

## CONDIÇÕES SANITÁRIAS DAS ÁGUAS DE IRRIGAÇÃO DE HORTAS DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO <sup>(1)</sup>

### II. Isolamento de vírus entéricos

Dácio de Almeida CHRISTOVÃO  
José Alberto N. CANDEIAS  
Sebastião Timo IARIA

---

Foram pesquisados vírus entéricos nas águas de irrigação de onze hortas do município de São Paulo. Das amostras das águas de cinco hortas foram isolados os seguintes enterovírus: vírus de poliomielite tipo I e tipo III e vírus Cocksackie tipo A16 e tipo A7. Os resultados evidenciam a superioridade do método de adsorção à resina Dowex, para isolamento de vírus de águas contaminadas com esgotos. O encontro de vírus naquelas águas dá ao aspecto sanitário deste problema, particular importância.

---

#### INTRODUÇÃO

As primeiras tentativas bem sucedidas de isolamento de vírus da poliomielite de esgotos datam dos trabalhos de PAUL; TRASK; CULOTA <sup>18</sup> (1939) e PAUL; TRASK; GARD <sup>19</sup> (1940). Posteriormente, surgiram numerosas publicações sobre o assunto não só em relação ao vírus da poliomielite (MELNICK <sup>15</sup>, 1947; RHODES et alii <sup>21</sup>, 1950) como a outros enterovirus (CLARK et alii <sup>5</sup>, 1951; KELLY <sup>10</sup>, 1953; POSKANZER & BEADENKOPF <sup>20</sup>, 1961; WILCOX et alii <sup>24</sup>, 1961). Vários autores (BERG <sup>1, 2, 3</sup>, 1966; LAMB et alii <sup>12</sup>, 1964) têm verificado que apesar da aplicação de métodos adequados nas estações de tratamento de esgotos é muitas vezes possível isolar vírus dos efluentes. Esta verificação associada ao conhecimento de que podem encontrar-se vírus em cursos de água que receberam

esgotos domésticos sem tratamento dão ao problema uma importância indiscutível (BERG <sup>2</sup>, 1966; FOLIGUET; SCHWARTZBROD; GAUDIN <sup>6, 7</sup>, 1966; LAMB et alii <sup>12</sup>, 1964).

O desenvolvimento das técnicas de purificação de vírus tem simplificado o isolamento de vírus de material proveniente de esgotos ou de cursos de água contaminados (LAGRIFFO <sup>11</sup>, 1950; LUND & HEDSTROM <sup>13</sup>, 1966; MULLER <sup>17</sup>, 1950; SABIN <sup>22</sup>, 1932).

Em virtude da utilização freqüente, em nosso meio, de águas poluídas por esgotos na irrigação de hortas, teve o presente trabalho por finalidade tentar isolar vírus entéricos das mesmas, avaliando, simultaneamente, a eficácia do método de purificação por adsorção a uma resina de troca iônica.

---

Recebido para publicação em 8-6-1967.

(1) Da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP.

#### MATERIAL E MÉTODOS

*Preparo das amostras* — A escolha das hortas, a colheita e o transporte das amostras estão descritos em trabalho anterior (CHRISTOVÃO; IARIA; CANDEIAS <sup>4</sup>, 1967). As 55 amostras de água destinadas ao exame virológico foram agrupadas em dois grupos, o primeiro dos quais compreendendo as 25 amostras colhidas, diretamente, em frascos estéreis, no mês de outubro de 1960 e o segundo, as 30 amostras colhidas em outubro de 1961 mediante o uso de chumaços de gaze. Estes foram preparados com faixas de gaze de 1,50 m de comprimento e 0,20 m de largura, dobradas sobre si mesmas, de modo a formar um chumaço compacto; cada um deles era preso a uma estaca de madeira fixada no leito do curso de água, em ponto previamente escolhido, por intermédio de um cordel de cerca de 0,50 m de comprimento e mantido no local durante 48 horas. Passado este tempo, era retirado e enviado ao laboratório em frascos estéreis (MOORE <sup>16</sup>, 1952). As amostras de água de cada uma das onze hortas foram sempre misturadas.

