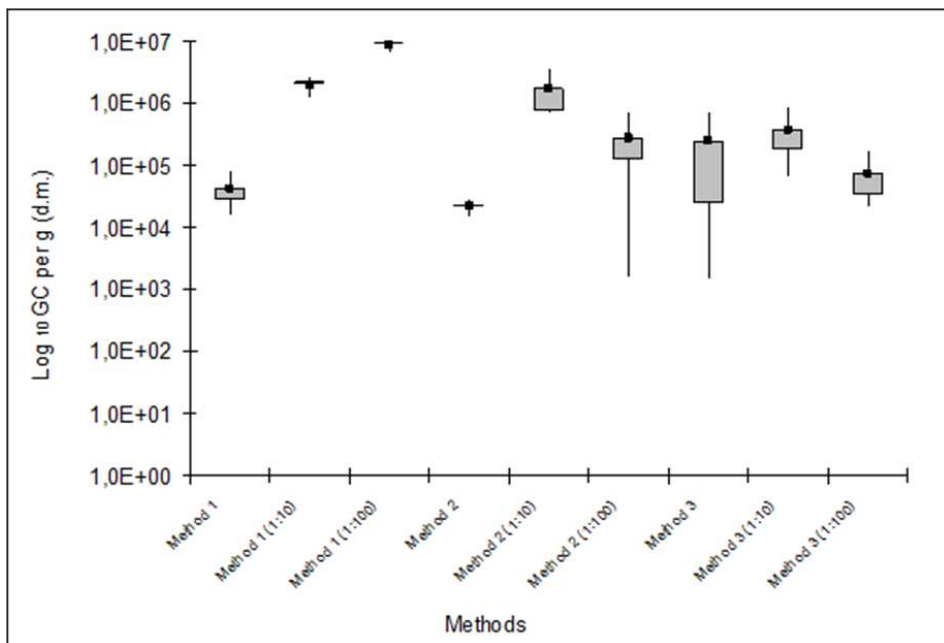
**Table 1** Percentage (%) of viruses adsorbed on sludge flocs

Viruses	Viruses spiked onto sludge samples (GC ml <sup>-1</sup> )	Viruses in supernatant (GC ml <sup>-1</sup> )	Viruses adsorbed on sludge flocs
	Mean */ SD	Mean* / SD	(%)
AdV	$4 \times 10^8 / 5.9 \times 10^8$	$6.7 \times 10^3 / 5.4 \times 10^3$	99.99 %
RVA	$3.5 \times 10^6 / 2.8 \times 10^5$	$8.5 \times 10^2 / 8.5 \times 10^2$	99.97 %
NoV	$3.6 \times 10^4 / 1.9 \times 10^4$	$2.5 \times 10 / 1.5 \times 10$	99.93 %
HAV	$2.7 \times 10^5 / 6.3 \times 10^4$	$2.6 \times 10^2 / 4.5 \times 10^2$	99.90 %
PP7	$4.2 \times 10^7 / 0$	$4.2 \times 10^5 / 4.0 \times 10^5$	99.0 %

SD=standard deviation; \*Methods were run in triplicate.

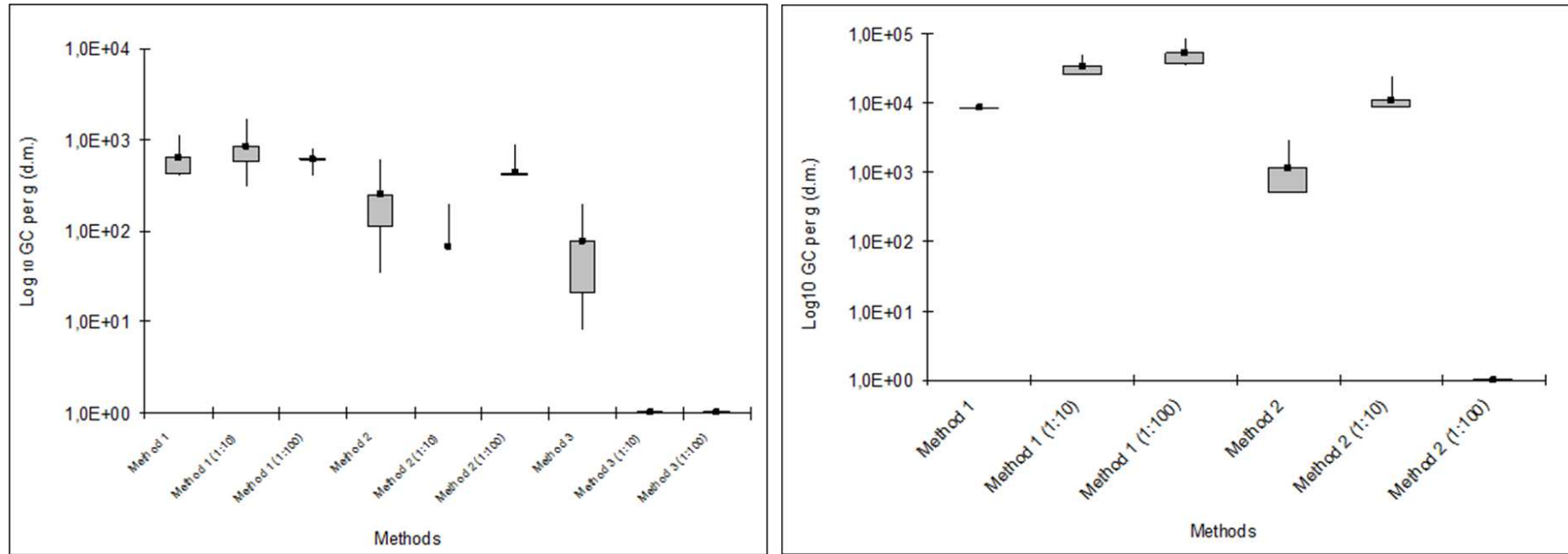
(a) AdV

(b) RV-A

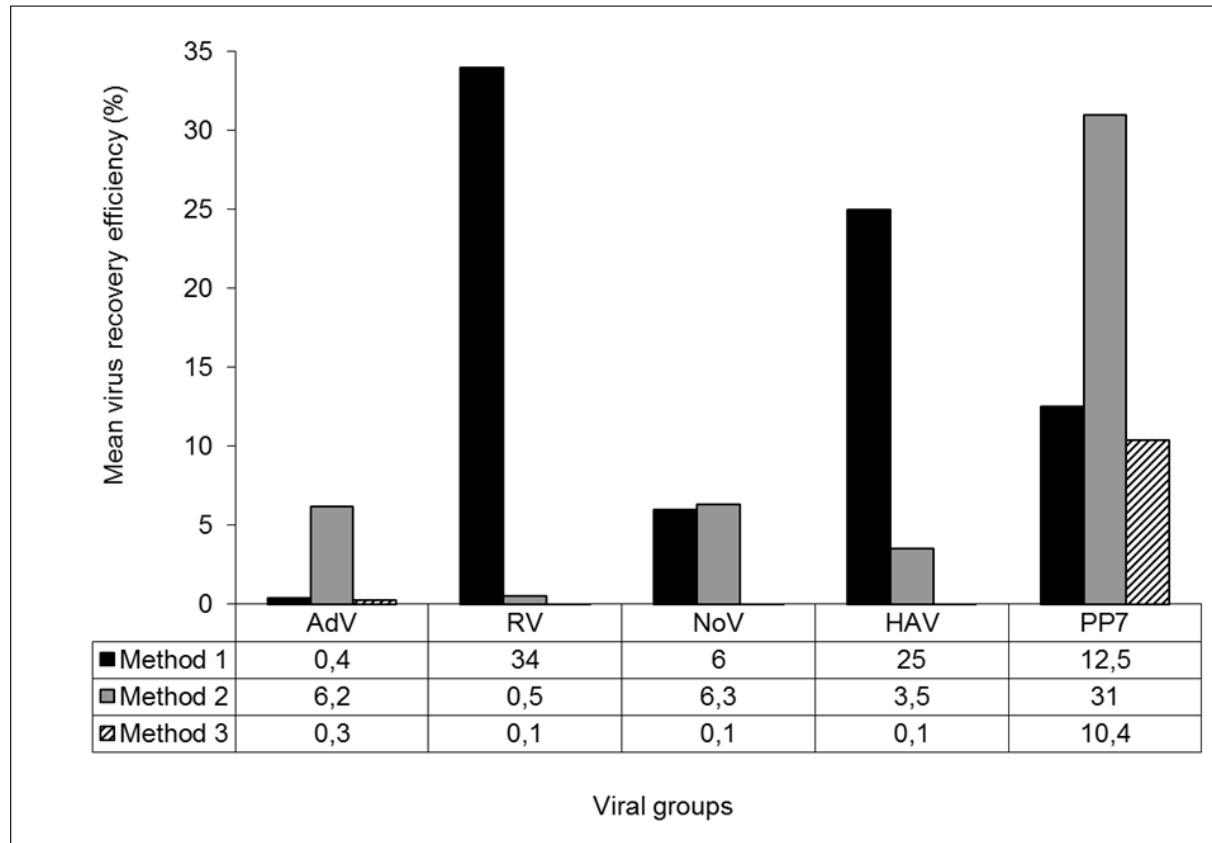


(c) NoV GII

(d) HAV



**Fig 1** Mean numbers in log<sub>10</sub> units of viruses recovered (genome copies - GC g<sup>-1</sup>) from biosolid samples according to each method tested: adenovirus (a), rotavirus (b), norovirus GII (c), hepatitis A (d). Methods were performed in triplicate. Tenfold serial dilution of nucleic acids are shown in parenthesis on the x axis; Bars = Minimum and maximum value; square in black = mean value. Method 1 = ultracentrifugation; Method 2 = beef extract; Method 3 = adsorption-elution. Initial viral titers spiked (GC ml<sup>-1</sup>): **Method 1:** 1.1 × 10<sup>9</sup> (AdV), 3.2 × 10<sup>6</sup> (RVA), 1.4 × 10<sup>4</sup> (NoV), 2 × 10<sup>5</sup> (HAV); **Method 2:** 2.7 × 10<sup>7</sup> (AdV), 3.8 × 10<sup>6</sup> (±SD 2.8 × 10<sup>5</sup>) (RVA), 3.4 × 10<sup>4</sup> (±SD 2.3 × 10<sup>4</sup>) (NoV), 9 × 10<sup>5</sup> (±SD 1 × 10<sup>6</sup>) (HAV); **Method 3:** 1 × 10<sup>8</sup> (AdV), 3.7 × 10<sup>6</sup> (RVA), 4.8 × 10<sup>4</sup> (NoV), 3.1 × 10<sup>5</sup> (HAV).



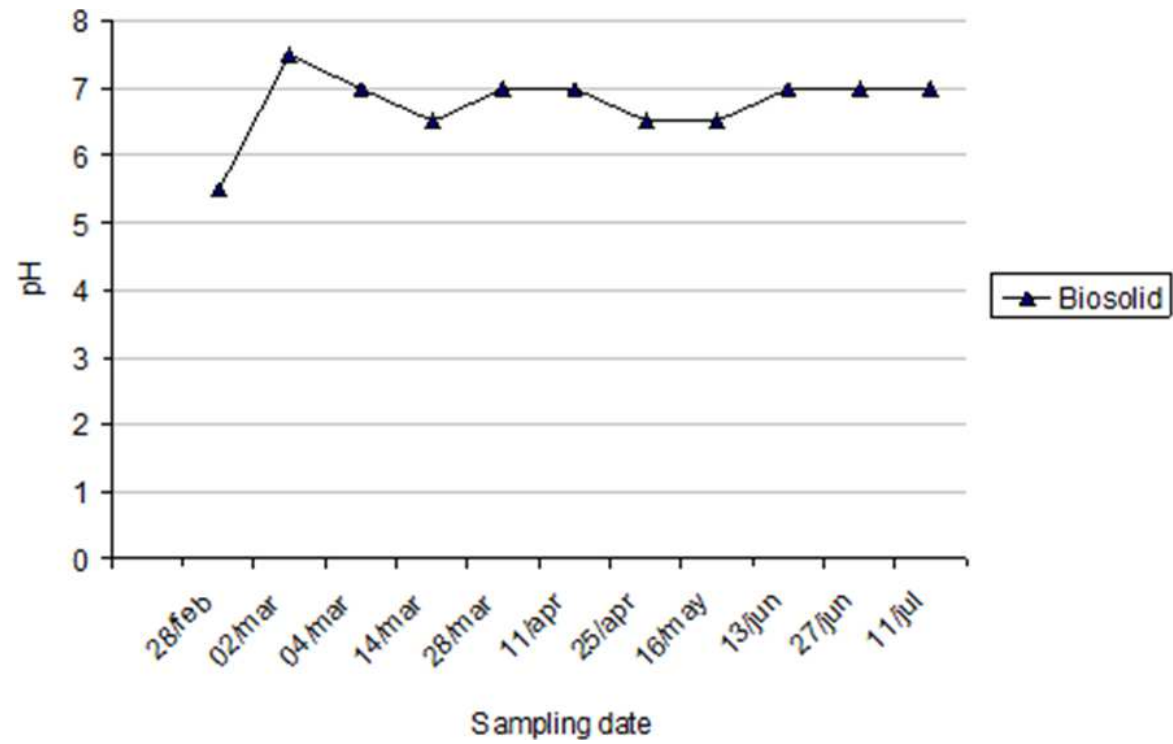
**Fig 2** Virus recovery efficiency (%) according to higher mean value obtained in each method performed in triplicate, including inhibitions' tests.



**Table 2** Results of viral loads (GC g<sup>-1</sup> d.m.) obtained by real-time PCR assay in anaerobically digested sludge samples using two concentration methods

Sampling date	AdV		RV-A		NoV		HAV		PP7	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
28/02	6.8 x 10	0.9 x 10	0	0	0	0	0	0	1 x 10 <sup>3</sup>	ND
02/03	0	4.2 x 10	0	3.8 x 10	0	0	0	0	3.8 x 10 <sup>3</sup>	2.6 x 10 <sup>3</sup>
04/03	2.1 x 10	6.8 x 10	1.6 x 10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	2 x 10 <sup>2</sup>	1.4 x 10 <sup>2</sup>
14/03	1.4 x 10	1.1 x 10 <sup>2</sup>	7.8 x 10	6.2 x 10	0	0	0	0	3.7 x 10 <sup>2</sup>	1.8 x 10 <sup>2</sup>
28/03	0	4.3 x 10	0	0	0	0	0	0	1.4 x 10 <sup>8</sup>	3.7 x 10 <sup>2</sup>
11/04	0	0	0	0	0	4.8 x 10 <sup>2*</sup>	0	0	1.3 x 10 <sup>8</sup>	4.8 x 10 <sup>2</sup>
25/04	1 x 10	2.4 x 10	0	0	0	0	0	0	1.3 x 10 <sup>8</sup>	9.4 x 10 <sup>7</sup>
16/05	0	2.7 x 10 <sup>2</sup>	0	0	6.4 x 10	1.2 x 10 <sup>2</sup>	0	0	1.3 x 10 <sup>8</sup>	5.4 x 10 <sup>7</sup>
13/06	0	1.9 x 10 <sup>2</sup>	0	0	1.4 x 10	1.5 x 10 <sup>2</sup>	0	2 x 10 <sup>4</sup>	3.1 x 10 <sup>7</sup>	5.6 x 10 <sup>7</sup>
27/06	2.4 x 10 <sup>3</sup>	3.6 x 10 <sup>2</sup>	2.5 x 10 <sup>*</sup>	0	2.2 x 10	2.3 x 10 <sup>2</sup>	4.8 x 10 <sup>3</sup>	0	ND	9.2 x 10 <sup>7</sup>
11/07	0	1.6 x 10 <sup>2</sup>	0	7.2 x 10	1.8 x 10	5.2 x 10 <sup>2</sup>	0	0	1 x 10 <sup>8</sup>	ND
<b><i>n</i> positive / <i>n</i> total</b>	5/11	10/11	3/11	3/11	4/11	5/11	1/11	1/11	10/10	9/9

Method 1 = ultracentrifugation; method 2 = beef extract; \* diluted nucleic acids (1:10), ND = not done



**Fig 3** pH value from biosolid samples

## 6. DISCUSSÃO

---

O monitoramento viral em águas residuárias ou efluentes de ETEs tem sido descrito como modelo apropriado para a compreensão da epidemiologia dos vírus de disseminação entérica prevalentes na comunidade servida pelo sistema de esgotamento sanitário (Pina et al. 2001., Iwai et al. 2009., Kamel et al. 2009; Fumian et al. 2011; Kokkinos et al. 2011).

A prevalência dos vírus de disseminação entérica nas águas residuárias pode ser variável de acordo com o tipo de esgoto analisado. A pesquisa de vírus patogênicos presentes em esgotos de origem hospitalar ainda é pouco explorada na literatura científica internacional. No Brasil nenhum estudo ainda havia sido conduzido para verificar a contaminação das águas residuárias hospitalares quanto à presença e a quantificação de agentes virais patogênicos nesses ambientes.

Um dado inédito obtido nessa pesquisa foi a avaliação da contaminação viral nos efluentes de um sistema anaeróbio constituído de um reator UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) seguido pelo pós-tratamento com três filtros anaeróbios dispostos em série (ETE hospitalar 1). Embora estes sistemas anaeróbios não sejam desenhados com o maior objetivo de remover microorganismos patogênicos, era necessário validar dados em relação ao desempenho dos mesmos na remoção viral.

Sistemas de tratamento anaeróbios, incluindo tanques sépticos, lagoas anaeróbias, reatores tipo UASB e filtros anaeróbicos são incentivados no Brasil porque demandam menos custos para a construção, operação e manutenção (Chernicharo, 2001). Além disso, a degradação da matéria orgânica e dos poluentes realizada pelo processo anaeróbico apresenta melhor desempenho sob temperaturas mais elevadas, ideais para os países de clima tropical (Aiyuk et al. 2006).

No entanto, vem sendo demonstrado que esses processos não apresentam bom desempenho na remoção de matéria orgânica e microorganismos patogênicos sob as condições de operação no país (Oliveira e Von Sperling, 2008). Os resultados obtidos nesse estudo, também demonstraram que os sistemas de reatores UASB e filtros anaeróbios não são eficientes para reduzir cargas consideráveis de vírus de disseminação entérica presentes em esgoto hospitalar. No entanto, outras tecnologias de pós-tratamento para reatores tipo UASB,

como lagoas de polimento ou anaeróbicas, poderiam aumentar a eficiência de remoção de microorganismos (Von Sperling, 2005., Oliveira e Von Sperling, 2008), embora tais sistemas ainda não tenham sido avaliados quanto à capacidade para remover vírus entéricos.

O desempenho de um processo de tratamento de esgoto aeróbio, operando por lodo ativado com aeração prolongada (ETE hospitalar 2), também foi avaliado quanto à sua capacidade na remoção de HAV e vírus gastroentéricos circulantes em esgoto hospitalar. Em relação à avaliação de remoção viral nessa ETE também foi possível constatar que elevadas cargas virais permanecem nos efluentes finais tratados, mesmo após a aplicação da desinfecção final por cloração.

A resistência de vírus entéricos em efluentes de ETEs tratados com cloração vem sendo demonstrada em alguns estudos (Carducci et al. 2008., Petrinca et al. 2009) e os autores atribuem que a ineficácia dos processos de cloração pode estar associado à presença de matéria orgânica ou sólidos em suspensão presentes nos efluentes finais. Além disso, o processo de desinfecção estaria relacionado com outros fatores, tais como temperatura, força iônica, pH, doses de cloro aplicadas e o tempo de contato (Cromeans et al. 2010., Lim et al. 2010).

Outros estudos também apontam para a resistência dos vírus entéricos a processos de tratamento secundário e terciário ou avançado (He et al. 2008), demonstrando que a remoção viral em diversos tipos de sistemas de tratamento de esgoto é um grande desafio.

Em relação à distribuição dos tipos de vírus de disseminação entérica analisados, foi possível demonstrar que os RVA e os AdV são prevalentes nessas águas residuárias, sendo que as concentrações de RVA são maiores do que para todos os outros vírus analisados, sugerindo uma alta taxa de infecção por RVA nos ambientes hospitalares avaliados.

A grande disseminação e concentração de RVA na ETE 2 poderia estar associada ao número de pacientes atendidos nesse hospital. Esse hospital público tem capacidade para atender 12 000 pacientes por mês, mas, na época da realização do estudo, contava com uma superlotação de 22 000 pacientes.

Embora não tenha sido possível obter dados de diagnósticos clínicos e número de pacientes acometidos por diarreia aguda nesse hospital, a precariedade dos serviços de saúde poderia contribuir para a disseminação de infecções gastroentéricas, principalmente em locais fechados ou com grande adensamento populacional. Tal situação poderia comprometer

também a higienização adequada de leitos e áreas de uso comum, contribuindo para a disseminação viral no ambiente hospitalar, como referido em estudos anteriores (Linhares, 2000).

Embora o estudo da detecção viral nos efluentes da ETE 2 tenha compreendido o período de julho de 2008, nenhum efeito marcante na sazonalidade da detecção de RVA vem sendo demonstrada em águas residuárias urbanas do RJ (Fumian et al. 2011). A grande disseminação de RVA também corrobora dados de estudos anteriores sobre a prevalência desses vírus em comparação à ocorrência de outros vírus de disseminação entérica em ambientes aquáticos brasileiros (Miagostovich et al. 2008; Ferreira et al. 2009).

