

SOBRE UM MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO DE ENTEROVÍRUS EM ÁGUA DE ESGOTO PELO HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO

INÁ FERRAZ DE CAMARGO*
HERMANN GONÇALVES SCHATZMAYR*

O presente trabalho descreve um estudo experimental em que foi testada a eficiência de um método para concentração de enterovírus em água de esgoto por adsorção ao hidróxido de alumínio. Adicionou-se o gel de $Al(OH)_3$ (na proporção de 1g para 3,78 litros) à água de esgoto previamente clarificada e com o pH acertado em 5,0. Depois de agitada por 1 hora, a mistura foi filtrada em membrana Millipore tipo AP-20. O hidróxido de alumínio, o qual permaneceu retido na membrana, foi retirado com auxílio de uma espátula e a ele se adicionou meio de Eagle com 10% de soro bovino fetal, sendo o pH acertado em torno de 7,2–7,4 para se processar a eluição. A mistura foi centrifugada a 20.000g por 15 minutos, o sedimento desprezado e o sobrenadante inoculado em células da linhagem LLC-MK₂ para quantificação viral. Paralelamente, foram também inoculadas em cultura de células as amostras de esgoto brutas, isto é, antes de qualquer procedimento para concentração.

O método descrito se mostrou eficiente para concentrar enterovírus em água de esgoto, sendo que tornou possível detectar vírus mesmo de amostras contendo cerca de 1 unidade infecciosa por ml, das quais não se conseguiu isolamento de vírus sem concentração prévia.

O hidróxido de alumínio vem sendo utilizado em virologia há longo tempo. Assim, autores como Sabin, 1931 e Schaeffer & Brebner, 1933 descreveram a adsorção e eluição de Poliovírus em $Al(OH)_3$, com a finalidade de purificação e concentração do vírus. Mais recentemente, Wallis & Melnick, 1967 descreveram um método para concentração de vírus por adsorção a precipitado de hidróxido de alumínio e o aplicaram para detecção de vírus naturalmente presentes em águas servidas. Estes autores conseguiram isolar vírus, os quais não foram detectados diretamente, sem concentração prévia.

Com o intuito de se obter um método de concentração realmente efetivo e pouco dispendioso para exames periódicos de esgoto para presença de vírus, padronizamos um método de concentração pelo hidróxido de alumínio, utilizando água de esgoto artificialmente contaminada com enterovírus.

*Instituto Oswaldo Cruz, Caixa Postal 926, 20000 – Rio de Janeiro, Brasil.

Recebido para publicação em 31 de março de 1978.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se água de esgoto coletada do sistema que serve à Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, na cidade do Rio de Janeiro. As amostras coletadas foram inicialmente autoclavadas para eliminar vírus porventura presentes que interfeririam nas experiências.

O método foi padronizado com Poliovírus tipo 1 amostra Mahoney (virulento) e posteriormente utilizado com Poliovírus tipo 1 amostra Sabin (vacinal), Coxsackie B3, e Echo 9 amostra Vispo, representantes dos enterovírus.

O procedimento seguido para concentração foi o seguinte: a 2000 ml de água de esgoto foi adicionado o vírus e depois de se misturar em agitador magnético por 5 minutos, retirou-se uma amostra de 3 ml, a qual foi centrifugada em torno de 20.000g por 15 minutos para sedimentar-se partículas em suspensão, inclusive bactérias e fungos.

O sobrenadante foi separado e congelado para posterior quantificação viral (controle).

Em seguida, a água de esgoto passou por um processo de clarificação em filtro bobina de porosidade 1000nm e imediatamente após em membrana Millipore tipo AP-20, de porosidade 1500nm. O filtro bobina, apesar de ter menor porosidade que a membrana Millipore, foi usado antes devido a sua maior superfície, não se saturando rapidamente com os detritos da água de esgoto (Homma, 1972).