Tanto as amostras de água colhidas diretamente em frascos estéreis, como as obtidas por expressão dos chumaços de gaze, foram clarificadas por centrifugação a 2.000 RPM durante 15 minutos, em ambiente refrigerado a 5°C, e tratadas por dois métodos diferentes. No primeiro método retiraram-se 10 ml de cada uma das 11 amostras, volume a que se adicionou penicilina e estreptomicina de modo a obter-se uma concentração final de 5.000 U/ml de penicilina e 2 mg/ml de estreptomicina; este material foi centrifugado a 10.000 RPM durante 30 minutos, em ambiente refrigerado a 5°C, sendo o líquido sobrenadante congelado a -60°C para ulterior exame. No segundo método a 100 ml de cada uma daquelas amostras adicionou-se albumina bovina, de modo a obter-se uma concentração de 0,5% e 10 g de resina Dowex 1-X, 200-400 "mesh". A mistura foi agitada durante 5 minutos à temperatu-

ra ambiente e centrifugada a 2.500 RPM durante 10 minutos em ambiente refrigerado a 5°C, eliminando-se o sobrenadante. O sedimento foi agitado durante 10 minutos com 2 ml de solução de fosfato dissódico (pH=8,5) e centrifugado a 3.000 RPM durante 15 minutos, em ambiente refrigerado a 5°C. O sobrenadante adicionado de penicilina e estreptomicina na mesma concentração referida anteriormente foi congelado a -60°C para ulterior exame. Este método corresponde, em linhas gerais, ao descrito por KELLY <sup>10</sup> (1953).

*Métodos virológicos* — Cada uma das amostras foi inoculada por via subcutânea em camundongos recém-nascidos de idade compreendida entre 24 e 48 horas, na dose de 0,02 ml por animal, usando-se 5 animais por amostra. Estes foram mantidos em observação durante 14 dias, sacrificando-se um animal cada 7 dias, para passagens sucessivas. Uma amostra era considerada negativa somente depois de duas passagens sem sintomas característicos de infecção. A identificação das amostras isoladas foi feita de acordo com a técnica descrita por GAMBLE et alii <sup>8</sup> (1963).

As amostras foram ainda inoculadas em culturas de células HeLa e culturas primárias de amnios, usando-se 4 ou 5 tubos por amostra e um inóculo de 0,1 ml por tubo. As culturas foram incubadas a 37°C e observadas diariamente para verificação da presença de efeito citopático. Consideravam-se negativas as culturas que não demonstravam qualquer efeito citopático em duas passagens de 16 dias cada uma. A identificação das amostras isoladas foi feita por provas de neutralização e fixação de complemento GAMBLE et alii <sup>8</sup>, 1963; HAMBLING; DAVIS; MACRAE <sup>9</sup>, 1963).

#### RESULTADOS

Das 11 amostras de água examinadas e correspondentes às hortas selecionadas, 5 mostraram conter um ou mais vírus, distribuídos do modo seguinte: da água

de irrigação colhida em três hortas isolaram-se 4 cepas de vírus de poliomielite, dos tipos I e III numa delas e somente do tipo III em cada uma das duas restantes; em duas outras hortas, das amostras de água examinadas foi possível isolar 2 cepas de vírus Coxsackie do grupo A e tipos 16 e 7.

Das amostras de água não tratadas com a resina Dowex somente foi possível isolar uma cepa de vírus de poliomielite, ao contrário do que ocorreu em relação às amostras de água tratadas com a referida resina. A Tabela 1 apresenta estes resultados.

#### DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram de maneira inequívoca que as águas por nós estudadas, utilizadas na irrigação de hortaliças, contêm enterovírus, dentre os quais, assumem particular interesse os vírus da poliomielite. Naturalmente que as cepas de vírus da poliomielite dos tipos I e III isoladas por nós poderão ser cepas atenuadas de vacina Sabin, identificação que não nos foi possível fazer. Mas mesmo que tivéssemos podido determinar aquela origem vacinal, este fato não diminuiria os riscos de contaminação por cepas selvagens do mesmo vírus. Os tipos de vírus isolados encontram-se entre os mais freqüentemen-

te isolados por outros autores (CLARK et alii<sup>5</sup>, 1951; MELNIK<sup>15</sup>, 1947; RHODES et alii<sup>21</sup>, 1950; WILCOX et alii<sup>24</sup>, 1961). A facilidade com que foram identificadas as cepas isoladas vem comprovar mais uma vez a eficácia das técnicas usadas (GAMBLE et alii<sup>8</sup>, 1963; HAMBLING; DAVIS; MACRAE<sup>9</sup>, 1963), particularmente em relação à prova de neutralização com misturas de soros, método que apesar de mais demorado tem a vantagem de ser de grande economia, não só em termos do número de tubos de cultura usados como da quantidade de soros específicos.