Padrões de alta circulação de RVA em águas residuárias também são observados na China (He et al. 2008). Na maioria dos países europeus, EUA e Japão estudos sobre a ocorrência de RVA em águas residuárias são menos proeminentes e NoV são mais extensivamente pesquisados, muito provavelmente porque infecções de RVA atingem principalmente crianças dos países em desenvolvimento.

Os AdV foram os vírus mais detectados na ETE 1 e o segundo na ETE 2, mas nenhuma diferença estatística foi encontrada entre a prevalência desses vírus e entre os RVA nas duas ETEs. A grande diversidade de espécies e sorotipos de AdV capazes de causar inúmeras infecções (gastroentéricas, respiratórias, urinárias, oculares, etc) poderiam contribuir para a ampla disseminação nessas amostras.

O HAV foi o segundo agente viral cujas concentrações obtidas por L de esgoto bruto no sistema aerado foram as mais elevadas (média:  $2.1 \times 10^7$  CG L<sup>-1</sup>). Comparando esses dados com resultados obtidos através do monitoramento realizado ao longo de 1 ano sobre a detecção de HAV em águas residuárias urbanas do RJ (Villar et al. 2007., Prado et al. 2011b) foi possível observar que as concentrações de HAV presentes nas águas residuárias hospitalares foram maiores do que em esgoto doméstico.

Comparativamente, os NoV foram menos frequentemente detectados nos efluentes hospitalares, com prevalência do GII. A prevalência de NoV GII disseminados em águas residuárias do RJ já havia sido previamente constatada (Victoria et al. 2009), bem como em amostras clínicas (Victoria et al. 2007).

As frequências de detecções obtidas usando cPCR e qPCR foram analisadas e nenhuma diferença estatística foi encontrada em relação à aplicabilidade para detectar vírus

de disseminação entérica em águas residuárias hospitalares, exceto para NoV para os quais o melhor desempenho da qPCR usando pares de primers para amplificar a região da junção do genoma (ORF1 e ORF2) já havia sido observada (Victoria et al. 2009).

No entanto, outros estudos demonstraram que a cPCR usada para amplificar o segmento do genoma da região da junção VP1/2A de HAV em amostras de água e esgoto apresenta um desempenho inferior à qPCR usada para amplificar a região 5' não codificante (NC) do genoma (Villar et al. 2006, 2007., Prado et al. 2011b).

Uma explicação poderia estar relacionada ao limite de detecção dessas análises. Villar et al. 2006, demonstrou que o limite de detecção da qPCR referida anteriormente era de 60 CG ml<sup>-1</sup> para detectar HAV em amostras de água, enquanto limites muito maiores foram obtidos para cPCR. Nesse sentido, nenhuma diferença significativa pôde ser observada com o uso desses dois métodos na detecção de HAV em amostras de esgoto hospitalar uma vez que provavelmente as cargas virais presentes nesses efluentes estariam bem acima do limite de detecção da cPCR.

Altas concentrações virais também foram obtidas nos efluentes tratados de ambas as ETEs para todos os grupos de vírus analisados, indicando que esses processos biológicos convencionais de tratamento de esgotos hospitalares não poderiam contribuir em grande medida para evitar a disseminação desses agentes patogênicos em corpos de águas receptores.

Também é importante enfatizar que o método baseado em filtração através de membrana carregada negativamente utilizado para concentrar os vírus nesses efluentes apresenta uma eficiência de 5% para recuperar RVA em esgoto bruto (Fumian et al. 2010). Por isso, cargas virais ainda maiores poderiam estar presentes nessas águas residuárias.

A análise filogenética dos genomas virais detectados nos efluentes hospitalares demonstrou a grande variabilidade de genótipos presentes nesses ambientes.

Pares de primers para amplificar um fragmento de 379 pb da região do genoma de RVA que codifica a proteína VP6 foram utilizados para identificar subgrupos (SG) de RVA presentes nos efluentes hospitalares. Essa região de amplificação do genoma foi utilizada porque havia sido previamente descrita como a mais apropriada para detectar RVA em amostras ambientais (Ferreira et al. 2009).

Somente RVA SGI foram identificados nos efluentes hospitalares analisados em 2006-2008, diferindo de resultados anteriores demonstrando a prevalência de RVA SGII detectados em águas residuárias do RJ em 2005 (Ferreira et al. 2009). Foi sugerido que RVA SGI estaria mais associado com cepas de RV animais ou envolvidas em eventos de *reassortment* baseado em estudos sobre a segregação independente dos genes que codificam as proteínas VP7 e VP4 (Iturriza-Gómara et al. 2002). Nesse mesmo estudo também foi sugerido que genótipos de RV G2P[4] poderiam ser prevalentes entre cepas de RVA contendo especificidade de SGI (Iturriza-Gómara et al. 2002).

Alguns estudos já vinham demonstrando a prevalência do genótipo G2P[4] de RVA no Rio de Janeiro após a introdução do programa de vacinação nacional para rotavírus em 2006 (Carvalho-Costa et al, 2009, 2011).

Um estudo recente demonstrou a disseminação de RVA em esgoto da cidade do RJ e foi observada a predominância dos genótipos G2 e P[4] utilizando nested PCR com amplificação parcial de segmentos do genoma que codificam as proteínas VP7 e VP4, respectivamente (Fumian et al. 2011). No entanto, nenhum genótipo de RV de origem vacinal foi identificado nesse mesmo estudo. Outro estudo publicado recentemente demonstrou que a vacina pentavalente (RV5) de RVA introduzido na Nicarágua contribuiu para a redução de infecções de RV na região, incluindo uma baixa circulação desses vírus em águas residuárias urbanas e hospitalares na cidade (Bucardo et al. 2011).

De acordo com algumas especulações, a vacina monovalente G1P[8] de RVA Rotarix<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium) poderia estar contribuindo para um efeito de pressão seletiva no surgimento e emergência de outros genótipos de RV circulantes na comunidade, uma vez que teria menor efeito, principalmente na prevenção da circulação de cepas G2P[4] heterotípicas (Ruiz-Palacios et al. 2006). Entretanto, Leite et al. (2008) alertou para o problema das flutuações genotípicas naturais de RV, para os quais a prevalência do genótipo G2P[4] poderia não estar associado necessariamente com a vacinação.

A vacinação tem um importante papel na redução da morbidade e mortalidade por doença diarreica no país (Carmo et al. 2011) e sua utilização como medida preventiva no controle da infecção de RV-A não deve ser desconsiderada.

No entanto, a alta circulação de RVA em ecossistemas aquáticos brasileiros poderia estar relacionada com diversos fatores, entre eles, o alcance incompleto da cobertura vacinal



em certas regiões do país (incluindo a administração da primeira e segunda dose) (Carmo et al. 2011). Além disso, os fatores sócio-econômicos e ambientais também podem ter influência nos padrões epidemiológicos da doença em algumas regiões brasileiras. A precariedade das moradias e a falta de saneamento básico em diversas comunidades podem propiciar condições favoráveis para o aumento do número de infecções por RV, incluindo infecções mistas. Também é importante considerar o potencial de transmissão zoonótica nessas regiões, que pode contribuir para a ocorrência de eventos de *reassortment* de genes entre diferentes espécies de RV, acarretando mudanças genéticas e contribuindo para que certas cepas de RV sejam resistentes à imunidade conferida pela vacinação.

Em relação à caracterização molecular dos AdV detectados nos efluentes hospitalares, foi interessante observar uma grande variedade de espécies circulantes nesses ambientes, a qual se constituiu em um dado inédito no Brasil. A espécie D de AdV foi a única encontrada nos efluentes da ETE 1, enquanto 50% das espécies caracterizadas na ETE 2 corresponderam às espécies C e D, as quais são comumente associadas à infecções respiratórias e conjuntivite nosocomial. Dessa forma, uma maior variabilidade de espécies de AdV poderiam ser obtidas a partir de amostras de águas residuárias hospitalares, ao contrário do esperado em esgotos domésticos ou em águas superficiais, nos quais é esperado a predominância de AdV gastroentéricos (espécie F, sorotipos 40 e 41) (Haramoto et al. 2007b., Miagostovich et al. 2008).

Tal afirmativa parece estar de acordo com dados recentes obtidos através da avaliação de AdV em amostras de esgoto urbano da cidade do RJ, em que foi demonstrada a predominância de AdV espécie F em amostras coletadas ao longo de 1 ano (2009-2010) em uma grande ETE da cidade (Fumian et al. dados não publicados – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental – IOC/FIOCRUZ/RJ).

Todos os NoV identificados nos efluentes hospitalares em 2006 e 2008 foram pertencentes ao genótipo GII.4. O genótipo GII.4 é descrito como o principal genótipo envolvido em casos de surtos de gastroenterite aguda por NoV no mundo (Siebenga et al. 2007). Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores demonstrando a prevalência desse genótipo em amostras clínicas e ambientais do Rio de Janeiro e outros Estados brasileiros (Victoria et al. 2007; 2009; Barreira et al. 2010; Ferreira et al. 2010).

Para comparar com os resultados de detecção viral obtidos em efluentes de ETES hospitalares, a detecção dos vírus de disseminação entérica foi realizada em outro estudo

conduzido para avaliar a contaminação das águas residuárias urbanas do RJ, bem como os efluentes de diversas etapas de tratamento de uma ETE de grande porte (ETE Alegria – Caju, RJ). Esse estudo iniciou com a detecção de HAV monitorado durante 1 ano (2009-2010) nos efluentes dessa ETE.

A análise de HAV em amostras de esgoto é considerada importante para avaliar a melhoria das condições de saneamento básico das comunidades (Rodriguez-Manzano et al. 2010), uma vez que a prevalência e a incidência da infecção estariam altamente relacionadas às condições sanitárias e sócio-econômicas das populações (Santos et al. 2008).

O Brasil não tem adotado um programa universal de vacinação para hepatite A e as medidas preventivas recaem sobre a melhoria das condições sanitárias das comunidades (Hendrickx et al. 2008).

O monitoramento de HAV em águas residuais urbanas do Rio de Janeiro (2009-2010) demonstrou que 58% das amostras foram positivas para esse vírus, confirmando o potencial de contaminação desses esgotos.

Uma redução estatisticamente significativa na frequência de positividade para HAV em águas residuais urbanas do RJ foi obtida quando comparadas a um estudo prévio sobre a detecção de HAV em esgoto do RJ em 2005, sugerindo que as melhorias das condições sócio-econômicas e acesso ao saneamento básico podem estar contribuindo para prevenir infecções de hepatite A nessa região.

Picos de concentrações de HAV foram obtidos nos meses mais quentes e chuvosos, similarmente a um estudo prévio (Villar et al. 2007), demonstrando que os fatores climáticos podem ter grande contribuição para a epidemiologia do HAV no RJ. Esses resultados também confirmaram dados de estudos prévios demonstrando que existe uma variação sazonal para a ocorrência de infecções de hepatite A no Brasil, as quais seriam predominantes nos meses mais quentes e chuvosos (Villar et al. 2002., Santos et al. 2008).

Dessa forma, o monitoramento de HAV utilizando abordagem ambiental poderia ser um instrumento útil para apoiar estudos epidemiológicos no Brasil.

Nesse estudo, o HAV não foi detectado nos efluentes tratados na ETE de grande porte sugerindo que esse sistema pôde ser adequado no controle da disseminação de HAV durante o

período analisado. No entanto, cargas virais abaixo do limite de detecção da qPCR poderiam estar presentes nesses efluentes.

As amostras positivas na qPCR foram submetidas à amplificação através de uma nested RT-PCR com alvo na região de junção do genoma correspondente à VP1/2A. Somente amostras que apresentaram maiores concentrações de genomas virais através da qPCR puderam ser detectadas através da nested RT-PCR. Um estudo anterior já havia demonstrado que essa mesma análise de nested RT-PCR era menos sensível do que a qPCR para detectar HAV em amostras ambientais (Villar et al. 2006).

A análise filogenética dos isolados de HAV obtidos nesse estudo demonstraram a prevalência do genótipo I e apenas subgenótipo IA foi detectado, corroborando a prevalência da circulação desse genótipo no Brasil (De Paula et al. 2004., Santos et al. 2008). A prevalência do subgenótipo IA também é observada nos países da América do Sul e parece ser o único subgenótipo identificado em alguns países dessa região (Costa-Mattioli et al. 2001., Munné et al. 2007., Sulbaran et al. 2010).

Três isolados de HAV apresentaram 100% de identidade de nucleotídeos, sugerindo que poderiam ser provenientes de um mesmo surto. Comparando essas sequências nucleotídicas com outras sequências disponíveis no GenBank, maiores identidades foram obtidas com isolados de HAV detectados na região nordeste do Brasil, especificamente do Maranhão e Pernambuco e com isolados circulantes no RJ. Um isolado diferente (RJ 616) obteve maior identidade de nucleotídeos com HAV circulantes no RJ e Argentina.

Alguns autores sugerem que existe uma população endêmica de HAV circulando nos países sul-americanos e esse fenômeno poderia ser evidenciado através das similaridades filogenéticas (Munné et al. 2007).

No entanto, embora a região da VP1/2A seja adequada para distinguir diferentes genótipos de HAV e estabelecer relações filogenéticas, outras regiões do genoma estão sendo propostas para identificar as relações filogenéticas entre diferentes isolados de HAV com maior grau de acuidade, tais como a região de 390 pb da região VP1/P2B e a região da VP1 completa (Costa-Mattioli et al. 2003., Nainan et al. 2006).

Também é importante enfatizar que um número limitado de isolados de HAV sul-americanos tem sido caracterizado no nível genômico (De Paula et al. 2002., Munné et al. 2007) e, portanto, é necessário ampliar essa linha de investigação nesses países para que as

inferências sobre as relações epidemiológicas entre diferentes isolados de HAV dessa região sejam mais precisas no futuro.

A partir da obtenção dos resultados de HAV detectados nos efluentes da ETE Alegria em 2009-2010, estudos subsequentes foram realizados em 2011 no intuito de comparar as frequências de detecção obtidas para outros vírus entéricos, incluindo a análise mais detalhada sobre a distribuição viral em diferentes estágios do processo de tratamento, incluindo amostras de esgoto bruto, lodo de esgoto do decantador primário, esgoto do efluente de decantação primária, efluente do decantador secundário e dos resíduos sólidos finais (biossólidos) produzidos como consequência do processo de tratamento.

Poucos estudos têm sido conduzidos para avaliar a presença de vírus de disseminação entérica durante distintos estágios de processos de tratamento de esgotos (Simmons e Xagorarakis, 2011).

Através da análise comparada foi possível observar que nenhuma diferença estatística foi obtida para as frequências de detecção de RVA, AdV e NoV GII nas amostras de esgoto bruto, enquanto RVA e AdV foram mais prevalentes nas amostras de efluente primário (após decantação primária). No entanto, as cargas médias de genomas de RVA obtidas nos efluentes de decantação primária foram mais elevadas do que para AdV.

Os resultados obtidos para as amostras de lodo primário sugerem que essas amostras contêm cargas elevadas de vírus de disseminação entérica, especialmente AdV que foram detectados em 90% das amostras analisadas. Amostras de lodo primário poderiam conter concentrações virais pelo menos 1 – 2 unidades  $\log_{10}$  maiores do que no esgoto bruto. Embora os RVA tenham sido detectados com maior frequência nas amostras de esgoto bruto, o mesmo não foi verificado para as amostras de lodo primário. Alguns autores têm sugerido que os RV adsorveriam pobremente nas frações sólidas de lodo (Arraj et al. 2005; Sidhu e Toze, 2009) e este estudo apóia esta hipótese, embora as menores frequências de detecção nessas amostras também poderiam estar associadas à eficiência de recuperação dos métodos utilizados.

Os dados também demonstraram que HAV são menos frequentes nas águas residuárias do RJ quando comparados com os outros vírus de disseminação entérica e a baixa frequência de detecção obtida estão de acordo com outros estudos conduzidos no Brasil (Barrella et al. 2009; Schilindwein et al. 2010).

Nenhum HAV foi detectado nos efluentes finais tratados, similarmente ao estudo realizado anteriormente em 2009-2010. No entanto, comparando dados desse estudo com o realizado em 2009-2010, uma menor frequência de detecção de HAV foi observada em 2011 para o período observado, sugerindo que a disseminação desses vírus nas águas residuárias urbanas do RJ está em declínio.

Embora os vírus entéricos tenham sido detectados com menores frequências nas amostras de efluentes tratados (após decantação secundária) relativamente altas cargas de vírus persistiram ao processo de tratamento. Entretanto, o sistema foi capaz de remover cerca de 1 – 1,5 unidades  $\log_{10}$  de cópias de genomas virais em relação ao esgoto bruto, o que estaria dentro do esperado para padrões de remoção viral nestes sistemas biológicos secundários (Godfree e Farrell, 2005).

A análise dos parâmetros físico-químicos nos efluentes tratados dessa ETE demonstraram que a DBO (demanda bioquímica de oxigênio), DQO (demanda química de oxigênio), SS (sólidos sedimentáveis) e pH estavam dentro dos limites aceitáveis para efluentes de ETEs, exceto para coliformes, para os quais um valor acima de 2500 NMP/100 ml foi determinado (anexo item 10.1.4., Cedae - relatório técnico, 2009-2010).

Diferentes metodologias para a recuperação viral em lodo de esgoto e biossólidos também foram avaliadas. A grande questão associada com a detecção viral nessas matrizes ambientais se refere à eficiência dos métodos disponíveis e dos inibidores naturais que interferem nas reações de amplificação de ácidos nucleicos.

Diversos métodos são descritos para recuperar vírus nessas matrizes ambientais, mas os procedimentos essenciais incluem a aplicação de reagentes eluentes para desagregar os vírus aderidos aos sólidos e etapas posteriores de concentração que podem ser realizadas por métodos de centrifugação, ultracentrifugação, aplicação de polímeros sintéticos como PEG ou floculação orgânica, que consiste na diminuição do pH da solução para promover a precipitação de proteínas (Katzenelson et al. 1976; Farrah et al. 1981; Goyal et al. 1984; Lewis e Metcalf, 1988; Lasobras et al. 1999; Mignotte et al. 1999; Monpoeho et al. 2001, 2004., Sano et al. 2003; Belguith et al. 2006; Guzmán et al. 2007a, 2007b; Rock et al. 2010; Schlindwein et al. 2010; Wong et al. 2010; 2011).

O extrato de carne tem sido considerado como o melhor eluente em diversos protocolos testados (Farrah et al. 1981., Monpoeho et al. 2001., Belguith et al. 2006., Guzmán

et al. 2007a, 2007b) e tem sido o reagente recomendado pela US EPA (apêndice H, 2003), assim como pela Resolução Conama 375, 2006, para recuperar vírus entéricos em biossólidos.

Dessa forma o método de recuperação baseado na eluição utilizando extrato de carne foi escolhido para a detecção viral em lodo e biossólidos nesse estudo. Esse método foi adaptado por Guzmán et al. (2007a) que simplificou o método inicialmente proposto pela US EPA (2003) e ainda não havia sido testado para a recuperação de vírus gastroentéricos e HAV. Outro método foi baseado na eluição utilizando glicina seguido de ultracentrifugação, contendo menores modificações (Pina et al. 1998).

Para amostras de biossólidos, um terceiro método foi testado baseado em adsorção-eluição em filtros de membrana carregados negativamente, o qual vem sendo utilizado para a detecção viral em amostras de esgoto (Villar et al. 2007; Katayama et al. 2008).

De acordo com os experimentos de inoculação viral, o método de adsorção-eluição apresentou a menor eficiência de recuperação e não foi utilizado para a detecção viral nas amostras de biossólidos naturalmente contaminadas. Os filtros contendo material residual de lodo retido foram secos para a remoção da umidade e caracterizados em MEV (para maiores detalhes consultar item 10.3. do anexo). As micrografias eletrônicas (anexo 10.3.6 – Imagens: 9.3.6.1, 9.3.6.2, 9.3.6.3 e 9.3.6.4) demonstraram que quantidades consideráveis de matéria orgânica com argilominerais (indicados pela presença de Si, Al e Fe) estavam presentes nas amostras retidas nos filtros o que pode ter contribuído para prejudicar a eluição dos vírus com NaOH.

Os experimentos realizados com a inoculação de títulos virais conhecidos demonstraram que diferentes eficiências de recuperação podem ser obtidas de acordo com o tipo de método e grupo viral analisado. De uma maneira geral, as eficiências dos métodos de recuperação para detectar RVA, NoV GII e HAV foram mais baixas para a recuperação em amostras de lodo primário do que para biossólidos. Os dados sugerem que amostras de lodo primário poderiam conter maiores quantidades de substâncias inibidoras, tais como ácidos, metais pesados, polifenóis e matéria orgânica do que no lodo tratado (biossólido). Guzmán et al. (2007) também apontou a maior dificuldade em detectar colifagos em amostras de lodo contendo maiores níveis de umidade.

No entanto, quando os métodos foram utilizados para avaliar amostras naturalmente contaminadas de lodo e biossólidos o método de extrato de carne apresentou maior

confiabilidade para detectar AdV, RVA e NoV GII. O HAV foi somente detectado em uma amostra de lodo primário pelo método de ultracentrifugação, e em duas amostras de biossólidos pelo método de extrato de carne e ultracentrifugação, sugerindo que para estes vírus que estão presentes em baixas proporções o método de ultracentrifugação poderia aumentar a probabilidade de concentração e detecção.

Rock et al. (2010) têm demonstrado que a eluição viral de biossólido digerido anaerobicamente utilizando extrato de carne poderia concentrar maior quantidade de compostos inibidores que afetam o desempenho da análise de qPCR, tais como matéria orgânica e ácidos húmicos e fúlvicos, quando comparado ao método de eluição utilizando glicina.