Depois da clarificação, o pH foi acertado em 5,0 com HCl normal, e o gel de $Al(OH)_3$, obtido do Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (OPAS) Rio de Janeiro, adicionado na proporção de 1 g para 3,78 litros. Deixou-se a mistura agitando por 1 hora à temperatura ambiente para permitir maior contato vírus/hidróxido de alumínio, facilitando a adsorção. Depois disso, a mistura foi filtrada em membrana Millipore tipo AP-20 e o precipitado de $Al(OH)_3$ contendo os vírus adsorvidos, o qual permaneceu retido na membrana filtrante, foi retirado com o auxílio de uma espátula e colocado em tubo de centrífuga. Para se processar a eluição, adicionou-se ao hidróxido de alumínio 2ml de meio de Eagle com 10% de soro bovino fetal e o pH foi acertado em torno de 7,2–7,4 pela adição de gotas de bicarbonato de sódio a 7,5% (Wallis & Melnick, 1967).

Depois de agitada, a mistura foi centrifugada em torno de 20.000g durante 15 minutos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante congelado até o momento de quantificação viral (eluado).

Quantificação viral — As amostras foram diluídas em série no fator 10 (de 10^{-1} a 10^{-7}) e inoculadas em tubos de cultura de células da linhagem LLC-MK₂, mantidas em meio de Eagle. Foram inoculados 4 tubos de células por diluição (0,1 ml por tubo). Os títulos dos vírus foram determinados pela dose 50%, segundo Reed & Muench, 1938 em TCD_{50}/ml .

RESULTADOS

Em todos os experimentos titularam-se amostras brutas (controle) depois da concentração pelo $Al(OH)_3$ (eluado). Foram realizadas 3 experiências com Poliovírus tipo 1 amostra Mahoney, 3 com o vírus Coxsackie B3 e 4 com os vírus ECHO 9 e Poliovírus tipo 1 vacinal. Também foram realizadas 4 experiências nas quais a amostra Mahoney de Poliovírus previamente titulada foi adicionada à água de maneira que sua concentração calculada alcançasse cerca de 1 unidade infecciosa por ml, abaixo portanto do limiar de isolamento direto, sem prévia concentração.

Os resultados médios das experiências realizadas com cada vírus e os respectivos fatores de concentração estão indicados na tabela 1.

TABELA 1

Título infeccioso de diferentes enterovírus em amostras de esgoto brutas (controle), no eluado de $Al(OH)_3$ e fator de concentração viral.

<i>Vírus</i>	<i>Título infeccioso (TCD 50/ml)</i>		<i>Fator de concentração</i>
	<i>Controle</i>	<i>Eluado</i>	
Mahoney	10 ^{3,9}	10 ^{6,1}	162
Mahoney	10 ⁰	10 ^{3,03}	1070
Coxsackie B3	10 ^{2,9}	10 ^{6,47}	3716
ECHO 9	10 ^{4,27}	10 ^{7,4}	1349
Sabin 1	10 ^{2,72}	10 ^{4,6}	75,8

O fator de concentração foi calculado pela razão entre os títulos virais no eluado e no controle.

Entre os vírus testados, o mais eficientemente concentrado foi o vírus Coxsackie B3, seguido pelo ECHO 9, enquanto que o menor fator de concentração foi o alcançado com Poliovírus vacinal, o qual reconhecidamente elui com alguma dificuldade no hidróxido de alumínio (Schatzmayr, 1968 e Thomssem, Maass & Hass, 1961).

Em nenhuma das experiências em que Poliovírus tipo 1 amostra Mahoney foi adicionado à água de maneira a se obter uma concentração em torno de 1 unidade infecciosa/ml, foi o vírus demonstrado na água bruta, mas sempre se obteve o seu isolamento das amostras após a concentração pelo hidróxido de alumínio.

DISCUSSÃO

Pela análise dos resultados obtidos podemos dizer que o método de concentração descrito funcionou satisfatoriamente neste estudo experimental com água de esgoto. O fato de termos conseguido isolar vírus de amostras de esgoto com número muito pequeno de partículas virais (em torno de 1 unidade por ml), demonstra que o método é aplicável ao trabalho de campo, considerando que no esgoto doméstico encontramos cerca de 6 unidades infecciosas por ml (Grabow, 1968).