MACK et alii<sup>14</sup> (1958), compararam a incidência de coliformes e enterococos com o isolamento de vírus entéricos. A tentativa de relacionar as freqüências de isolamento de enterovírus com os índices coliformes das águas de irrigação estudadas, apresentada na Tabela 2, sugere-nos apenas as seguintes considerações. Os padrões bacteriológicos para águas de irrigação, estabelecidos para o Estado de São Paulo<sup>23</sup> (1955), toleram o emprego, na rega de vegetais ingeridos crus, de águas com média dos NMP de coliformes inferior a 5.000 por 100 ml, sem especificar o tipo de média. O isolamento de cepas de dois tipos diferentes de vírus da poliomielite, da água da horta D, cuja média geométrica dos NMP de coliformes está muito próxima

TABELA 1

Número de amostras, de águas de irrigação de hortas, positivas para os enterovírus relacionados segundo o tipo de colheita e o método de tratamento

Tipo de Colheita	N.º de amostras examinadas	Método de tratamento									
		com resina					sem resina				
		Poliomielite		Coxsackie		Total	Poliomielite		Coxsackie		Total
		I	III	A16	A7		I	III	A16	A7	
Direta	5	0	1	1	0	2	1	0	0	0	1
Chumaco de Gaze	6	0	2	0	1	3	0	0	0	0	0
Total	11	0	3	1	1	5	1	0	0	0	1

TABELA 2

Isolamento de vírus entéricos das águas de irrigação das hortas examinadas e médias aritmética e geométrica dos NMP por 100 ml de coliformes e *E. coli*

Hortas	Vírus isolados	Coliformes		<i>E. coli</i>	
		NMP/100 ml		NMP/100 ml	
		m. aritmética	m. geométrica	m. aritmética	m. geométrica
A		> 266.272	> 54.451	> 233.269	> 7.408
B		> 406.823	> 81.831	> 148.860	> 14.257
C		> 257.343	28.274	163.279	2.609
D	Polio I e III	55.426	6.323	11.042	1.151
E	Coxsackie A16	> 230.376	20.987	52.473	2.359
F		> 514.430	> 167.721	> 452.533	> 63.484
G	Polio III	37.220	17.010	20.796	4.318
H		100.400	77.561	13.011	2.709
I	Coxsackie A7	157.790	32.914	28.540	9.142
J	Polio III	20.200	13.977	16.610	8.469
K		48.056	19.085	17.343	4.497

do máximo tolerado, nos indicaria claramente o inconveniente de se interpretar o termo "média", estabelecido pelo padrão, como média geométrica. Embora esta medida seja tida como a mais representativa de uma série de valores de NMP, frente aos resultados do presente trabalho, se alguma atitude pudesse ser tomada, deveria ser a de se considerarem as médias fixadas nos padrões estaduais como médias aritméticas. Estas, como pode ser visto na Tabela 2, apresentam-se com valores bem mais elevados — como deverá ocorrer com maior frequência. Assim, a adoção do critério aqui aconselhado tornará os limites, estabelecidos pelo padrão, menos tolerantes.

Em publicação anterior (CHRISTOVÃO; IARIA; CANDEIAS<sup>4</sup>, 1967) ficou demonstrada a precariedade das condições higiênicas das mesmas hortas, cujas águas de irrigação foram objeto do presente trabalho. Os resultados desta pesquisa

de vírus intestinais não permitem qualquer dúvida quanto à existência real de risco à saúde na utilização destas águas de irrigação. O isolamento de vírus da poliomielite e vírus Coxsackie, por outro lado, vem confirmar a origem humana, pelo menos parcial, da poluição fecal evidenciada naquêlo trabalho.

Foi possível demonstrar a utilidade do método de adsorção à resina Dowex para o isolamento de enterovírus. Se as amostras utilizadas no tratamento controle, sem adsorção à resina, tivessem sido submetidas também a êste último tratamento, teríamos, possivelmente, obtido maior número de isolamentos, pois a eficiência da concentração pela resina aniônica é nitidamente superior à simples purificação da água por centrifugação. A êste respeito devemos lembrar que se tivesse sido possível a utilização de culturas de células de rim de macaco Rhesus, o número de isolamentos teria sido, provavelmente, ainda mais elevado.

#### CONCLUSÕES

1. De 5 das 11 amostras de águas de irrigação das hortas examinadas foram isolados os seguintes enterovírus: vírus da poliomielite tipo I e tipo III e vírus Cocksackie tipo A16 e tipo A7.
2. O processo de tratamento pela adsorção à resina Dowex 1-X, 200-400 "mesh", revelou-se nitidamente superior ao método utilizado, usualmente, no isolamento de vírus de fezes.