Entretanto, é difícil definir quais compostos estariam promovendo a inibição para as reações de amplificação nos métodos avaliados no presente estudo, uma vez que a eluição com glicina foi seguida pela etapa de ultracentrifugação, no qual se observou que esse método foi capaz de concentrar maiores quantidades de sólidos residuais. Mesmo com a ressuspensão do concentrado final com PBS foi possível observar pequenas quantidades de sólidos em suspensão no eluato final.

Os resíduos sólidos presentes nas amostras concentradas pelo método de ultracentrifugação em lodo e biossólidos foram caracterizados através de MEV com sistema de EDS para verificar os principais componentes dessas matrizes sólidas (anexo - item 10.3.2. e 10.3.4.). Foi possível constatar a presença de minerais como grãos de quartzo ( $\text{SiO}_2$ ), embebidos em estruturas contendo matéria orgânica (presença de C), argilominerais, além de compostos contendo quantidades consideráveis de titânio.

As amostras obtidas pelo método de extrato de carne concentraram proporcionalmente menores quantidades de resíduos sólidos e apenas em uma amostragem foi possível obter um pouco de material concentrado que foi secado e submetido à análise de MEV (anexo – item 10.3.5.). Por conter muito pouca quantidade de material a ser analisado, foi possível apenas inferir que essas amostras poderiam conter pequenas quantidades de matéria orgânica e compostos de argilominerais finamente particulados.

Além da análise desses resíduos, os testes de inibição (diluição seriada de ácidos nucleicos) também demonstraram que tanto as amostras concentradas por ultracentrifugação como pelo extrato de carne ainda apresentam compostos inibidores capazes de prejudicar a



eficiência das reações de amplificação de ácidos nucleicos. Os inibidores contidos nas amostras eluídas com extrato de carne poderiam estar associados com a presença de ácidos húmicos e fúlvicos, como previamente descrito (Rock et al. 2010).

Quando os métodos foram realizados para detectar os vírus em amostras de biossólidos naturalmente contaminadas, a diluição de ácidos nucleicos na proporção de 1:10 permitiu detectar RVA e NoV que não haviam sido inicialmente detectados pela qPCR, mas quando os ácidos nucleicos foram diluídos na proporção de 1:100 nenhum vírus foi detectado nas amostras que haviam inicialmente apresentado resultado negativo, diferentemente do observado para os testes com altas concentrações de títulos virais inoculados. Isso sugere a grande dispersão de resultados quando a qPCR é utilizada para detectar baixas concentrações virais nessas amostras. Provavelmente a maior diluição de ácidos nucleicos reduz os níveis de inibidores, mas também as concentrações de ácidos nucleicos para abaixo do limite de detecção dos métodos.

O uso do bacteriófago PP7 usado como controle interno para monitorar a eficiência das etapas de detecção viral em biossólido parece adequado, pelo menos quando altas concentrações iniciais são inoculadas. O PP7 pertence à família *Leviviridae*, do gênero *Levivirus*, e é um vírus com genoma de RNA de fita simples, capsídeo de simetria icosaédrica, com 24 a 26 nm de diâmetro, possui propriedades similares aos enterovírus e não é detectado no ambiente o que lhe confere uma característica apropriada para ser usado como controle em experimentos de detecção viral em amostras ambientais (Rajal et al. 2007).

Quando o PP7 foi utilizado para monitorar as etapas de detecção em biossólidos naturalmente contaminados foi possível observar que ele foi detectado em todas as amostras, mas menores taxas de recuperação foram observadas em algumas amostras analisadas, sugerindo que o biossólido produzido em diferentes períodos poderia variar em composição, determinando diferentes eficiências de recuperação viral.

A eficiência da ultracentrifugação foi muito baixa para detectar particularmente AdV através de qPCR em amostras de biossólidos e resultados similares puderam ser observados para a detecção utilizando PCR convencional (cPCR) (anexo – item 10.2.). Os limites de detecção para recuperar especialmente HAV também foram críticos, sugerindo que os métodos apresentam eficiências de recuperação diferenciadas de acordo com a espécie viral. Diferentes mecanismos de adsorção e eluição viral nessas matrizes sólidas poderiam influenciar a eficiência de recuperação viral.

A presença de matéria orgânica e inorgânica contida nas amostras de lodo e biossólidos é responsável pelos mecanismos de adsorção e eluição viral nessas matrizes, juntamente com pH e força iônica da solução (Lipson e Stotzky, 1984; Rao et al. 1986; Dowd et al. 1998; Quignon et al. 1998; Harvey e Ryan, 2004; Mylon et al. 2009; Walshe et al, 2009).

Os vírus assumem um comportamento similar aos colóides em ecossistemas aquáticos e são denominados de biocolóides em estudos envolvendo associação entre partículas nesses ambientes (Rao et al. 1986; Dowd et al. 1998; Harvey e Ryan, 2004; Walshe et al, 2009).

Colóides são partículas com dimensões entre 1 nm e 10  $\mu$ m e geralmente possuem carga elétrica sobre suas superfícies (Sen e Khilar, 2006). Muitos materiais orgânicos e inorgânicos existem como colóides na natureza, incluindo minerais (principalmente ferro, alumínio, cálcio, óxidos de manganês, hidróxidos, carbonatos, silicatos e fosfatos), fragmentos de minerais e rochas, biocolóides (vírus, bactérias e protozoários) e componentes macromoleculares da matéria orgânica natural (Walshe et al, 2009).

Biocolóides virais possuem cargas de superfície dependentes de pH em meio polar como a água e essas cargas são derivadas da ionização dos grupos funcionais das proteínas do capsídeo e variam de acordo com a espécie viral. As cargas eletrostáticas coloidais determinam a mobilidade das partículas livres em um campo elétrico e direcionam o comportamento coloidal, tendo um importante papel no processo de adsorção e liberação viral em meios geológicos ambientais (Michen e Graule, 2010).

O mecanismo para compreender as forças eletrostáticas que dominam a ligação e a liberação de vírus da matéria particulada ou das matrizes sólidas em ecossistemas aquáticos é explicado pela teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), que foi desenvolvida para prever a estabilidade dos colóides em suspensão (Sen e Khilar, 2006). Entretanto, para microorganismos que adsorvem em superfícies sólidas complexas, é necessário considerar outros fatores que não são explicados pela teoria de DLVO, entre elas, a atração hidrofóbica e as forças de hidratação (Harvey e Ryan, 2004., Sen e Khilar, 2006., Healy e Fuerstenau, 2007). As dimensões das partículas virais também estão relacionadas aos mecanismos de adsorção em meios geológicos ambientais, sendo que partículas com maiores dimensões tenderiam a adsorver mais fortemente nas matrizes sólidas (Dowd et al. 1998).

Dessa forma, a baixa eficiência estabelecida para recuperar AdV das amostras de biossólidos pelo método de ultracentrifugação poderia estar relacionada com a maior adsorção dessas partículas nos sólidos concentrados, dificultando o procedimento de detecção. Partindo dessa hipótese, também poderia ser esperado uma maior concentração desses vírus agregados nas frações sólidas de lodo de esgoto e biossólidos, como verificado através da alta frequência de detecção dos AdV nessas amostras usando extrato de carne e qPCR para a detecção.

Os biossólidos são produzidos em vários estágios do processo de tratamento de esgotos. Eles são uma mistura de sólidos primários (lodo do decantador primário) e secundários (lodo do decantador secundário). Através dos resultados obtidos nesse estudo foi interessante constatar que frequências de detecção viral similares foram obtidas para amostras de lodo primário e biossólido, evidenciando que a análise do lodo primário é importante para verificar o potencial de remoção viral obtida pelos processos subsequentes de estabilização do lodo.

Além de vírus de disseminação entérica, a análise das amostras de biossólido por MEV identificou colônias de ovos de parasitas (anexo – item 10.3.3., Imagens: 10.3.3.5; 10.3.3.6; 10.3.3.7; 10.3.3.8), alertando para o manuseio e gerenciamento adequado desse resíduo.

A análise dos vírus de disseminação entérica presentes nas amostras de biossólidos obtidos por digestão anaeróbica mesofílica demonstraram que em todas as amostras pelo menos um tipo de vírus foi detectado. Os AdV foram os mais detectados (90%) nas amostras analisadas, seguida pelos RV-A (45%), NoV GII (45%) e HAV (8%).

Resultados similares de concentrações de AdV em biossólidos foram obtidos por Bofill-Mas et al. (2006). A prevalência de AdV em amostras de lodo digerido anaerobicamente em relação à presença de outros vírus de disseminação entérica tem sido verificada em outros estudos (Wong et al. 2010) bem como a confirmação de que o tratamento de digestão anaeróbica mesofílica não reduz satisfatoriamente as concentrações de vírus de DNA nesses resíduos (Wong e Xagorarakis, 2011). Outros processos de tratamento, como estabilização alcalina e secagem em estufa agrícola estão sendo descritos como mais apropriados para a remoção viral (Camparini e Alem Sobrinho, 2003; Barrella, 2008).

A grande disseminação de AdV corrobora a hipótese de que eles poderiam ser bons indicadores para determinar a contaminação viral em lodo de esgoto e biossólidos digeridos

anaerobicamente. Este é o primeiro estudo realizado no Brasil descrevendo a contaminação de RVA e NoV GII em lodo de esgoto digerido anaerobicamente e o segundo no mundo descrevendo as concentrações de NoV GII nesses resíduos (Wong et al. 2010).

Espera-se que outros estudos sejam conduzidos no Brasil para avaliar a contaminação viral em biossólidos produzidos em diferentes ETEs.

## 7. CONCLUSÕES

---

A detecção e a quantificação dos vírus de disseminação entérica em águas residuárias hospitalares e urbanas do Rio de Janeiro demonstrou que os RVA, juntamente com os AdV, são os grupos virais mais disseminados nesses ambientes, sendo que as concentrações de RVA são frequentemente maiores do que para os outros vírus analisados.

As concentrações virais obtidas para esgotos de origem hospitalar foram maiores quando comparadas às cargas virais presentes no esgoto doméstico, particularmente para RVA e HAV, apontando para a grande disseminação viral nesses ambientes.

Os sistemas de tratamento biológicos convencionais de esgotos não são capazes de promover uma grande remoção viral, incluindo a sedimentação primária e secundária em processo de lodo ativado convencional.

O HAV tem sido detectado com menor frequência nas águas residuárias urbanas do RJ comparado aos outros vírus de disseminação entérica, e estudos comparados de 2005 a 2011 têm demonstrado um declínio na ocorrência desse vírus em esgotos do RJ.

A análise da presença viral no lodo de esgoto primário da ETE Alegria-Caju demonstrou que o método de concentração baseado em extrato de carne é mais adequado para

o monitoramento utilizando amostras de campo e foi particularmente desejável para detectar AdV nessas amostras. Concentrações virais em lodo de esgoto seriam aproximadamente 1 – 2 unidades  $\log_{10}$  maiores nesses resíduos quando comparados às concentrações presentes em esgoto bruto.

A análise da eficiência dos métodos de recuperação viral em biossólidos demonstrou que essas amostras contêm inibidores capazes de prejudicar o desempenho da amplificação de ácidos nucleicos. A diluição de ácidos nucleicos na proporção de 1:10 (v/v) em água livre de DNase/RNases é desejável para remover inibidores e aumentar a eficiência de recuperação viral em amostras de biossólidos.

O uso de um controle interno (bacteriófago PP7) é adequado para monitorar as etapas de detecção viral em amostras de biossólidos, particularmente quando altas concentrações virais são inoculadas.

O método baseado em eluição com extrato de carne foi mais apropriado para a detecção viral nas amostras de biossólidos naturalmente contaminadas e, por ser um método simplificado, pode ser recomendado para detectar vírus de disseminação entérica, especialmente AdV, em análises de rotina usando qPCR para a detecção.

Os limites de detecção usando métodos de concentração e análise de qPCR sugerem que os HAV poderiam ser pobremente recuperados dessas amostras de biossólidos, uma vez que os limites de detecção foram muito altos (acima de  $10^3$  cópias de genoma  $g^{-1}$ ). Portanto, a real presença de HAV nos biossólidos poderia ser subestimada, principalmente quando baixas concentrações virais estão presentes nesses resíduos.

A análise dos vírus de disseminação entérica presentes nas amostras de biossólidos obtidos por digestão anaeróbica mesofílica demonstraram que em todas as amostras pelo menos um tipo de vírus foi detectado, alertando para o gerenciamento adequado desse

resíduo. Os AdV foram frequentemente detectados nas amostras de lodo de esgoto e biossólidos, corroborando a hipótese de que eles poderiam ser bons indicadores para determinar a contaminação viral nesses resíduos.

## 8. PERSPECTIVAS

---

Nesse estudo a prevalência e as concentrações de diferentes vírus entéricos foram determinadas em efluentes de diferentes ETEs no Rio de Janeiro. Foram avaliados processos de lodo ativado (convencional e de aeração prolongada) bem como um sistema anaeróbio (reator UASB seguido de pós-tratamento por filtros anaeróbios).

No Brasil a avaliação do desempenho dos processos de tratamento de esgotos na remoção viral tem sido realizada apenas para sistemas de lodo ativado (Prado, 2011, *in press*). Dessa forma, o desempenho de outros processos de tratamento aeróbios (lagoas aeradas e filtros biológicos) assim como anaeróbios (lagoas anaeróbias, tanques sépticos, etc) permanece desconhecido em relação à eficiência de remoção de vírus patogênicos. Recomenda-se que as pesquisas sejam ampliadas para aumentar o nível de conhecimento acerca de outros sistemas de tratamento de esgotos na remoção viral.

Os métodos de concentração analisados nesse estudo para recuperar vírus entéricos em amostras de lodo primário e biossólidos demonstraram que as taxas de recuperação e os limites de detecção são críticos para recuperar especialmente HAV através de qPCR. Por isso, outros métodos de concentração e/ou detecção poderiam ser desenvolvidos visando aumentar a eficiência de recuperação de HAV em amostras de resíduos sólidos.

A análise da cPCR para detectar vírus entéricos em amostras naturalmente contaminadas também deve ser avaliada.

Os vírus de disseminação entérica foram detectados através de métodos de biologia molecular, os quais não são capazes de determinar a infecciosidade das partículas virais. Métodos baseados em cultura de células integradas à PCR (ICC-PCR) poderiam ser testados para caracterizar os níveis de infecciosidade das partículas virais presentes em biossólidos.

O processo de estabilização de lodo avaliado foi a digestão anaeróbica mesofílica. Seria interessante analisar a presença e a concentração dos vírus de disseminação entérica em biossólidos produzidos por outros processos de estabilização, tais como digestão aeróbia, secagem ao ar ou compostagem, para os quais ainda não existem dados no Brasil.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Albinana-Gimenez N, Miagostovich MP, Calgua B, Huguet JM, Matia L, Girones R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Res* 2009; 43: 2011-2019.

Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol* 2001; 39: 498-505.

American Public Health Association – APHA. Standard Methods for the Examination Water and Wastewater, 20<sup>th</sup> edn 1998. Washington, DC: American Public Health Association.

Andreoli CV, de Lara AI, Ferreira AC, Bonnet BRP, Pegorini ES. A gestão dos biossólidos gerados em estações de tratamento de esgoto doméstico. *Engenharia e Construção*. Curitiba, setembro. 1998; 24: 18-22.

Andreoli CV (Org). Resíduos sólidos do saneamento: processamento, reciclagem e disposição final. PROSAB – ABES – RJ. 2001, 282p.

Arraj A, Bohatier J, Laveran H, Traore O. Comparison of bacteriophage and enteric virus removal in pilot scale activated sludge plants. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 516-524.

Aiyuk S, Forrez I, Lieven D-K, Van Haandel A, Verstraete W. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates: a review. *Bioresource Technology* 2006; 97: 2225-2241.

Ashbolt NJ. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing region. *Toxicol* 2004; 198: 229-238.

Baggi F, Demarta A, Peduzzi R. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Res Microbiol* 2001; 152: 743 – 751.

Barreira DMPG, Ferreira MSR, Fumian TM, Checon R, Sadovsky ADI, Leite JPG, Miagostovich MP, Spano LC. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol* 2010; 47: 60-64.

Barrella KM. Pesquisa de vírus entéricos humanos em lodos de esgoto originários de duas ETEs do Estado de São Paulo: estabelecimento de metodologia para recuperação e detecção



viral. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP - para a obtenção do título de doutor em ciências. 2008, 150p.

Barrella KM, Garrafa P, Monezi TA, Hársi CM, Salvi C, Violante PABC, Mehnert DU. Longitudinal study on occurrence of adenoviruses and hepatitis A virus in raw domestic sewage in the city of Limeira, São Paulo. *Braz J Microbiol* 2009; 40: 102-107.

Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative Real-Time PCR is not more sensitive than ``conventional`` PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1897-1900.

Braga RCC, Valencia LIO, Medronho RA, Escosteguy CC. Estimativas de área de risco para hepatite A. *Cad Saúde Pública* 2008; 24(8): 1743-1752.

Belguith K, Hassen A, Aouni M. Comparative study of four extraction methods for enterovirus recovery from wastewater and sewage sludge. *Bioresour Technol* 2006; 97(3): 414-419.

Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(12): 7894-7896.

Bosch A, Guix S, Sano D, Pintó RM. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr Opin Biotechnol* 2008; 19 (3): 295-301.

Bucardo F, Lindgren P, Svensson L, Nordgren J. Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. *Plos One* 2011; 6(10): 1-7.

Carducci A, Morici P, Pizzi F, Battistini R, Rovini E, Verani M. Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Water Sci Technol* 2008; 58: 893-897.

Carmo GMI, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ, et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: A time-series analysis. *Plos Med* 2011; 8(4): e1001024. doi:10.1371/journal.pmed.1001024.

Camparini JB, Alem Sobrinho P. Decaimento de patógenos em biossólidos submetidos à secagem em estufa agrícola. In: XXVIII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Cancun, México, 27 a 31 de outubro, 2003.

Carrilho FJ, Clementes CM, da Silva LC. Epidemiology of hepatitis A and E virus infection in Brazil. *Gastroenterol. Hepatol* 2005; 28(3): 118-125.

Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis Martins M, Bóia CM, Leite JP. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 95-97.

Carvalho-Costa FA, Volotão EM, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade JS, Rocha LN, Tort LF, da Silva MF, Gómez MM, de Souza PM., Leite JPG. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis* 2011; J 30: S35-S41.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention - Morbidity and Mortality Weekly Report – MMWR. Progress in the introduction of rotavirus vaccine – Latin America and the Caribbean, 2006 – 2010. 2011a; 60(47), 1611-1614.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention - Morbidity and Mortality Weekly Report – MMWR. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. 2011b; 60(3), 1-12.

CEDAE- Companhia Estadual de Água e Esgoto do RJ. Relatório técnico da Estação de Tratamento Alegria. Monitoramento da ETE Alegria, período setembro de 2009 a agosto de 2010. Rio de Janeiro, outubro, 2010.

CEDAE-Companhia Estadual de Água e Esgoto do RJ. Programa de Despoluição da Baía da Guanabara (PDBG). 2011. Disponível online: ([www.cedae.com.br](http://www.cedae.com.br)) (último acesso: 20/01/2011).

Chen R, Neill JD, Noel JS, Hutson AM, Glass RI, Estes MK, Prasad VV. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol* 2004; 78(12): 6469-6479.

Chernicharo CAL (org.). Pós-Tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. PROSAB – Vol.2, Belo Horizonte, MG. FINEP, RJ. 2001.

Colmenarejo MF, Rubio A, Sanches E, Vicente J, Garcia MG, Borja R. Evaluation of municipal wastewater treatment plants with different technologies at Las Rozas, Madrid (Spain). *J Environ Management* 2009; 81: 399-404.

Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde (MS). Subsídios para Construção da Política Nacional de Saúde Ambiental. Brasília, MS, 2007. ISBN 978-85-334-1328-3.

Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução de 29 de agosto. Define critérios e procedimentos para o uso agrícola do lodo de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados e dá outras providências. [Resolução 29/08/2006].

Corrêa RS, White RE, Weatherley AJ. Biosolids effectiveness to yield ryegrass based on their nitrogen content. *Sci Agric* 2005; 62(3): 274-280.

Costa-Mattioli M, Ferre V, Monpoeho S, Garcia L, Colina R, Billaudel S, Vega I, Perez-Bercoff R, Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus in South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemic outbreaks. *J Gen Virol* 2001; 82: 2647-2652.

Costa-Mattioli M, Di Napoli A, Ferré V, Billaudel S, Perez-Bercoff R, Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 2003; 84: 3191-3201.

De Paula VS, Baptista ML, Lampe E, Niel C, Gaspar AMC. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 2002; 66: 22 – 27.

De Paula VS, Lu L, Niel C, Gaspar AMC, Robertson BH. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J Med Virol* 2004; 73: 378-383.

De Paula VS, Diniz-Mendes L, Villar LM, Luz SLB, Silva LA, Jesus MS, Da Silva NMVS, Gaspar AMC. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res* 2007; 41: 1169-1176.

Dowd SE, Pillai SD, Wang S, Corapcioglu MY. Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. *App Environ Microbiol* 1998; 62(2): 405-410.

Emmanuel E, Perrodin Y, Keck G, Blanchard JM, Vermande P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J Hazard Mater* 2005; 117: 1 - 11.

Emmanuel E, Pierre MG, Perrodin Y. Groundwater contamination by microbiological and chemical substances released from hospital wastewater: Health risk assessment for drinking water consumers. *Environ Int* 2009; 35: 718-726.