Muitos métodos têm sido descritos para concentração de vírus em água de esgoto, mas a grande maioria apresenta algum tipo de desvantagem ou limitação (Homma, 1972). Por exemplo, o método do chumaço de gaze apesar de ser econômico tem baixa eficiência (Liu et al., 1971) e o método de separação de fases usando os polímeros sulfato dextrano de sódio e polietilenoglicol, embora eficiente para concentrar enterovírus, tem a desvantagem de inibir alguns vírus como Coxsackie A9 e B2 e ECHO 6, segundo Grindod & Cliver, 1969. Por outro lado, a concentração de vírus por ultracentrifugação exige aparelhagem de alto custo e a concentração por adsorção em membranas filtrantes exige amostras altamente clarificadas devido ao rápido entupimento dos filtros (Christofolletti, 1977).

No caso do método de adsorção ao $Al(OH)_3$, a sua desvantagem seria a dificuldade em aplicá-lo a amostras de grande volume, o que é um fator limitante de importância no caso de pesquisa de vírus em água potável ou de recreação; no caso da água de esgoto, no entanto, onde existe normalmente um número muito maior de partículas virais por unidade de volume, o método nos parece adequado.

Levando em conta o relativo baixo custo operacional do método de concentração descrito neste trabalho, sua metodologia simples e a efetiva concentração viral conseguida nos estudos experimentais, podemos indicá-lo como sendo aplicável com vantagens ao exame de amostras de esgoto visando ao estudo de sua flora viral.

SUMMARY

The efficiency of a method which uses $Al(OH)_3$ for concentrating enterovirus in sewage water was tested in an experimental study. Gel of aluminium hydroxide (in a proportion of 1 g per 3,78 l) was added to the previously clarified sewage water with the pH adjusted to 5,0. After shaking for 1 hour, the mixture was filtered through a Millipore membrane type AP-20. The $Al(OH)_3$ with the adsorbed virus retained on the membrane was removed by means of a spatula. Eagle's medium with 10% foetal calf serum was used for elution and the pH was adjusted to about 7,2–7,4. The mixture was then centrifuged at 20.000 x g, the pellet discarded and the supernatant was inoculated into cells of the strain LLC-MK₂ for viral quantification. In a parallel experiment, samples of crude sewage, that is, without previous concentration treatment, were inoculated into cells.

This method was shown to be efficient for concentrating enterovirus in sewage water, allowing its detection in samples containing about 1 infectious unit per ml. Without a previous concentration, the isolation of virus from such diluted samples was not possible.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHRISTOFOLETTI, A.R., 1977 – Avaliação de métodos de concentração de vírus e aplicação no isolamento de vírus da água do mar. Tese-Mestrado. Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- GRABOW, W.O.K., 1968 – The virology of waste water treatment. *Wat. Res. Perg. Press*, 2 :675-701.
- GRINDOD, J. & CLIVER, D.O., 1969 – Limitations of the polymer two phase system for detection of viruses. *Arch. Ges. Virusforsch*, 28 :338-347.
- HOMMA, A., 1972 – Estudos experimentais da utilização de filtro bobina para a concentração de vírus da água de esgoto. Tese-Doutoramento. Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- LIU, O.C., BRASHEAR, D.A., SERAICHEKAS, H.R., BARNICK, J.A. & METCALF, T.G., 1971 – Virus in water. I. A preliminary study on a flow-through gauze sampler for recovering virus from water. *Appl. Microbiol.*, 21 :405-410.
- REED, L.J. & MUENCH, H., 1938 – A simples method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27 :493-497.
- SABIN, A.B., 1931 – Experiments on the purification and concentration of the virus of poliomyelitis. *J. Exp. Med.*, 56 :307-317.
- SCHAEFFER, M. & BREBNER, W.B., 1933 – Purification of poliomyelitic virus. *Arch. Pathol.*, 15 :221-226.
- SCHATZMAYR, H.G., 1968 – Investigações sobre inibidores para o vírus da poliomielite, presentes em soros de bovinos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2 :133-152.
- THOMSEN, R., MAASS, G. & HAAS, R., 1961 – The adsorption of polioviruses to aluminiumhydroxide: a method of differentiation between strains of the same serological type. Extrait from VII. Symposium of European Assoc. against Poliomyel. and allied Diseases, Oxford, 17-20 sept., p. 310-315.
- WALLIS, C. & MELNICK, J.L., 1967 – Concentration of viruses on aluminum and calcium salts. *Am. J. Epidemiol.*, 85 :459-468.