Ferreira FFM, Guimarães FR, Fumian TM, Victoria M, Vieira CB, Luz S, Shubo T, Leite JPG, Miagostovich MP. Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type, G-type and subgroup characterization. *Water Sci Technol* 2009; 60: 633 – 642.

Ferreira MSR, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MPTP, Fioretti JM, Andrade J, Volotão EM, Rocha M, Leite JPG, Miagostovich MP. Surveillance of norovirus infections in the State of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. *J Med Virol* 2010; 82: 1442-1448.

Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Molecular Biol Reviews* 2005; 69(2): 357-371.

Forster-Carneiro T, Pérez VR. Mesophilic anaerobic digestion of sewage sludge to obtain class B biosolids: microbiological methods development. *Biomass and Bioenergy* 2010; 34: 1805-1812.

Fumian TM, Leite JPG, Castello AA, Gaggero A, Caillou MSL, Miagostovich MP. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods* 2010; 170 (1-2): 42-46.

Fumian TM, Leite JPG, Rose TL, Prado T, Miagostovich M.P. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Res* 2011; 45(17): 5755-5763.

Garrafa P. Avaliação da qualidade virológica do efluente doméstico tratado e disponibilizado para reuso na cidade de São Paulo. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP - para a obtenção do título de doutor em ciências. 2009.

Gaspar AMC, Vitral CL, Yoshida CFT, Schatzmayr HG. Primary isolation of a brazilian strain of hepatitis A virus (HAF-203) and growth in a primate cell line (FRhK-4). *Brazilian J Med Biol Res* 1992; 25: 697-705.

Gentile A. The need for an evidence-based decision-making process with regard to control of hepatitis A. *J Viral Hepat* 2008; 15(2): 16-21.

- Giordano MO, Ferreyra LJ, Isa MB, Martinez LC, Yudowsky SI, Nates SV. The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Cordoba city, Argentina: an insight of disease burden. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2001; 43(4): 193-197.
- Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa AB, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S. Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. *Water Res* 2010; 44: 4325 – 4339.
- Godfree A, Farrell J. Processes for managing pathogens. *J Environ Qual* 2005; 34: 105-113.
- Goyal SM, Schaub SA, Wellings FM, Berman D, Glass JS, Hurst CJ, Brashear DA, Sorber CA, Moore BE, Bitton G, Gibbs PH, Farrah SR. Round robin investigation of methods for recovering human enteric viruses from sludge. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48(3): 531-538.
- Guarino A, Albano F, Ashkenazi S, Gendrel D, Hoekstra JH, Shamir R, Szajewska H. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. *J Ped Gastroenterol Nutrition* 2008; 46: S81-S184.
- Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SC, Barros VC, Fontes PB, Salustino EF, et al. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1571-1573.
- Gurgel RQ, Correia JB, Cuevas LE. Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains. *Lancet* 2008; 371: 301-302.
- Guzmán C, Jofre J, Blanch AR, Lucena F. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil, and treated biowaste. *J Virol Methods* 2007a; 144 (1-2): 41-48.
- Guzmán C, Jofre J, Montemayor M, Lucena F. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J Appl Microbiol* 2007b; 103: 2420-2429.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; 41: 95-98.
- Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *J Virol Methods* 2007a; 142: 169 – 173.
- Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J Appl Microbiol* 2007b; 103: 2153 – 2159.
- Harvey RW, Ryan JN. Use of PRD1 bacteriophage in groundwater viral transport, inactivation, and attachment studies. *FEMS Microbiol Ecol* 2004; 49: 3-16.
- He XQ, Chieng L, Li W, Xie XM, Ma M, Wang ZJ. Detection and distribution of rotavirus in municipal sewage treatment plants (STPs) and surface water in Beijing. *J Environ Sci Health* 2008; Part A. 43: 424-429.
- Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom, P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 2003; 70: 228-239.

- Heller L. Basic sanitation in Brazil: lessons from the past, opportunities from the present, challenges for the future. *Journal of Comparative Social Welfare* 2007; 23(2): 141-153.
- Hendrickx G, Van Herck K, Vorsters A, Wiersma S, Shapiro C, Andrus JK, Roper AM, Shouval D, Ward W, Van Damme P. Has the time come to control hepatitis A globally? Matching prevention to the changing epidemiology. *J Viral Hepat* 2008; 15(2): 1-15.
- Hurst CJ, Crawford RL, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD. *Manual of Environmental Microbiology*. Second Edition, ASM Press, Washington, D.C. 2002.
- Huttly SRA, Morris SS, Pisani V. Prevention of diarrhea in young children in developing countries. *Bull World Health Organization* 1997; 75(2): 163-174.
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional de saneamento básico. Brasília, Brazil: IBGE. 2008. Available online: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br) (último acesso: 16/01/2011).
- Ishiko H, Shimada Y, Konno T, Hayashi A, Ohguchi T, Tagawa Y, Aoki K, Ohno S, Yamazaki S. Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (6): 2002 – 2008.
- Iturriza-Gómara MI, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates, correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol* 2002; 76: 6596-6601.
- Iwai M, Hasegawa S, Obara M, Nakamura K, Horimoto E, Takizawa T, Kurata T, Sogen S, Shiraki K. Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infectious among inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008). *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(5): 1264-1270.
- Jacobsen KH, Koopman JS. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol Infect* 2004; 132: 1005-1022.
- Jacobsen KH, Koopman JS. The effects of socioeconomic development on worldwide hepatitis A virus seroprevalence patterns. *Int J Epidemiol* 2005; 34: 600-609.
- Jacobsen KH, Wiersma ST. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 2010; 28: 5653-5657.
- Jamwal P, Mittal AK, Mouchel J-M. Efficiency evaluation of sewage treatment plants with different technologies in Delhi (India). *Environ Monit Assess* 2009; 153: 293-305.
- Jayaram H, Estes MK, Venkataram Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* 2004; 101: 67-81.
- Jofre J, Blanch AR. Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality. *J Appl Microbiol* 2010; 109: 1853-1867.
- Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi F, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1548-1557.

- Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, Aho S, Pothier P, Belliot G. Evidence of the co-circulation of enteric viruses in sewage and in the population of Greater Cairo. *J Appl Environ* 2009; 108(5): 1620-1629.
- Kapikian A Z, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM, et al. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious. *J Virol* 1972; 10 (5): 1075-1081.
- Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detect of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(3): 1033 – 1039.
- Katayama H, Haramoto E, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res* 2008; 42: 1441-1448.
- 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* 1976; 32(4): 638-639.
- Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Roizman B, Lamb RA. In: *Fields – Virology*. Fourth edition: vol 1. Ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia (EUA). 2001.
- Kokkinos P, Ziros P, Meri D, Filippidou S, Kolla S, Galanis A, Vantarakis A. Environmental surveillance. An additional/alternative approach for virological surveillance in Greece? *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8: 1914-1922.
- Leite JPG, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103 (8): 745 – 753.
- Lima NT, Gerschman S, Edler FC, Suárez JM (Orgs.). *Saúde e Democracia – História e Perspectivas do SUS*. Rio de Janeiro. Ed. Fiocruz. 2005. 504 p.
- Linhares AC. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Cad Saúde Pública* 2000; 16(3): 629-646.
- Linhares AC, Stupka JA., Ciapponi A, Bardach AE, Glujovsky D, Aruj PK, Mazzoni A, Rodríguez JAB, Rearte A, Lanzieri TM, Ortega-Barria E, Colindres R. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Reviews Med Virol* 2011; 21: 89-109.
- Lipson SM, Stotzky G. Effect of proteins on reovirus adsorption to clay minerals. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48(3): 525-530.
- Lofrano G, Brown J. Wastewater management through the ages: a history of mankind. *Sci.Total Environ* 2010; 408(22): 5254-5264.
- Lu L, Ching KZ, De Paula VS, Nakano T, Siegl G, Weitz M, Robertson BH. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J Gen Virol* 2004; 85: 2943-2952.

Martinelli D, Bitetto I, Tafuri S, Lopalco PL, Mininni RM, Prato R. Control of hepatitis A by universal vaccination of children and adolescents: an achieved goal or a deferred appointment? *Vaccine* 2010; 28: 6783-6788.

Matthinjssens J, Cialert M, McDonald SM, Attouni H, Bányai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 2011; 156: 1397-1413.

Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – A trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 461-487.

Miagostovich MP, Ferreira FFM, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SLB, Silva LA, Leite JPG. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 375-382.

Michen B, Graule T. Isoelectric points of viruses. *J Appl Microbiol* 2010; 109(2): 388-397.

Ministério da Saúde (MS). Surtos de DTA ocasionados por água. COVEH/CGDT/DEVEP/SVS/MS. Disponível online: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31758](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31758). Último acesso Jan. 2011.

Monpoeho S, Maul A, Mignotte-Cadiergues B, Schwartzbrod L, Billaudel S, Ferré V. Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(6): 2484-2488.

Monpoeho S, Maul A, Bonnin C, Patria L, Ranarijaona S, Billaudel S, Ferré V. Clearance of human-pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes by Real-Time reverse transcription-PCR and cell culture. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(9): 5434-5440.

Morace G, Aulicino FA, Angelozzi C, Costanzo L, Donadio F, Rapicetta M. Microbial quality of wastewater: detection of hepatitis A virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 2002; 92: 828-836.

Moratorio G, Costa-Mattioli M, Piovani R, Romero H, Musto H, Cristina J. Bayesian coalescent inference of hepatitis A virus populations: evolutionary rates and patterns. *J Gen Virol* 2007; 88: 3039-3042.

Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol* 2008; 82(22): 11247-11262.

Munné MS, Vladimírsky S, Otegui L, Soto S, Brajterman L, Castro R, Velasco MCC, Bonnano A, Fernandez E, Remondegui C, Passeggi C, Rodriguez C, Pizarro M, Fabre A, Moreiro R, Quarleri J, González JE. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from Argentina. *J Med Virol* 2007; 79: 887-894.



Mylon SE, Rinciog CI, Schmidt N, Gutierrez L, Wong GCL, Nguyen TH. Influence of salts and natural organic matter on the stability of bacteriophage MS2. *Langmuir* 2009; 26(2): 1035-1042.

Nainan OV, Xia V, Vaughan G, Margolis HS. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Reviews* 2006; 19(1): 63-79.

Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RQ et al. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Arch Virol* 2008; 153: 591-593.

Nordgreen J, Matussek A, Mattsson A, Svensson L, Lindgren PE. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Res* 2009; 43(4): 1117-1125.

Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. Review. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7: 2620-2637.

Oliveira SC, Von Sperling M. Reliability analysis of wastewater treatment plants. *Water Res* 2008; 42: 1182-1194.

OMS – Organização Mundial da Saúde (WHO, World Health Organization/UNICEF). Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. 2009. ISBN: 978-92-4-159841-5.

O' Ryan M, Lucero Y, Linhares AC. Rotarix<sup>®</sup>: vaccine performance 6 years postlicensure. *Expert Rev Vaccines* 2011; 10(12): 1645-1659.

Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 2008; 7: 861-871.

Paim JS. Reforma Sanitária Brasileira – Contribuição para a compreensão e crítica. Salvador: EDUFBA; Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 2008. 356 p.

Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B. Multiplex real-time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol* 2005; 33: 168-171.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12 (2): 304 – 306.

Patel MM, Widdowson M, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD, et al. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2008; 14 (8): 1224-1231.

Petrinca AR, Donia D, Pierangeli A, Gabrieli AM, Degener AM, Bonanni E, Diaco L, Cecchini G, Anastasi P, Divizia M. Presence and environment circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. *J Appl Microbiol* 2009; 106: 1608 – 1617.

- Pina S, Jofre J, Emerson SU, Purcell RH, Girones R. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4485-4488.
- Pina S, Buti M, Jardí R, Clemente-Casares P, Jofre J, Girones R. Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 2001; 82: 2955-2963.
- Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho APD'A, Asensi MD. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46: 136-141.
- Prado T, Silva DM, Guilayn WC, Rose TL, Gaspar AMC, Miagostovich MP. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Res* 2011; 45(3): 1287-1297.
- Prado T, Fumian TM, Miagostovich MP, Gaspar AMC. Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011b; (*in press*). doi: 10.1016/j.trstmh.2011.10.005
- Prado T. Aeration technologies used for wastewater treatment in Brazil: management and environmental impact. In: *Advances in Chemistry Research*. James C. Taylor (Org.). Vol.13, New York: Nova Publishers; 2011 (*in press*).
- Queiroz APS, Santos FM, Sassaroli A, Hársi CM, Monezi TA, Mehnert UD. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(10): 4614-4618.
- Quignon F, Thomas F, Gantzer C, Huyard A, Schwartzbrod L. Virus adsorption in a complex system: an experimentally designed study. *Water Res* 1998; 32 (4): 1222-1230.
- Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res* 2007; 41: 1411-1422.
- Rao VC, Metcalf TG, Melnick JL. Human viruses in sediments, sludges, and soils. *Bull World Health Organization* 1986; 64 (1): 1-14.
- Ribeiro LR, Giuberti RSO, Barreira DMPG, Saick KW, Leite JPG, Miagostovich MP, Spano LC. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(2): 201-206.
- Rigotto C, Victoria M, Moresco V, Kolesnikovas CK, Corrêa AA, Souza DSM, Miagostovich MP, Simões CMO, Barardi CRM. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. *J Appl Microbiol* 2010; 109: 1979-1987.
- Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K, Ishizu T, Moritsugo Y, Lemon SM. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992; 73: 1365-1377.

- Robinson CM, Seto D, Jones MS, Dyer DW, Chodosh J. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect Genet Evol* 2011; 11(16): 1208-1217.
- Rock C, Alum A, Abbaszadegan M. PCR inhibitor levels in concentrates of biosolid samples predicted by a new method based on excitation-emission matrix spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76 (24): 8102-8109.
- Rodriguez RA, Pepper IL, Gerba CP. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples - Minireview. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(2): 297-307.
- Rodriguez-Manzano J, Miagostovich MP, Hundesa A, Clemente-Casares P, Carratala A, Buti M, Jardi R, Girones R. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J Water Health* 2010; 8(2): 346-354.
- Rodriguez RA, Pepper IL, Gerba CP. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples - Minireview. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(2): 297-307.
- Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velasquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Human rotavirus vaccine study group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006; 354: 11-22.
- Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. Review. *J Gen Virol* 2009; 90: 1-20.
- Rzezutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Review* 2004; 28: 441-453.
- Sano D, Fukushi K, Yoshida Y, Omura T. Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. *Water Res* 2003; 37: 3490-3498.
- Santos DRL, Villar LM, De Paula VS, Lima GS, Gaspar AMC. Hepatitis A virus subgenotypes dissemination during a community outbreak in a surrounding region of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(3): 254-258.
- Schernewski G, Julich W-D. Risk assessment of virus infections in the Oder estuary (southern Baltic) on the basis of spatial transport and virus decay simulations. *Int J Hyg Environ Health* 2001; 203: 317-325.
- Schlindwein AD, Rigotto C, Simões MO, Barardi CRM. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Sci Technol* 2010; 61(2): 537-544.
- Sen TK, Khilar KC. Review on subsurface colloids and colloid-associated contaminant transport in saturated porous media. *Adv Colloid Interface Sci* 2006; 119: 71-96.
- Sidhu JPS, Toze SG. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ International* 2009; 35: 187-201.

- Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, Bruin E, Van Der Veer B, Siezen RJ, Koopmans M. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 2007; 81(18): 9932-9941.
- Silva PC, Vitral CL, Barcellos C, Kawa H, Gracie R, Rosa MLG. 2007. Hepatitis A in the city of Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological pattern and socio-environmental variables. Cross-analysis of SINAN and population census data. *Cad Saude Publica* 2007; 23: 1553-1564.
- Simmons FJ, Kuo DH-W, Xagorarakis I. Removal of human enteric viruses by a full-scale membrane bioreactor during municipal wastewater processing. *Water Res* 2011; 45(9): 2739-2750.
- Simmons FJ, Xagorarakis I. Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. *Water Res* 2011; 45: 3590-3598.
- Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol* 2009; 107: 1769-1780.
- Singh RP, Agrawal M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Manage* 2008; 28: 347-358.
- Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 343: 195-224.
- Straub TM, Chandler DP. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *J Microbiol Methods* 2003; 53: 185-197.
- Sulbaran Y, Gutierrez CR, Marquez B, Rojas D, Sanchez D, Navas J, Rovallo E, Pujol FH. Hepatitis A virus genetic diversity in Venezuela: exclusive circulation of subgenotype IA and evidence of quasispecies distribution in the isolates. *J Med Virol* 2010; 82: 1829-1834.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 1596-1599.
- Tan M, Jiang X. Norovirus-host interaction: implications for disease control and prevention. *Expert Rev Mol Med* 2007; 9(19): 1-22.
- Thongprachum A, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N. Analysis of the VP6 gene of human and porcine group A rotavirus strains with unusual subgroup specificities. *J Med Virol* 2009; 81: 183-191.
- Totsuka A, Moritsugu Y. Hepatitis A virus proteins. *Intervirol* 1999; 42: 63-68.
- Tyrrell SA, Rippey SR, Watkins WD. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. *Water Res* 1995; 29(11): 2483-2490.
- USEPA 625/R-92/013 Environmental Protection Agency of United States. Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. Method for the recovery and assay of total culturable viruses from sludge. Under 40 CFR Part 503, Appendix H; 2003.

- Viau E, Peccia J. Survey of wastewater indicators and human pathogen genomes in biosolids produced by class A and class B stabilization treatments. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75 (1): 164-174.
- Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich MP. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26: 602-606.
- Victoria M, Guimarães FR, Fumian TM, Ferreira FFM, Vieira CB, Shubo T, Leite JPG, Miagostovich MP. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health* 2009; 8: 158-165.
- Villar LM, De Paula VS, Gaspar AMC. Seasonal variation of hepatitis A virus infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002; 44(5): 289-292.
- Villar LM, Lampe E, Meyer A, Gaspar AMC. Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1779-1787.
- Villar LM, de Paula VS, Diniz-Mendes L, Lampe E, Gaspar AMC. Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *J Virol Methods* 2006; 137: 169-176.
- Villar LM, De Paula VS, Diniz-Mendes L, Guimarães FR, Ferreira FFM, Shubo TC, Miagostovich MP, Lampe E, Gaspar AMC. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol* 2007; 45: 168-173.
- Vitral CL, Souto FJ, Gaspar AMC. Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: reassessing immunization policy. *J Viral Hepat* 2008; 15 (Suppl. 2): 22-25.
- Von Sperling M. *Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos*. Vol.1, 3ªed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA); Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. 2005. 452 p.
- Wasley A, Fiore A, Bell BP. Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiol Reviews* 2006; 28: 101-111.
- Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 247-262.
- Wyn-Jones AP, Sellwood J. Enteric viruses in the aquatic environment. A Review. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 945-962.
- Wang H, Brown SL, Guna B, Magesan GN, Slade AH, Quintern M, Clinton PW, Payn TW. Technological options for the management of biosolids. *Environ Sci Pollut Res* 2008; 15: 308-317.
- Wong K, Onan BM, Xagorarakis I. Quantification of enteric viruses, pathogen indicators, and Salmonella bacteria in class B anaerobically digested biosolids by culture and molecular methods. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76 (19): 6441-6448.

Wong K, Xagorarakis I. (2011). A perspective on the prevalence of DNA enteric virus genomes in anaerobic-digested biological wastes. *Environ Monit Assess* 2011; Sept.20. (*in press*).

Zakkour PD, Gaterell MR, Griffin P, Gochin RJ, Lester JN. Anaerobic treatment of domestic wastewater in temperate climates: treatment plant modeling with economic considerations. *Water Res* 2001; 35(17): 4137-4149.

Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods* 2008; 153: 238 - 240.

Zhang K, Farahbakhsh K. Removal of native coliphages and coliform bacteria from municipal wastewater by various wastewater treatment processes: implications to water reuse. *Water Res* 2007; 41: 2816 - 2824.

---

## 10. ANEXOS

---

### **10.1. Caracterização das ETEs**

#### **10.1.1. Sistema de tratamento de esgoto anaeróbio (ETE hospitalar - 1)**

A ETE-1 utiliza processo anaeróbio de tratamento de esgotos, composta pelas unidades de reator UASB seguido de pós-tratamento por três filtros anaeróbios, dispostos em série, com direção de fluxo ascendente.

As principais unidades que compõem este sistema de tratamento de esgotos são:

- **Sistema de gradeamento:** para a retenção e remoção de sólidos grosseiros que estão contidos no fluxo.
  
- **Estação elevatória:** para elevar o líquido da cota de chegada após a etapa de gradeamento, até o nível de entrada do reator anaeróbio, através de dois conjuntos motor-bomba do tipo submerso, acionada por bóias de nível.

- **Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (UASB):** onde é realizado o principal processo de estabilização da matéria orgânica, através da formação de uma manta de lodo densa e de elevada atividade.
- **Filtros anaeróbios:** unidades de pós-tratamento para o polimento de esgotos, utilizando três filtros biológicos anaeróbios em série, de fluxo ascendente, com uma capacidade de remoção complementar de matéria orgânica. Apresentam como suporte de preenchimento pedra brita n° 4.

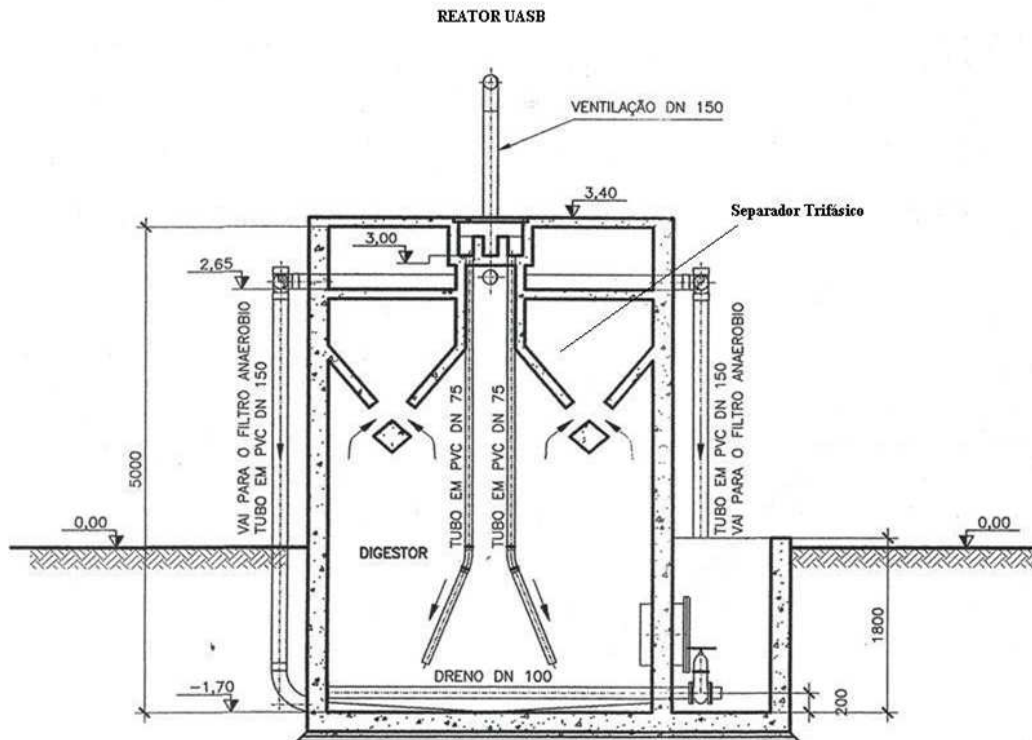
Os parâmetros de dimensionamento são descritos abaixo:

#### **Dimensionamento do reator UASB:**

- Vazão média (adotada):  $220 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$  ou  $2,54 \text{ L. s}^{-1}$
- Tempo de retenção hidráulica (TRH): 8 horas
- Volume total do reator:  $73,36 \text{ m}^3$
- Altura do reator: 4,5 m
- Área corrigida:  $16,5 \text{ m}^2$
- Distribuidores internos: 8
- Avaliação da produção de metano:  $Q_{\text{CH}_4} = 22,5 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$

O dimensionamento do reator UASB está representado na Figura:



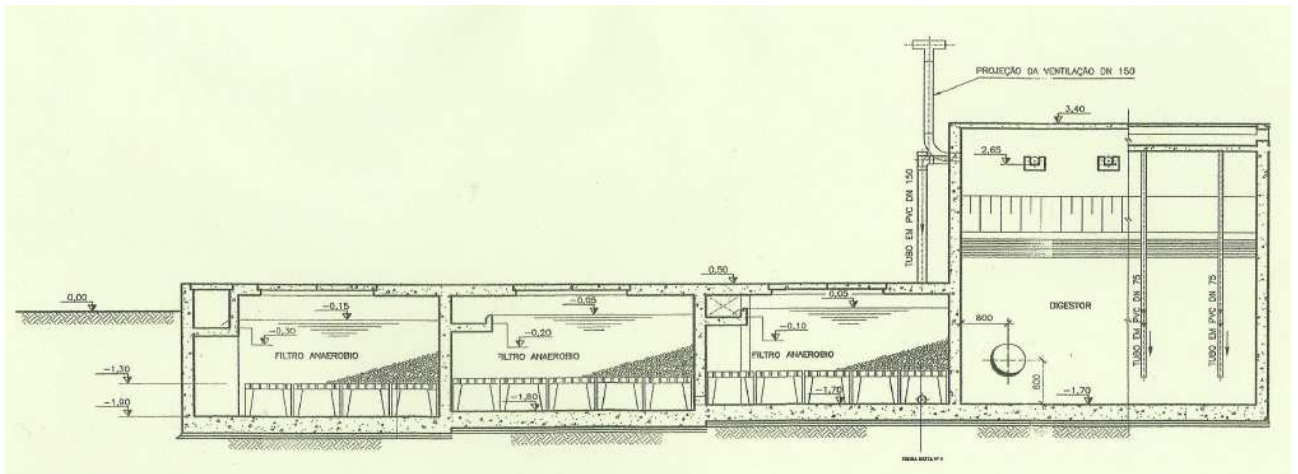


**Figura 9.1.1.** Dimensionamento do reator UASB

### **Dimensionamento do filtro anaeróbio:**

Para o dimensionamento dos filtros anaeróbios utilizaram-se as disposições contidas na norma ABNT 7229/93 referentes a fossas sépticas e disposição final de efluentes. Como parâmetro de tempo de retenção hidráulica média para filtro anaeróbio como unidade de pós-tratamento, adotou-se 4 horas.

- Volume útil: 50,7 m<sup>3</sup>
- Profundidade máxima do filtro: 1,2 m
- Área (adotada): 42,24 m<sup>2</sup>
- Suporte de preenchimento dos filtros: pedra brita n° 4



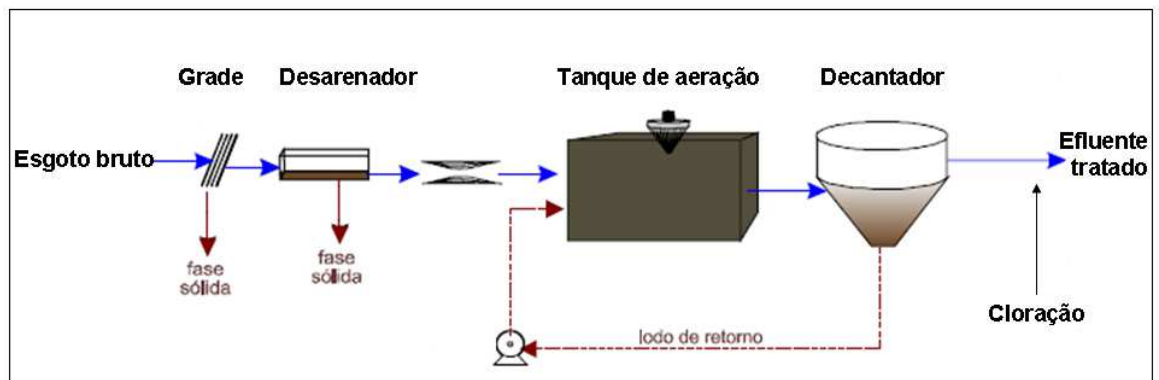
**Figura 9.1.2.** Dimensionamento dos filtros anaeróbios

Após o tratamento, o efluente é lançado na rede pública de coleta de esgotos da CEDAE (Companhia Estadual de Água e Esgotos do RJ) a qual desemboca na Baía da Guanabara (RJ).

### 10.1.2. SISTEMA DE TRATAMENTO DE ESGOTO AERÓBIO (ETE HOSPITALAR 2)

O sistema de esgoto aeróbio é composto de um processo de lodo ativado com aeração prolongada.

O influxo de esgoto nessa ETE é maior do que o analisado anteriormente, com capacidade para tratar  $5 \text{ L s}^{-1}$ . O tanque de aeração tem um tempo de retenção hidráulica de 18 h aproximadamente. Os efluentes finais são tratados com cloração. Os dados de dimensionamento da planta, bem como a concentração final de cloro aplicada não foram fornecidos pela empresa que gerenciava esta ETE (Rio Águas) no momento do estudo. No entanto, um esquema geral das unidades da ETE por lodo ativado com aeração prolongada é fornecido na figura.



**Figura 10.1.3.** Esquema de uma ETE por lodo ativado com aeração prolongada. Adaptado de Von Sperling, 2005.

### 10.1.3. ETE URBANA (ALEGRIA – CAJU – RJ)

A ETE da Alegria começou a ser operada em 2001, e faz parte do Programa de Despoluição da Baía de Guanabara (PDBG). É considerada uma das maiores ETEs da América Latina. No final da construção dos troncos coletores, a ETE Alegria deverá receber a contribuição de esgotos sanitários de uma área de cerca de 8.600 hectares, servindo a aproximadamente 1,5 milhões de pessoas (Cedae, 2010).

No desenvolvimento das obras, a fase preliminar do tratamento foi revisada pelo consórcio construtor e pela CEDAE, modificando-se substancialmente a concepção da Estação Elevatória de chegada, e das grades grosseiras e finas, inclusive a capacidade destas unidades, que passou a ser de uma vazão média nominal de 4,5 m<sup>3</sup>/s, e vazão máxima de 7,4 m<sup>3</sup>/s (Cedae, 2010).

São quatro as sub-bacias principais contribuintes à estação de tratamento: Alegria, Timbó-Faria, São Cristóvão, e o conjunto Centro, Mangue e Catumbi, conforme prevê o Plano Diretor de Esgotamento Sanitário da Região Metropolitana do Rio de Janeiro e das Bacias Contribuintes à Baía de Guanabara (Cedae, 2010).

A coleta e o tratamento da contribuição destas sub-bacias constituirá sensível benefício para a melhoria da qualidade das águas dos corpos receptores, eliminando os

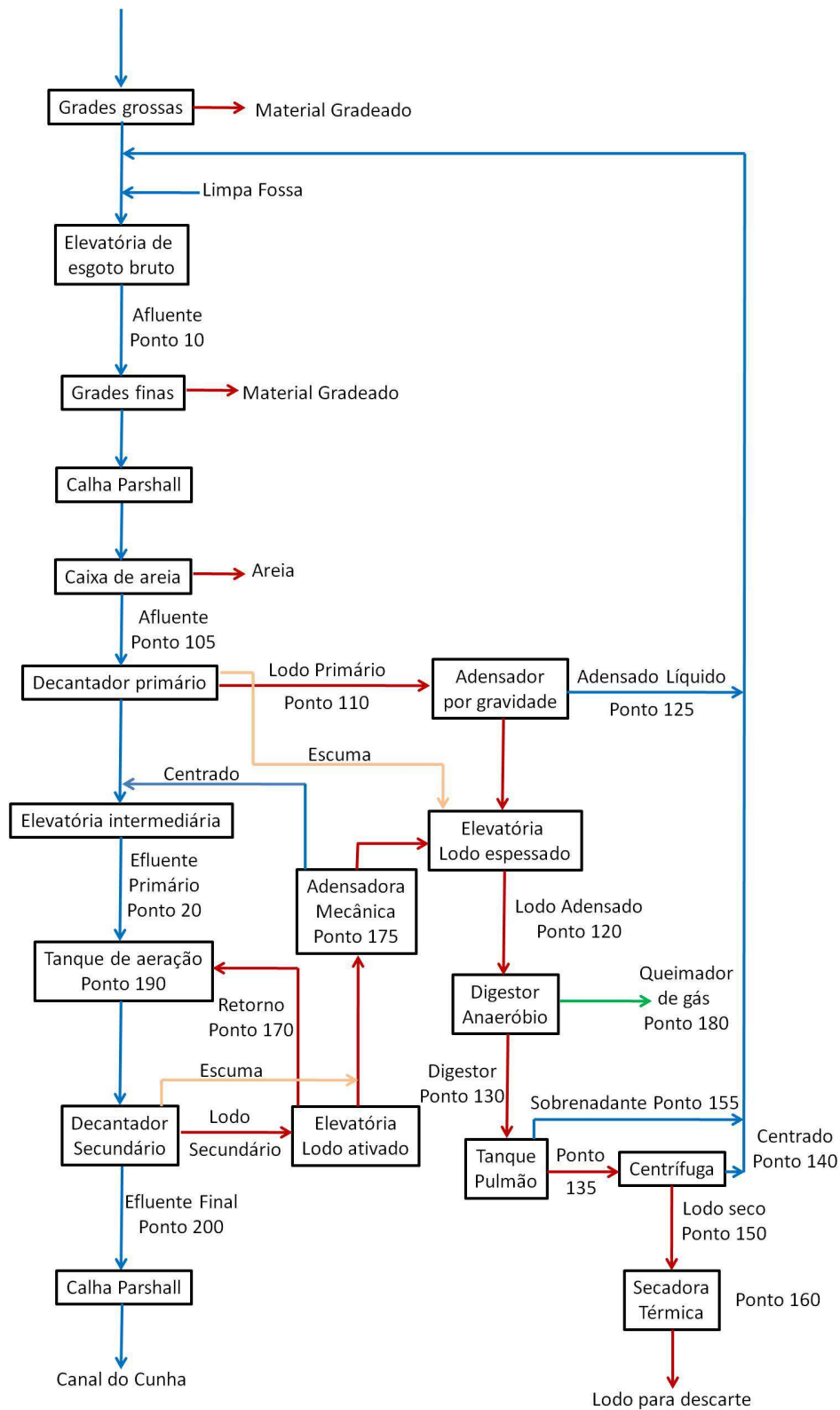
lançamentos diretos na Baía de Guanabara e nos rios e canais urbanos que contribuem para a baía.

Essa ETE constitui um sistema de lodo ativado convencional (Figura 10.1.3.1). O fluxograma da ETE está demonstrado na Figura 10.1.3.2.



**Figura 10.1.3.1.** ETE Alegria – Caju, RJ.

**Fonte.** Cedae, 2010



**Figura 10.1.3.2.** Fluxograma da ETE Alegria

**Fonte.** Cedae, 2010.

### **Decantadores primários**

Os efluentes das caixas de areia são conduzidos, por canais, aos decantadores primários (Figura 10.1.3.3). Os cinco decantadores são retangulares, também modulados para a vazão média de  $1 \text{ m}^3/\text{s}$ , cada um, nos quais o esgoto flui de forma a permitir que os sólidos decantáveis se depositem no fundo e os sólidos flutuantes (escuma) se dirijam à superfície. Os sólidos removidos por sedimentação nos decantadores primários constituem o lodo primário.

O lodo retido é recolhido em poços localizados nas extremidades dos decantadores e encaminhado aos adensadores por gravidade por meio de bombas centrífugas. O lodo adensado é encaminhado para os digestores.



**Figura 10.1.3.3.** Decantador primário em operação

**Fonte.** Cedae, 2010

### **Sistema biológico de tratamento**

O termo lodo ativado designa a massa microbiana floculenta que se forma quando efluentes biodegradáveis são submetidos à aeração. O sistema de lodo ativado convencional é composto por:

- Tanques de aeração: onde uma alta concentração de flocos microbianos, mantidos em suspensão, promove a degradação dos poluentes;

- Difusores porosos de ar nos tanques de aeração: o ar distribuído pelos difusores serve como fonte de oxigênio para a atividade bacteriana, assim como para manter em suspensão os sólidos (biomassa) contidos nos tanques de aeração.
- Decantadores secundários mecanizados: separa os flocos microbianos. O sobrenadante clarificado pode ser descartado ou seguir para um tratamento complementar;
- Elevatória de recirculação de lodo ativado e de excesso de lodo: o lodo sedimentado é recirculado para o tanque de aeração, permitindo que este opere com elevada concentração microbiana. O lodo em excesso é direcionado para estabilização.

Na ETE Alegria o esgoto proveniente do canal de entrada é alimentado nos oito tanques de aeração do sistema de lodo ativado. Atualmente apenas quatro tanques de aeração estão em operação. Cada tanque de aeração possui um volume de  $11.500 \text{ m}^3$ , correspondente a um tempo de retenção hidráulica de 3,5 – 4 h conforme o projeto.

A aeração nos tanques é realizada por um sistema de ar difuso, aplicado através de difusores de bolhas instalados no fundo de cada tanque e também a instalação de difusores de bolhas grossas na câmara seletora, alimentados por um conjunto de seis compressores (Figura 10.1.3.4). O lodo biológico e esgoto tratado deixam os tanques de aeração e seguem para os decantadores secundários (Figura 10.1.3.5). Nos decantadores secundários os flocos de lodo ativado, que se mantinham em suspensão no tanque de aeração devido a turbulência promovida pelos dispositivos de aeração, são separados por sedimentação. Os efluentes tratados (Figura 10.1.3.6) são descartados no Canal do Cunha, que desemboca na Baía da Guanabara.



**Figura 10.1.3.4.** Tanque de aeração



**Figura 10.1.3.5.** Decantador secundário





**Figura 10.1.3.6.** Efluente final tratado

**Fonte.** Cedae, 2010

### **Sistema de tratamento da fase sólida**

O sistema de tratamento da fase sólida, para condicionamento e desidratação do lodo gerado na ETE, é composto pelas seguintes unidades:

- adensadores por gravidade, mecanizados, para adensamento do lodo primário;
- elevatória de lodo adensado;
- centrífugas para adensamento do lodo secundário em excesso;
- digestores anaeróbios com as respectivas bombas de recirculação;
- centrífugas para desidratação do lodo digerido.

Na ETE Alegria a estabilização do lodo misto (primário e secundário) é realizada por cinco digestores anaeróbios (Figura 10.1.3.7). Esta estabilização é biológica, onde se utilizam microorganismos anaeróbios para promover a estabilização da fração biodegradável da matéria orgânica. O digestor é alimentado de forma contínua ou em batelada e o lodo é mantido no seu interior por determinado período. Atualmente somente 2 dos digestores estão em operação devido à baixa vazão de esgoto tratado na ETE.



**Figura 10.1.3.7.** Digestores anaeróbios de lodo

**Fonte.** Cedaec, 2010

Após condicionamento e desidratação (centrifugação) com adição de polieletrólitos catiônicos o lodo estabilizado e desidratado é transportado para o aterro de Gramacho (RJ) (Figura 10.1.3.8).



**Figura 10.1.3.8.** Transporte do lodo tratado

**Fonte.** Cedaec, 2010

Na ETE Alegria existe um secador térmico que consiste na passagem do lodo por uma fonte de calor, de modo a provocar a evaporação da umidade existente no lodo e conseqüentemente alcançar a inativação térmica dos microorganismos. Entretanto, o secador

térmico não está em funcionamento atualmente devido a pouca produção de biogás, que é o combustível para a secagem do lodo (Cedae, 2010).

Quando a ETE Alegria estiver operando com uma vazão de entrada de esgoto próxima da vazão de projeto, haverá uma produção de biogás suficiente para servir como combustível para o secador térmico. O lodo centrifugado passará então pelo secador térmico antes de ser destinado ao aterro sanitário de Gramacho (Cedae, 2010).

**10.1.4. QUALIDADE DO EFLUENTE AO LONGO DO TRATAMENTO (DADOS OBTIDOS DE SETEMBRO DE 2009 A AGOSTO DE 2010 PELO DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE DE ESGOTO - CEDAE, 2010)**

**Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)**

**Tabela 10.1.4.1:** Valores médios, desvio padrão, máximo e mínimo de DBO e as respectivas eficiências de remoção de cada etapa

	DBO Afluente (Ponto 10)	DBO Saída decantador primário (Ponto 20)	DBO Efluente Final (Ponto 2000)	Eficiência remoção DBO Trat.Prim. (%)	Eficiência remoção DBO Trat.Sec. (%)	Eficiência remoção DBO Global (%)
Média	311 ± 206	97 ± 40	10 ± 6	63 ± 18	88 ± 9	95 ± 4
Máximo	940	190	39	94	97	99
Mínimo	28	14	4	13	43	79

**Demanda Química de Oxigênio (DQO)**

**Tabela 10.1.4.2:** Valores médios, desvio padrão, máximo e mínimo de DQO e as respectivas eficiências de remoção de cada etapa

	DQO Afluente (Ponto 10)	DQO Saída decantador primário (Ponto 20)	DQO Efluente Final (Ponto 2000)	Eficiência remoção DQO Trat.Prim. (%)	Eficiência remoção DQO Trat.Sec. (%)	Eficiência remoção DQO Global (%)
Média	729 ± 427	266 ± 125	46 ± 33	58 ± 23	77 ± 16	90 ± 12
Máximo	1980	621	200	95	98	99
Mínimo	73	26	9	6	19	30

### Sólidos Sedimentáveis (SS)

**Tabela 10.1.4.3.** Valores médios, desvio padrão, máximo e mínimo de SS e as respectivas eficiências de remoção de cada etapa

	SS Afluente (Ponto 10)	SS Saída decantador primário (Ponto 20)	SS Efluente Final (Ponto 2000)	Eficiência remoção SS Trat.Prim. (%)	Eficiência remoção SS Trat.Sec. (%)	Eficiência remoção SS Global (%)
Média	11,8 ± 10,5	0,6 ± 1,0	0,1 ± 0,0	92 ± 14	46 ± 43	97 ± 7
Máximo	71	7,5	0,3	100	100	100
Mínimo	0,1	0,1	0,1	0	0	0

### pH

**Tabela 10.1.4.4:** Valores médios, desvio padrão, máximo e mínimo de pH.

	pH Afluente (Ponto 10)	pH Saída decantador primário (Ponto 20)	pH Efluente Final (Ponto 2000)
Média	6,56 ± 0,36	6,52 ± 0,36	6,50 ± 0,37
Máximo	7,39	7,21	7,14
Mínimo	5,35	5,37	5,31

### **Turbidez**

Os valores de turbidez foram medidos apenas no efluente final, atingindo uma média de  $12 \pm 7$  NTU.

### **Coliformes**

O efluente final da ETE Alegria, durante o período avaliado (setembro de 2009 a agosto de 2010), pode ser classificado como impróprio, pois apresenta concentração de coliformes termotolerantes superior a 2500 NMP por 100 mL.

---

***10.2. RESULTADOS DE PCR QUALITATIVA UTILIZADA PARA  
DETECTAR VÍRUS ENTÉRICOS EM AMOSTRAS DE  
BIOSSÓLIDOS***

---

**Tabela .** Detecção viral obtida através de três métodos de concentração e detecção por PCR convencional

Métodos*	AdV		RVA		NoV		HAV		PP7	
	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100
<b>1</b>	+		+		+		-		+	
	+		+		+		+		+	
	-	-	+	+	+		+		+	
<b>2</b>	-		+		+		+		+	
	-	+	+		+		+		+	
	-	+	+		+		+		+	
<b>3</b>	-		+		+		-		+	
	+		+		-		ND		+	
	-		+		+		ND		+	

1 = extrato de carne, 2 = ultracentrifugação, 3 = adsorção-elution; \* Métodos foram realizados em triplicata; 1:10 and 1:100 (diluições seriadas de ácidos nucleicos); Títulos virais médios inoculados:  $10^8$  (AdV),  $10^6$  (RVA),  $10^4$  (NoV),  $10^6$  (HAV) e  $10^7$  (PP7). Referências da cPCR: AdV (Allard et al. 2001), RVA (Iturriza-Gómara et al. 2002), NoV (Boxman et al. 2006), HAV (De Paula et al. 2002), PP7 (Rajal et al. 2007).

### **10.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

Amostras de lodo primário e biossólidos obtidas da ETE Alegria em 2011 foram submetidas à análise de microscopia eletrônica de varredura – MEV (modelo Jeol 2000 Fx 200 Kv EDX Noran). As análises foram realizadas no Laboratório Multi-usuário de Microscopia Eletrônica e Microanálise – F-203, da Faculdade de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ.

A análise de MEV-EDS foi realizada para avaliar a morfologia (tamanho e forma) dos elementos contidos nessas amostras e da aproximação dos elementos químicos das fases orgânicas e minerais.

As amostras de lodo primário foram passadas através de um sistema de bomba a vácuo para adsorver em filtros de membrana AP20 (Millipore – poro 0,45  $\mu\text{m}$ ). Os resíduos adsorvidos nos filtros foram colocados em estufa a  $\pm 35^\circ\text{C}$  até a completa remoção de umidade. Para amostras de lodo primário submetidas ao método de ultracentrifugação, as amostras concentradas finais ( $\pm 1$  ml) foram centrifugadas (14000 rpm) por 5 min para precipitar os sólidos em suspensão. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi colocado na estufa a  $\pm 35^\circ\text{C}$  até a completa remoção de umidade. Não foi possível obter precipitados dos eluatos finais do método de extrato de carne.

Amostras de biossólidos secos foram diretamente analisadas no MEV. Para as amostras concentradas pelos métodos de ultracentrifugação e extrato de carne o mesmo procedimento descrito acima para lodo primário foi utilizado. Muito pouca quantidade de material precipitado foi obtida pelo método de extrato de carne. Amostras de biossólidos concentradas em filtro HA (Millipore) pelo método de adsorção-eluição foram secos na estufa até a remoção de umidade.

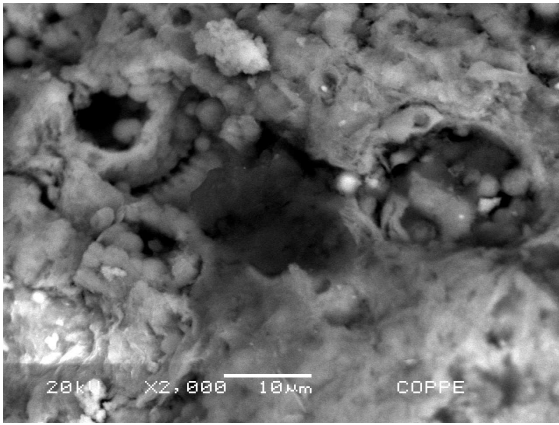
As amostras de lodo e biossólidos secas foram recobertas com micropartículas de ouro antes de serem analisadas no MEV. Diferentes áreas das amostras foram investigadas pelo MEV a 20 KeV. A distribuição dos elementos das amostras foi examinada pela análise pontual usando EDS sobre pontos escolhidos aleatoriamente sobre cada amostra. Os resultados obtidos dessas análises estão demonstrados nos itens a seguir.

---

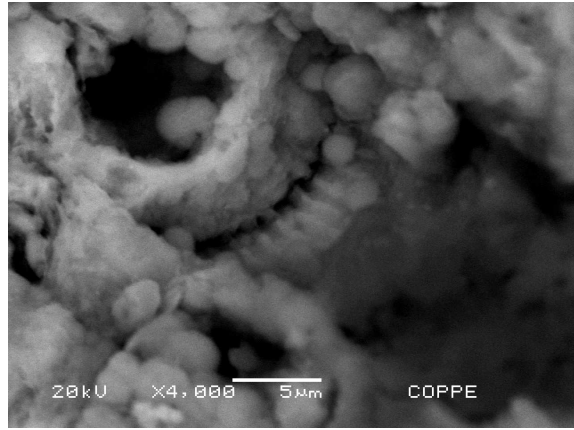
### **10.3.1. AMOSTRAS DE LODO PRIMÁRIO (ETE ALEGRIA - CAJU - RJ - 2011)**

---

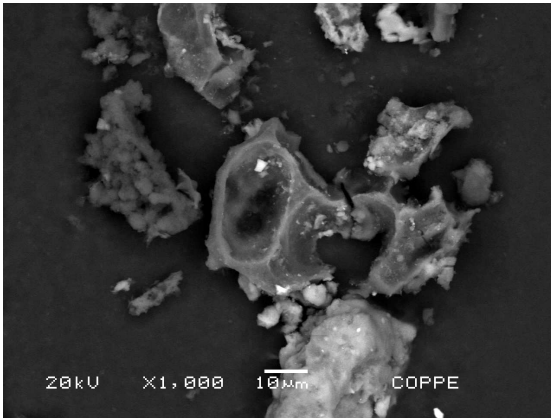




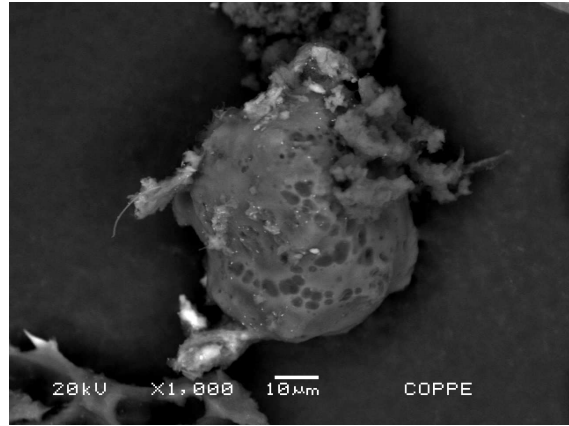
**Imagem 10.3.1.1.** Lodo primário 28/03/11



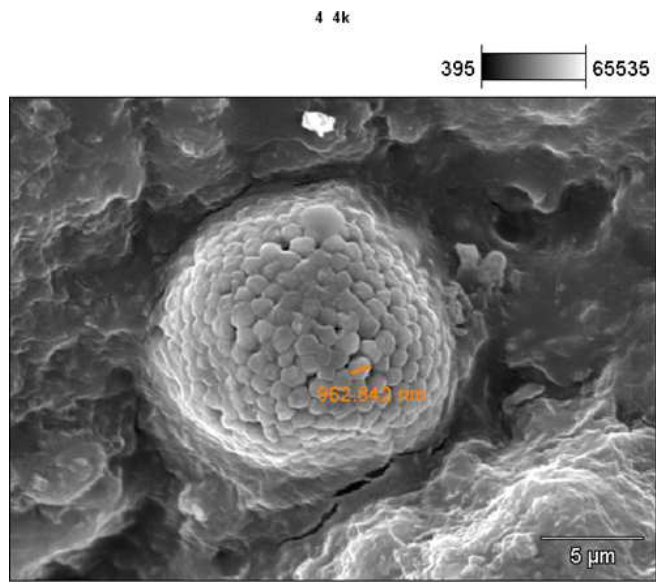
**Imagem 10.3.1.2.** Lodo primário 28/03/11



**Imagem 10.3.1.3.** Lodo primário 28/03/11

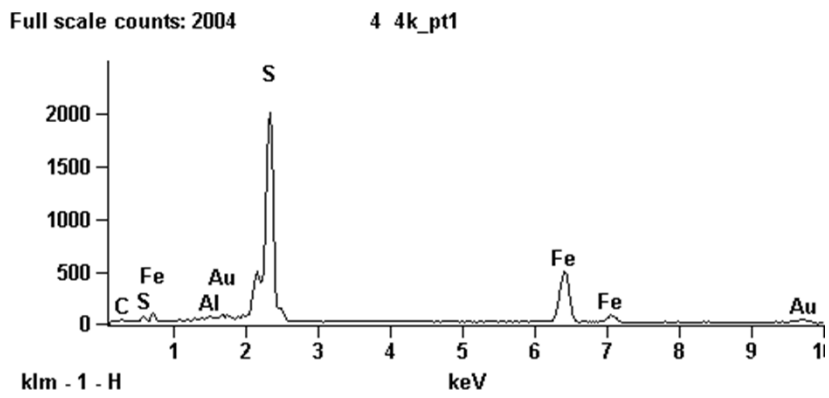


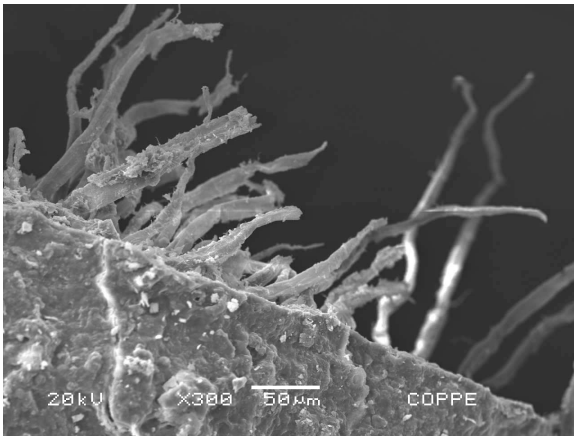
**Imagem 10.3.1.4.** Lodo primário 28/03/11



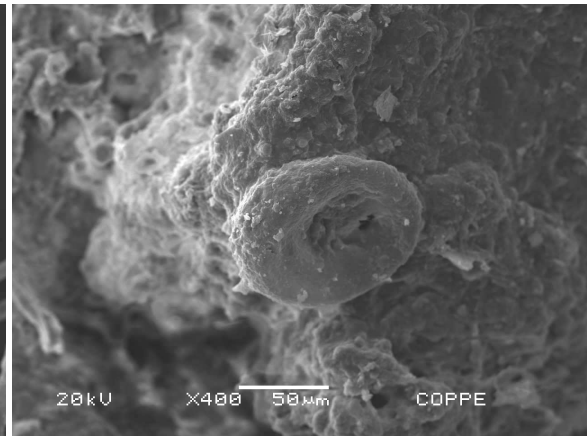
**Imagem 10.3.1.5.** Lodo primário 25/04/11

**Análise EDS ponto 1:**

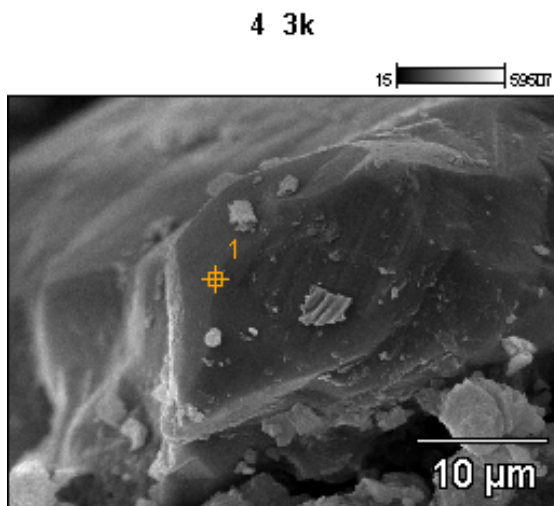




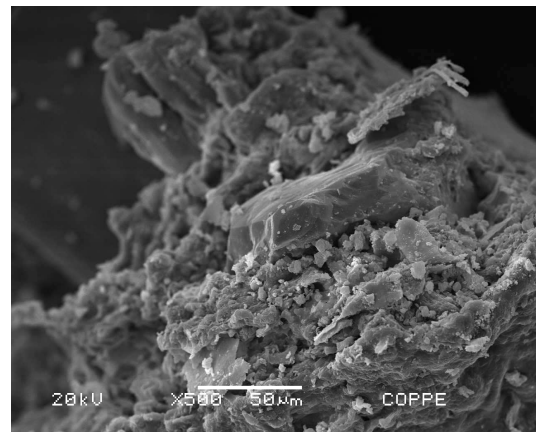
**Imagem 10.3.1.6.** Lodo primário 25/04/11



**Imagem 10.3.1.7.** Lodo primário 25/04/11

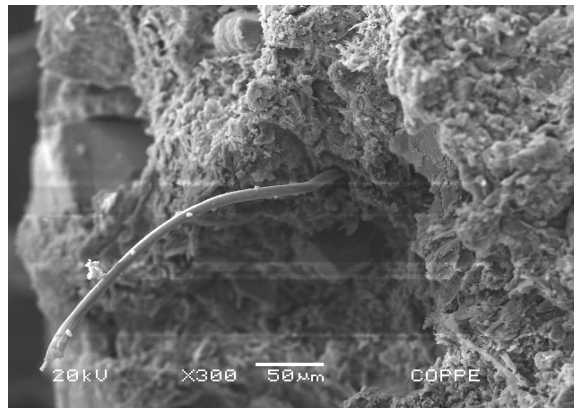
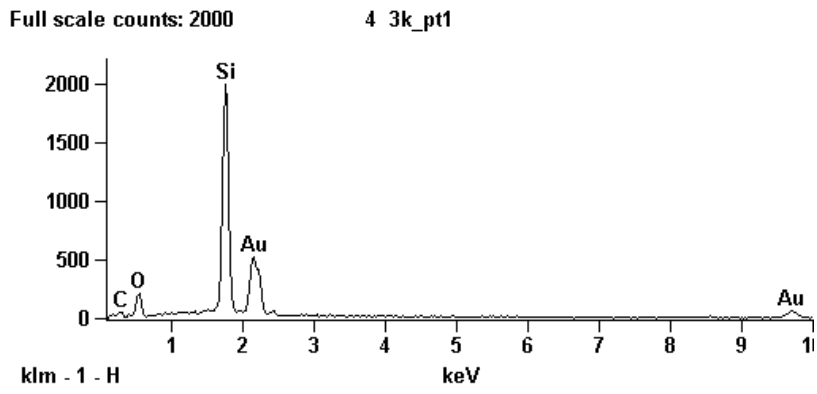


**Imagem 10.3.1.8.** Lodo primário 25/04/11



**Imagem 10.3.1.9.** Lodo primário 25/04/11

**Análise EDS ponto 1:**



**Imagem 10.3.1.10.** Lodo primário 28/03/11

---

*10.3.2. AMOSTRAS DE LODO PRIMÁRIO SUBMETIDAS À  
METODOLOGIA DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO (MEV DOS  
PRECIPITADOS FINAIS)*

---

2 3k

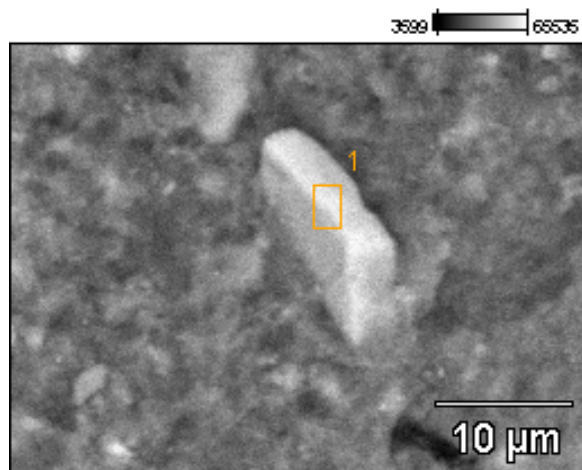
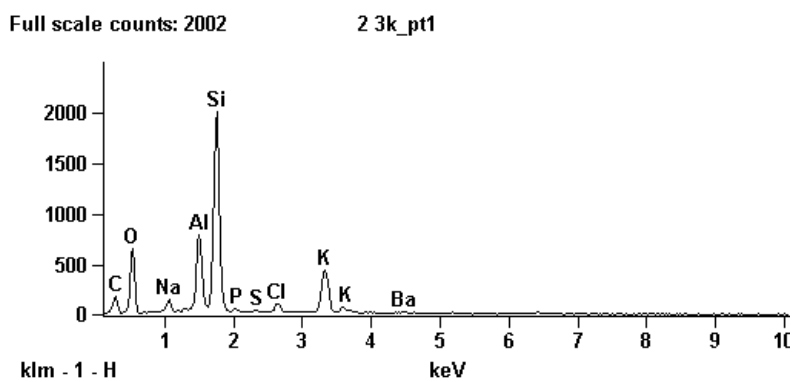


Imagem 10.3.2.1. Lodo primário 28/03/11

### Análise do ponto 1 (EDS)



L 28 03 ap 1k

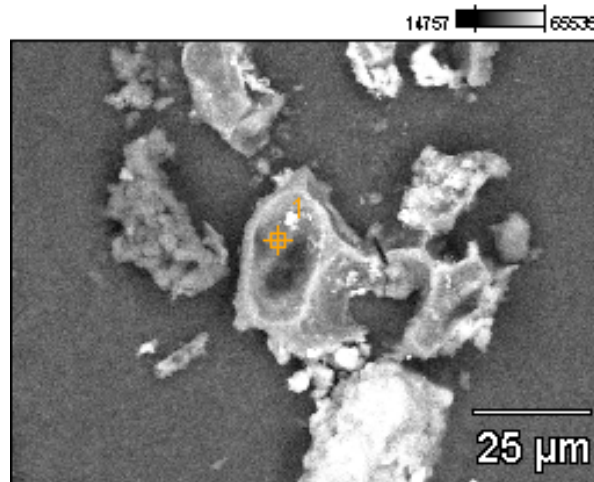
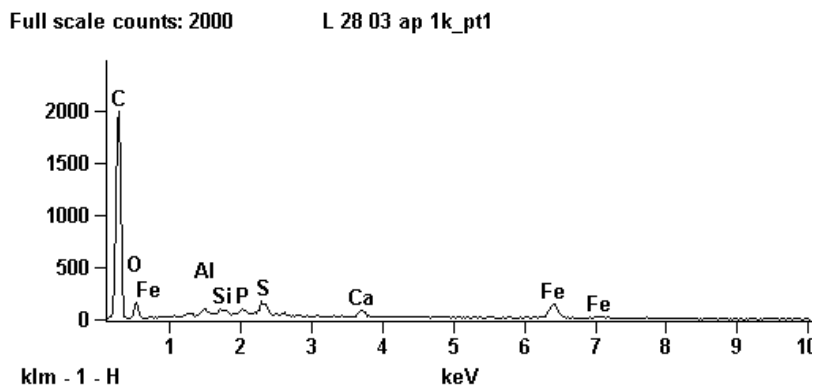


Imagem 9.3.2.2. Lodo primário 28/03/11

EDS ponto 1:



L 28 03 ap 8k

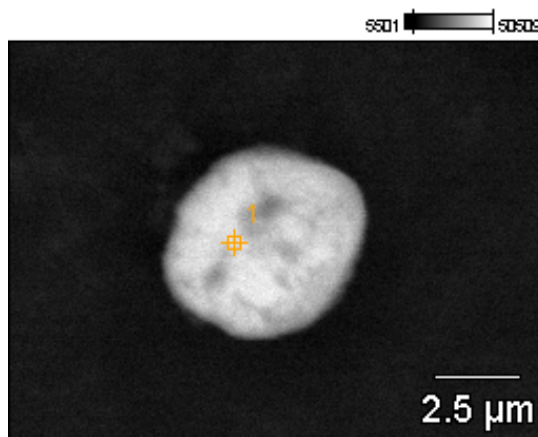
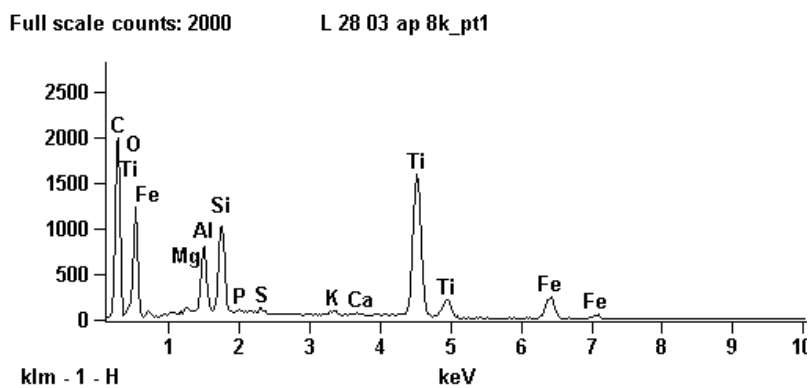
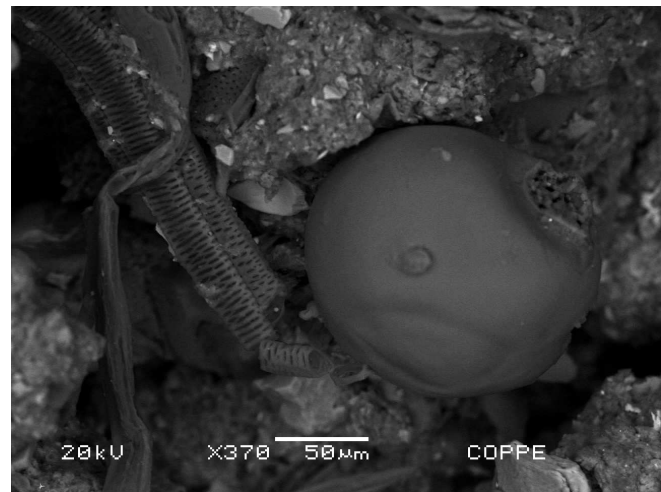
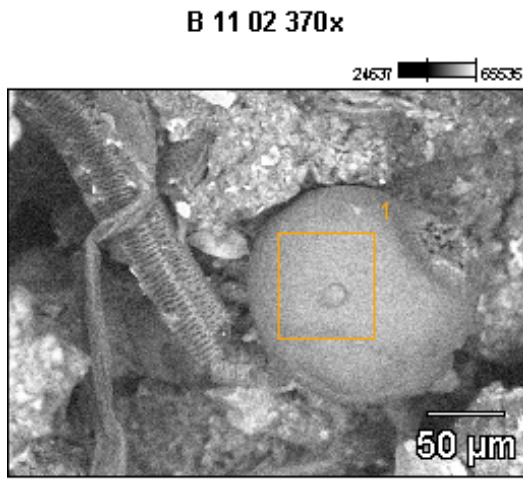


Imagem 10.3.2.3. Lodo primário 28/03/11

### EDS ponto 1:



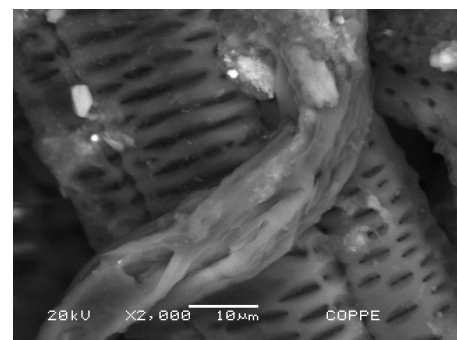
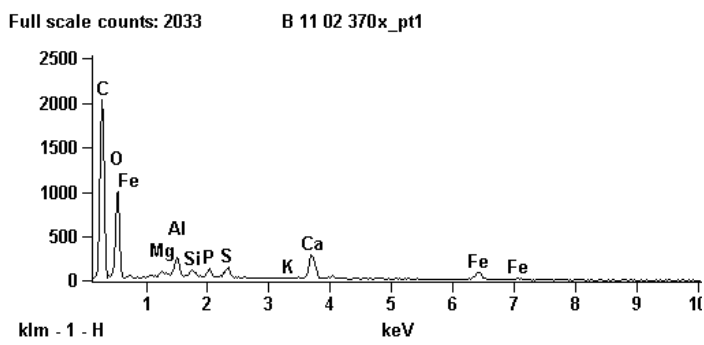
## 10.3.3. AMOSTRAS DE BIODÓLIDOS ANALISADOS EM MEV



**Imagem 10.3.3.1.** Biossólido 08/02/11

**Imagem 10.3.3.2.** Biossólido 08/02/11

**EDS ponto 1:**



**Imagem 10.3.3.3.** Biossólido 08/02/11



BIO 04 03 270x(2)

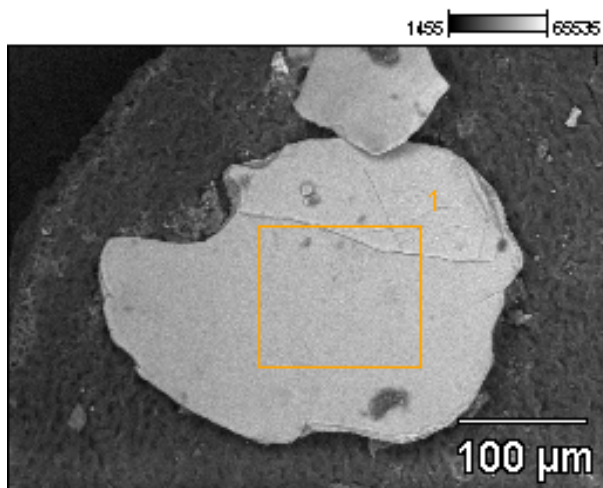
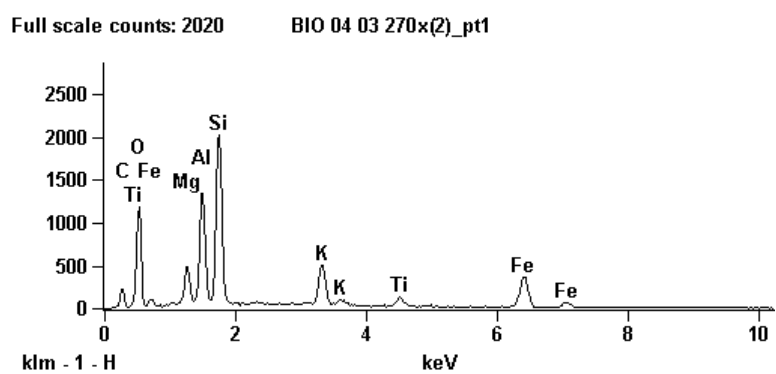
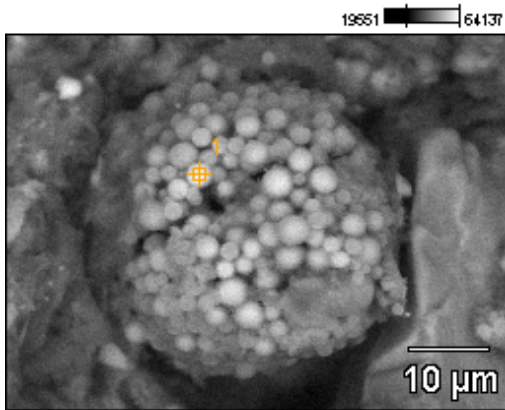


Imagem 10.3.3.4. Biossólido 04/03/11

EDS ponto 1:



B 28 03 2k(1)



B 28 03 5k(1)

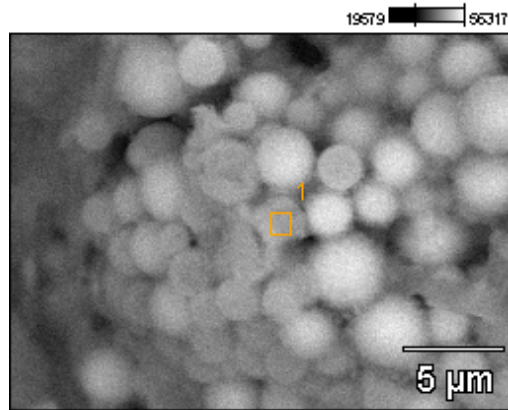
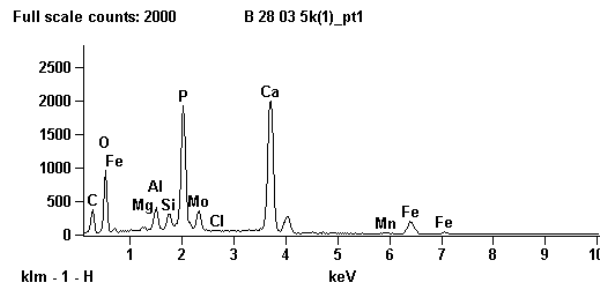
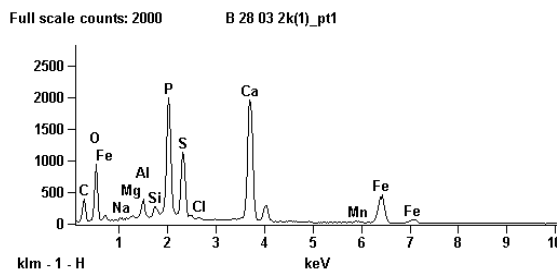
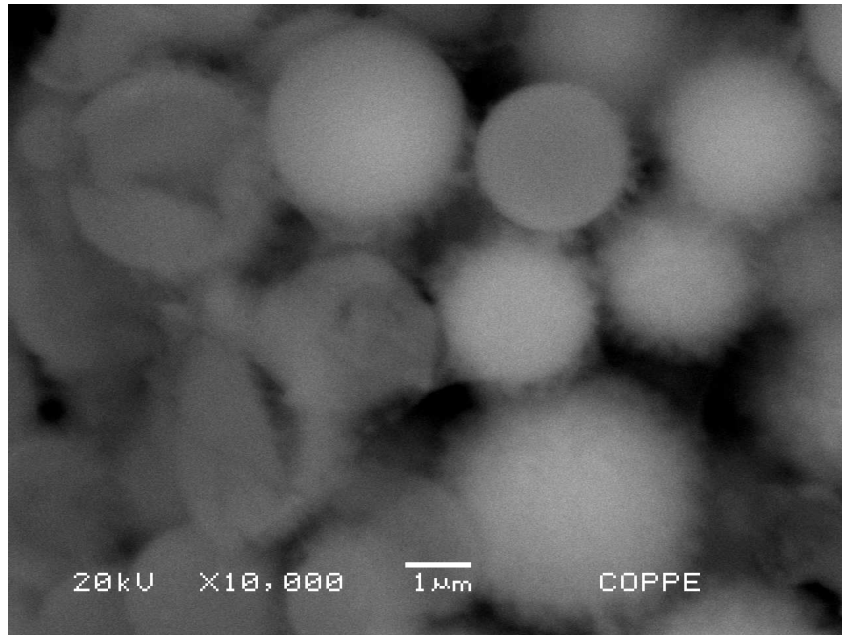


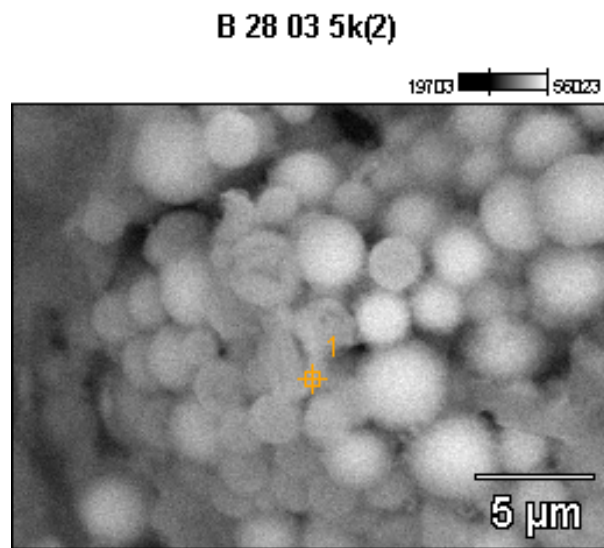
Imagem 10.3.3.5. Biossólido 28/03/11

Imagem 10.3.3.6. Biossólido 28/03/11



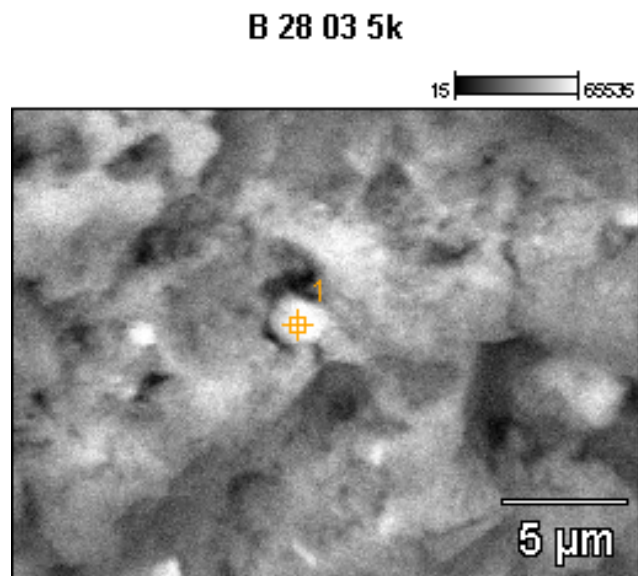
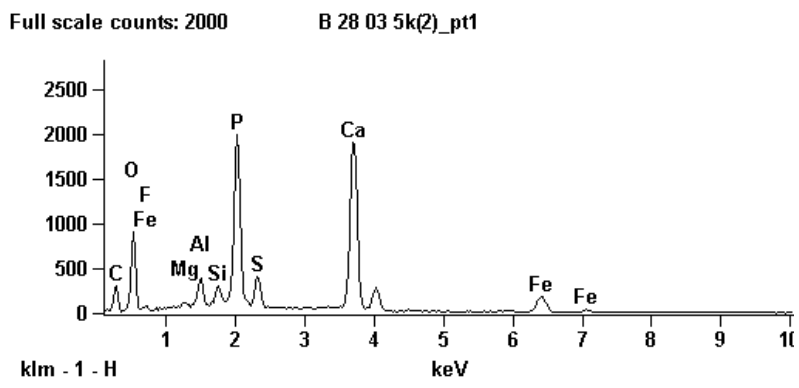


**Imagem 10.3.3.7.** Bio-sólido 28/03/11



**Imagem 10.3.3.8.** Bio-sólido 28/03/11

**EDS ponto 1:**

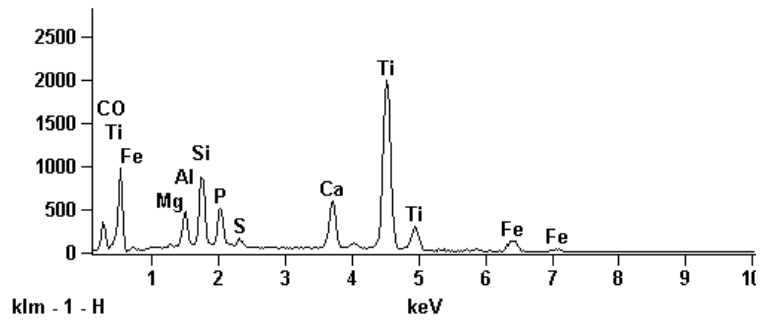


**Imagem 10.3.3.9.** Biossólido 28/03/11

**EDS ponto 1:**

Full scale counts: 2000

B 28 03 5k\_pt1



B 28 03 1k

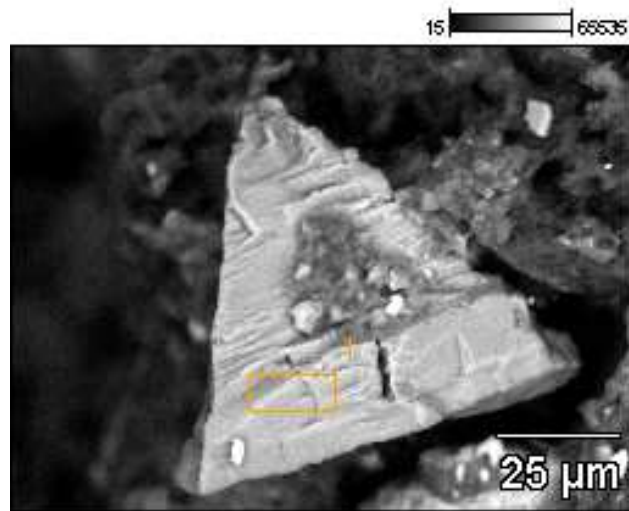
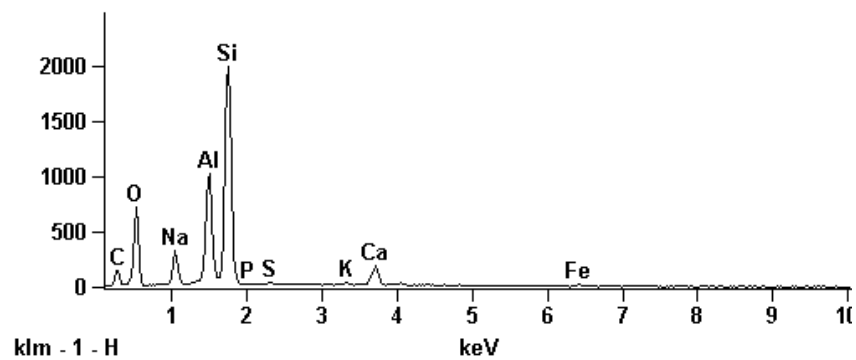


Imagem 10.3.3.10. Biossólido 28/03/11

EDS ponto 1:

Full scale counts: 2000

B 28 03 1k\_pt1



B 28 03 500x

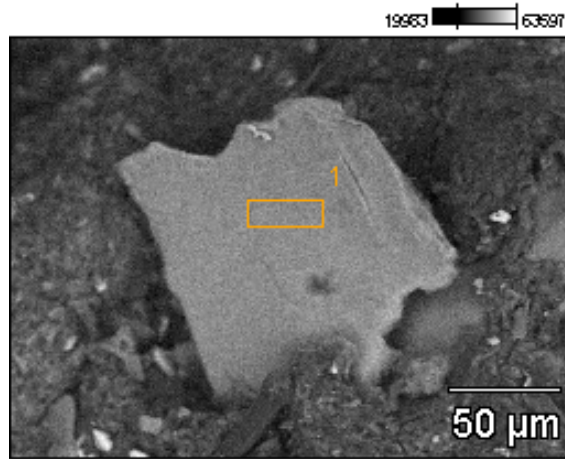
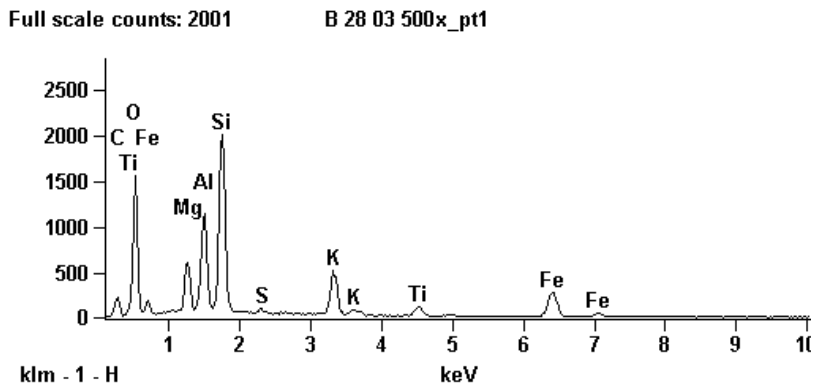


Imagem 10.3.3.11. Biossólido 28/03/11

**EDS ponto 1:**



B 28 03 500x(1)

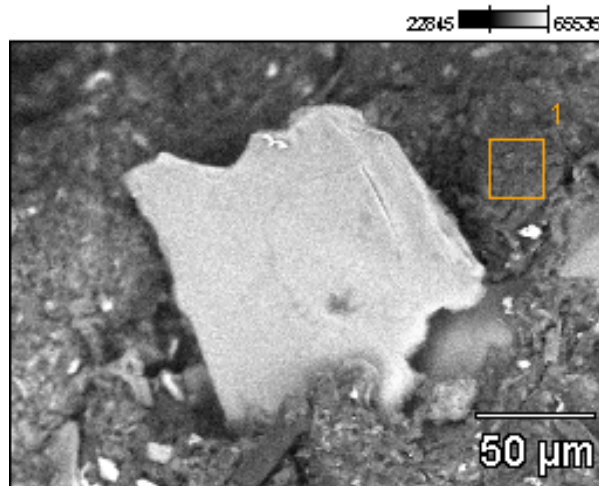
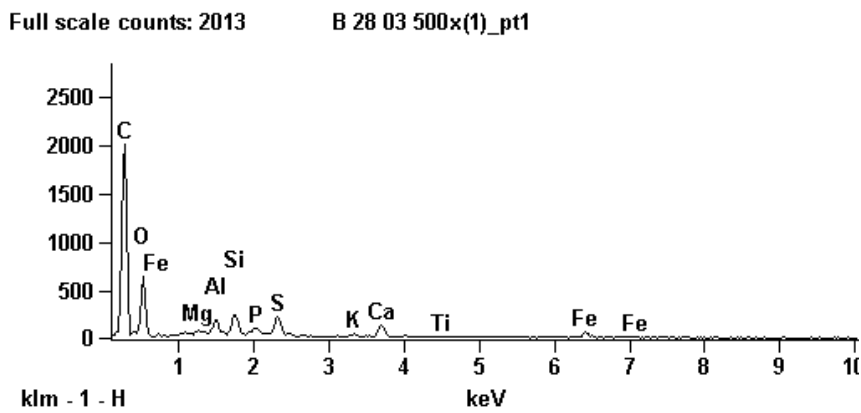
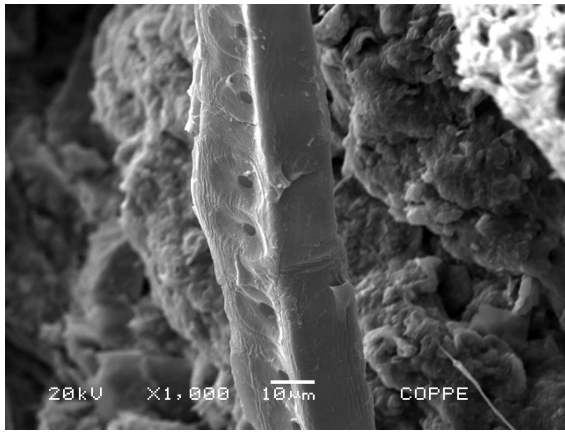


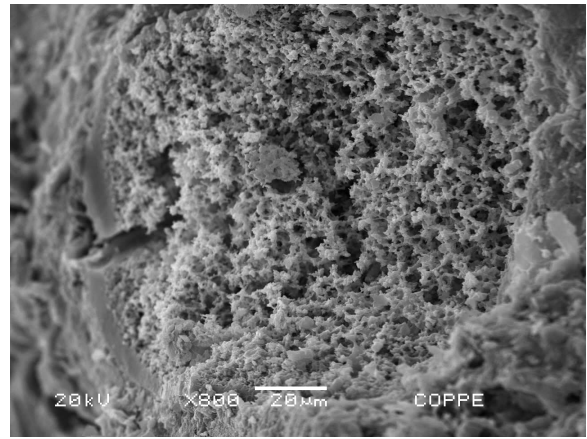
Imagem 10.3.3.12. Biossólido 28/03/11

EDS ponto 1:

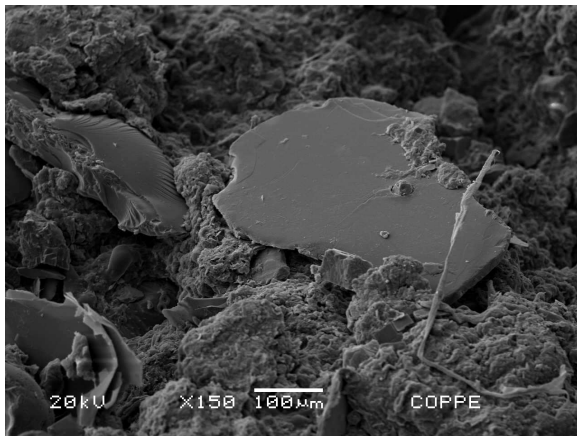




**Imagem 10.3.3.13.** Biossólido 25/04/11



**Imagem 10.3.3.14.** Biossólido 25/04/11

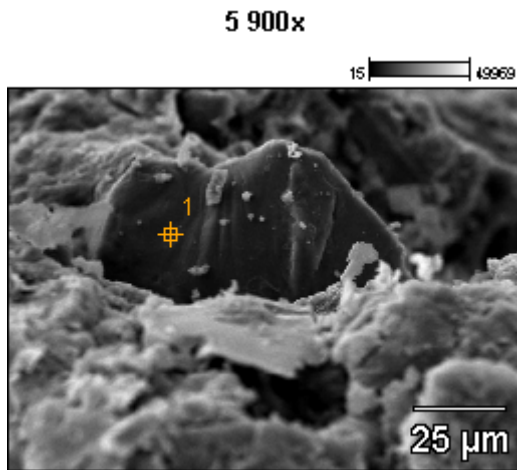


**Imagem 10.3.3.15.** Biossólido 25/04/11



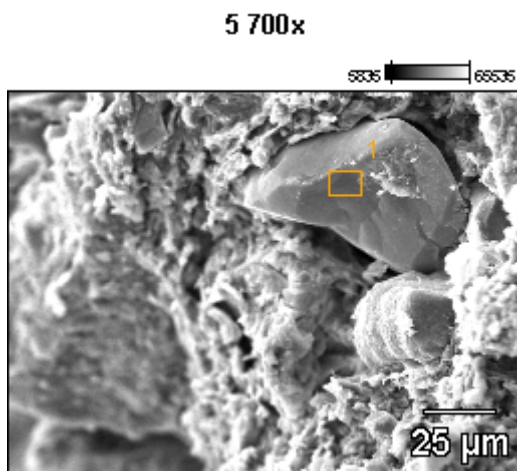
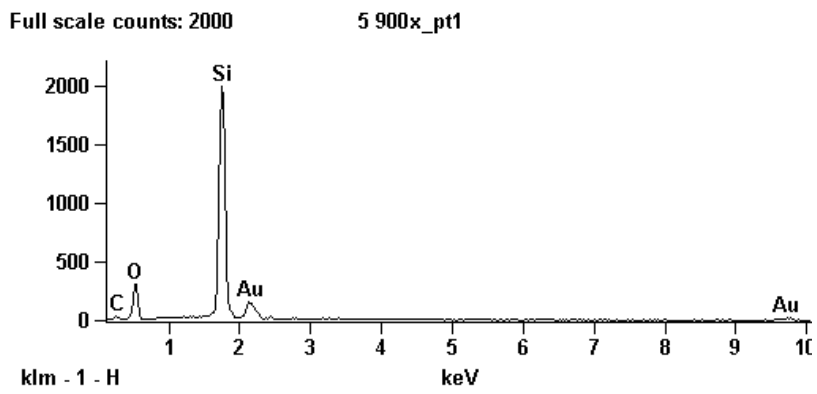
**Imagem 10.3.3.16.** Biossólido 25/04/11





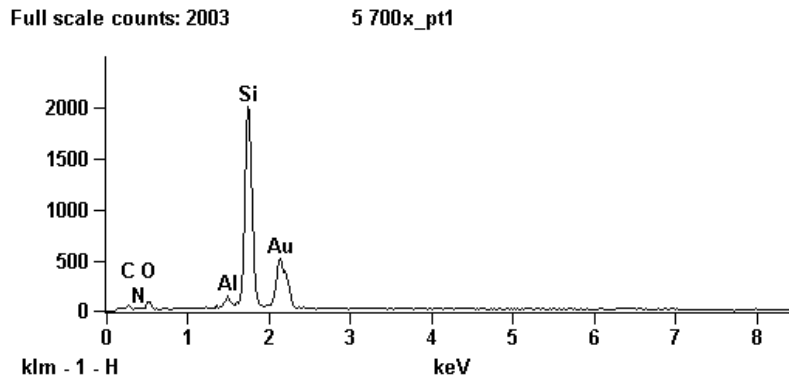
**Imagem 10.3.3.17.** Bio-sólido 25/04/11

**EDS ponto 1:**



**Imagem 10.3.3.18.** Bio-sólido 25/04/11

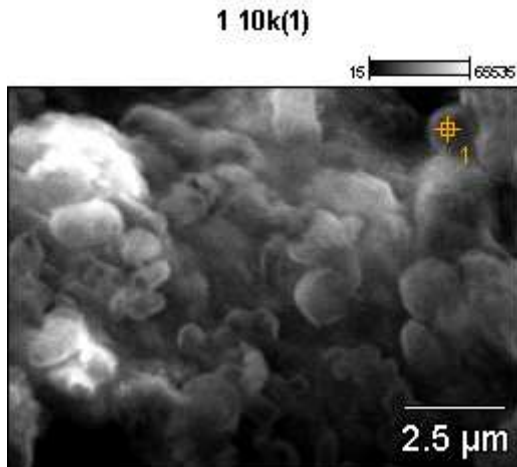
## EDS ponto 1:



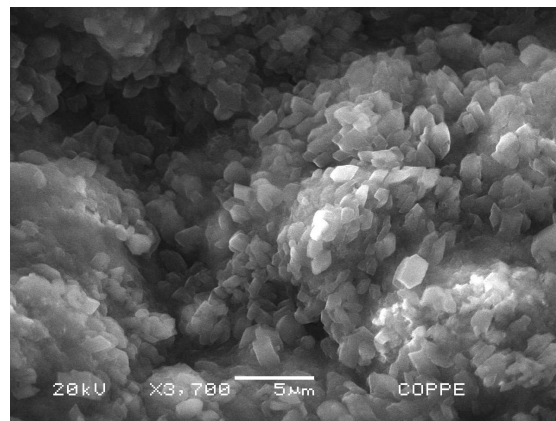
---

### *10.3.4. AMOSTRAS DE BIOSSÓLIDO SUBMETIDOS À METODOLOGIA DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO (MEV DOS PRECIPITADOS FINAIS)*

---



**Imagem 10.3.4.1.** Bio sólido 28/03/11



**Imagem 10.3.4.2.** Bio sólido 28/03/11

1 2k(1)

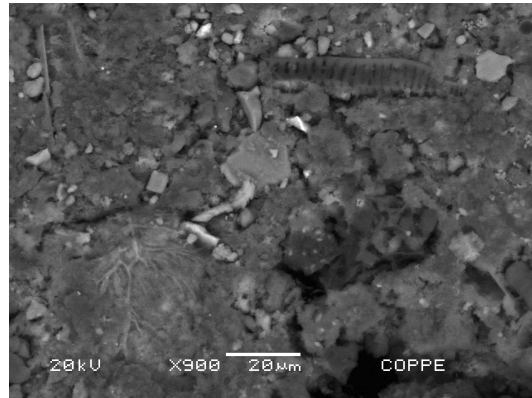
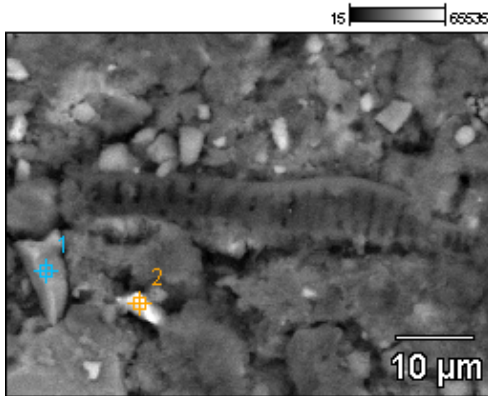
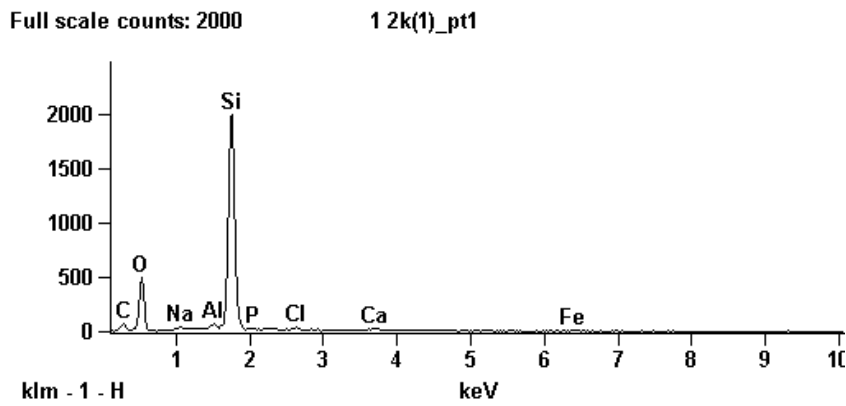


Imagem 10.3.4.3. Biossólido 28/03/11

Imagem 10.3.4.4. Biossólido 28/03/11

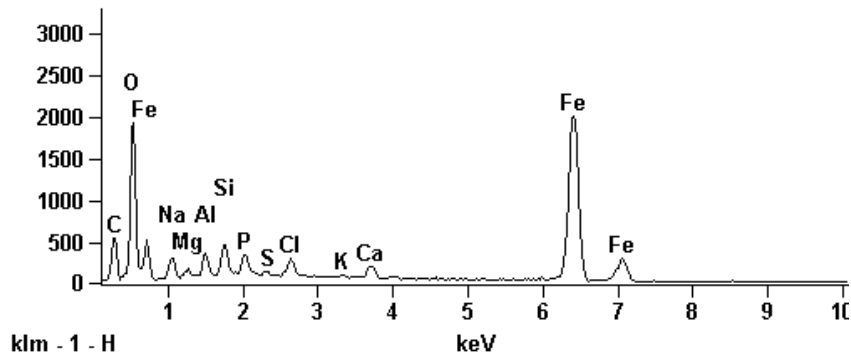
**EDS ponto 1:**



**EDS ponto 2:**

Full scale counts: 2001

1 2k(1)\_pt2



1 5k

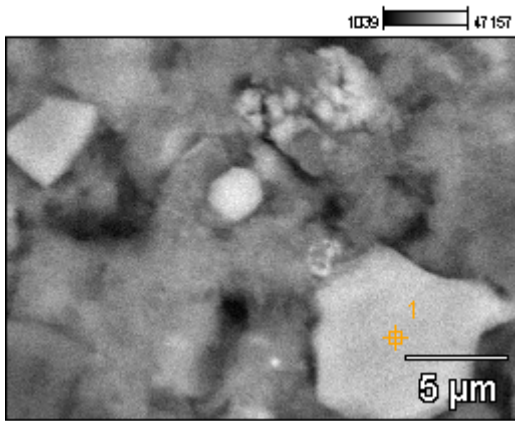
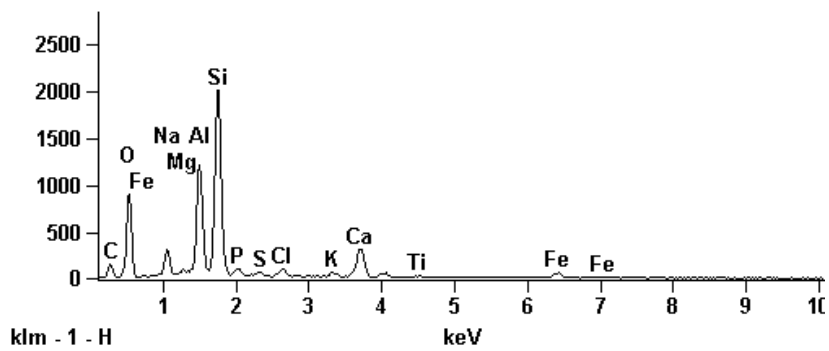


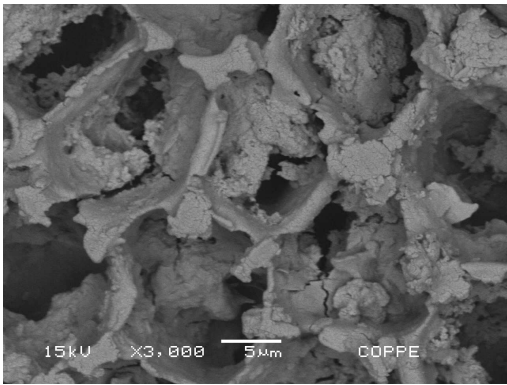
Imagem 10.3.4.5. Biossólido 28/03/11

EDS ponto 1:

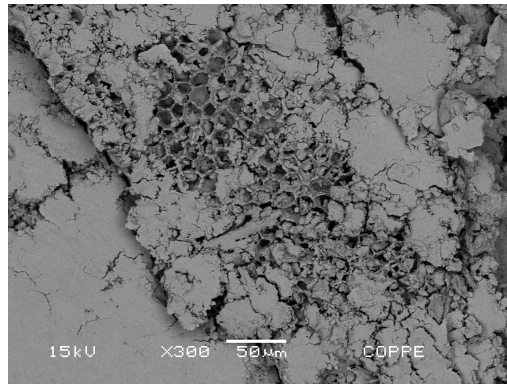
Full scale counts: 2002

1 5k\_pt1





**Imagem 10.3.4.6.** Biossólido 11/07/11

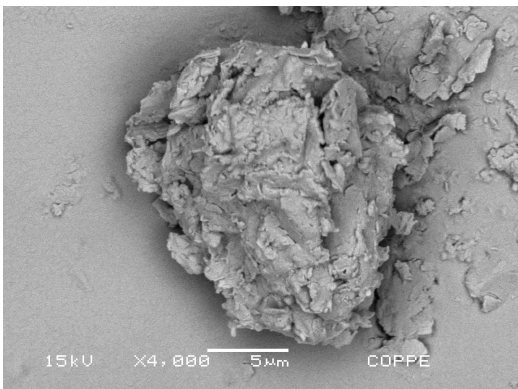


**Imagem 10.3.4.7.** Biossólido 11/07/11

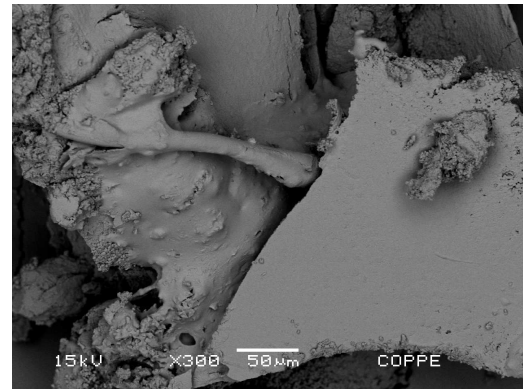
---

***10.3.5. AMOSTRAS DE BIOSSÓLIDO SUBMETIDOS À  
METODOLOGIA DE EXTRATO DE CARNE (MEV DOS  
PRECIPITADOS FINAIS)***

---



**Imagem 10.3.5.1.** Biossólido 15/05/11



**Imagem 10.3.5.2.** Biossólido 15/05/11

---

***10.3.6. AMOSTRAS DE BIOSSÓLIDO SUBMETIDOS À  
METODOLOGIA DE ADSORÇÃO-ELUIÇÃO (MEV DA MATÉRIA  
ADSORVIDA NOS FILTROS DE MEMBRANA CARREGADOS  
NEGATIVAMENTE - HA - MILLIPORE)***

---

B 28 03 HA 100x

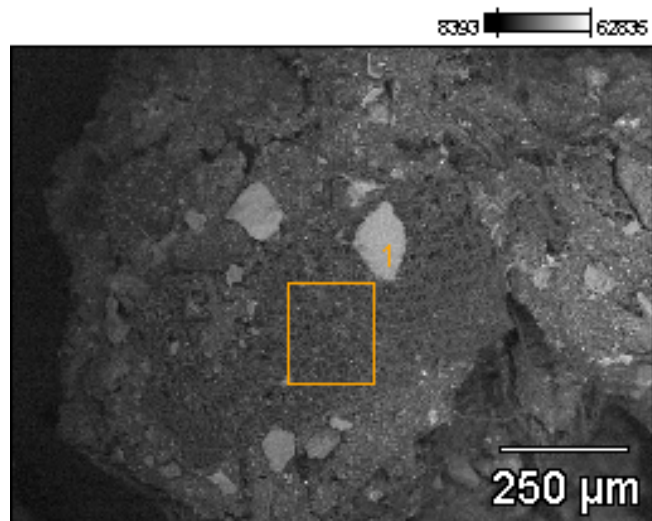
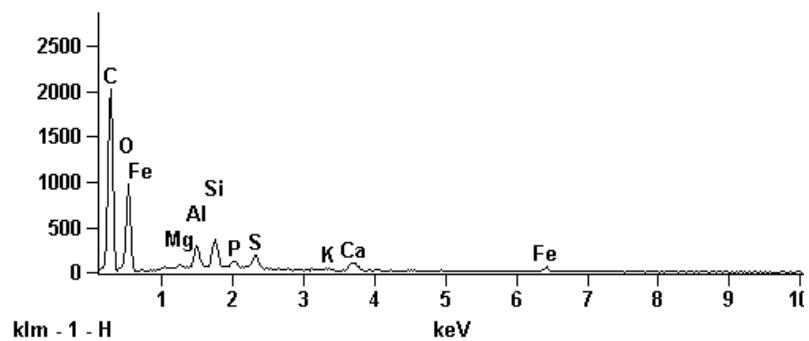


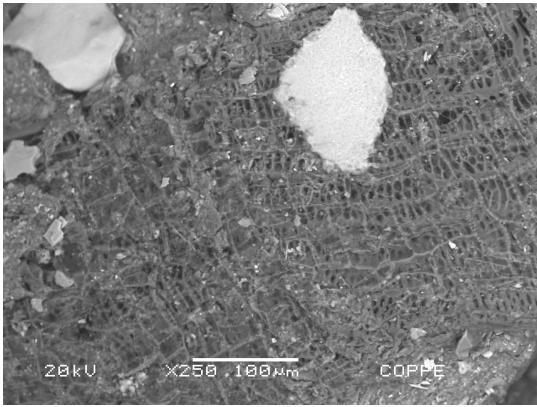
Imagem 10.3.6.1. Biossólido 28/03/11

EDS ponto 1:

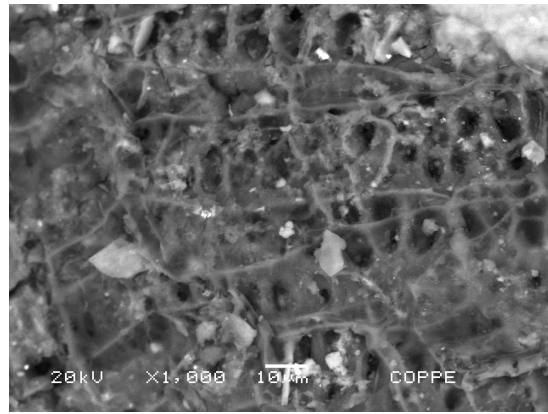
Full scale counts: 2021

B 28 03 HA 100x\_pt1

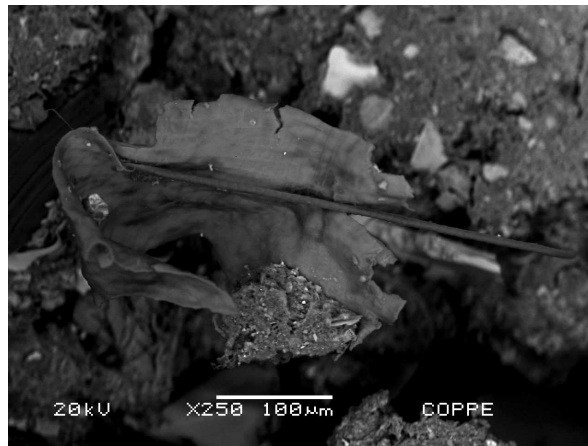




**Imagem 10.3.6.2.** Bio-sólido 28/03/11



**Imagem 10.3.6.3.** Bio-sólido 28/03/11



**Imagem 10.3.6.4.** Bio-sólido 28/03/11