#### SUMMARY

Five of the 11 samples of irrigation water taken from vegetable gardens of the city of S. Paulo, submitted to virological examination, gave positive results for the following enteroviruses: poliovirus-1, poliovirus-3, Cocksackie virus A16 and Cocksackie virus A7. The resin method rendered the highest yield of isolations in comparison with the unconcentrated method. The isolation of enteroviruses from irrigation waters reflects the unsatisfactory conditions of the same and emphasizes the sanitary aspect of this problem.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luis Cotillo Z. e à técnica Srta. Vera Lucia Broner os nossos agradecimentos pela colaboração prestada na execução deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERG, G. — Virus transmission by the water vehicle. I. *Viruses. H.L.S.*, 3(2): 86-89, Apr. 1966.
2. *Ibid.* — II. Virus removal by sewage treatment procedures. *H.L.S.*, 3(2):90-100, Apr. 1966.
3. *Ibid.* — III. Removal of viruses by water treatment procedures. *H.L.S.*, 3(3):170-181, July 1966.

4. CHRISTOVÃO, D. de A.; IARIA, S. T.; CANDEIAS, J. A. N. — Condições sanitárias das águas de irrigação de hortas do município de São Paulo. I. Determinação da intensidade de poluição fecal através dos NMP de coliformes e de *E. coli*. *Rev. Saúde públ.*, 1(1):3-11, Jun. 1967.
5. CLARK, E. M. et alii. — Cocksackie virus in urban sewage. *Can. J. publ. Hlth*, 42(3):103-107, Mar. 1951.
6. FOLIGUET, J. M.; SCHWARTZBROD, L.; GAUDIN, O. G. — La pollution virale des eaux usées, de surface et d'alimentation. Etude effectuée dans le département français de Meurthe-et-Moselle. *Bull. Org. mond. Santé.*, 35(5):737-749, 1966.
7. ————— La recherche des virus dans les eaux d'égout, de surface et d'alimentation en Meurthe-et-Moselle. II. Résultats quantitatifs et qualitatifs définitifs. *Rev. Hyg. Méd. soc.*, 14(5):411-432, jul./aout 1966.
8. GAMBLE, D. R. et alii. — The routine typing of Cocksackie viruses by complement fixation. *Mil. Bull. Minist. Hlth Lab. Ser.*, 22:6-14, June 1963.
9. HAMBLING, M. H.; DAVIES, P. M.; MACRAE, A. D. — The typing of enteroviruses in tissue culture by neutralization with composite antiserum pools. *J. Hyg., Camb.*, 61(4):479-484, Dec. 1963.
10. KELLY, S. M. — Detection and occurrence of Cocksackie viruses in sewage. *Amer. J. publ. Hlth*, 43(12):1532-1538, Dec. 1953.
11. LAGRIPPO, G. A. — Partial purification of viruses with an anion exchange resin. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, 74(1):208-211, May 1950.
12. LAMB, G. A. et alii. — Isolations of enteric viruses from sewage and river water in a metropolitan area. *Amer. J. Hyg.*, 80(3):320-327, Nov. 1964.
13. LUND, E. & HEDSTROM, C. E. — The use of an aqueous polymer phase system for enterovirus isolations from sewage. *Amer. J. Epidemiol.*, 84(2):287-291, Sept. 1966.
14. MACK, W. N. et alii. — Isolation of enteric viruses and salmonellae from sewage. I. Comparison of coliform and enterococci incidence to the isolation of viruses. *Sew. Ind. Waste*, 30(8):957-962, Aug. 1958.

15. MELNICK, J. L. — Poliomyelitic virus in urban sewage in epidemic and non epidemic times. *Amer. J. Hyg.*, 45(1): 240-253, Jan. 1947.
16. MOORE, S. — A survey by the sewage swab method of latent enteric infection in an urban area. *J. Hyg., Camb.*, 50 (2):137-156, June 1952.
17. MULLER, R. H. — Application of ion exchange resins to the purification of certain viruses. *Proc. Soc. exp. Biol.*, N. Y., 73(2):239-241, Feb. 1950.
18. PAUL, J. R.; TRASK, J. D.; CULOTTA, C. S. — Poliomyelitic virus in sewage. *Science*, 90(2333):258-259, Sept. 1939.
19. PAUL, J. R.; TRASK, J. D.; GARD, S. — Poliomyelitic virus in urban sewage. *J. exp. Med.*, 71(6):765-777, June 1940.
20. POSKANZER, D. C. & BEADENKOPF, W. G. — Waterborne infectious hepatitis epidemic from a chlorinated municipal supply. *Publ. Hlth Rep.*, 76(9):745-751, Sept. 1961.
21. RHODES, A. J. et alii. — Poliomyelitis virus in urban sewage — an examination for its presence over a period of twelve months. *Can. J. publ. Hlth*, 41(6):248-254, June, 1950.
22. SABIN, A. B. — Experiments on the purification and concentration of the virus of Poliomyelitis. *J. exp. Med.*, 56 (3):307-317, Sept. 1932.
23. SAO PAULO (estado). Leis e decretos, etc. — Decreto n.º 24.806, de 25 de julho de 1955... *Revista DAE*, 16(26): 95-100, Set. 1955.
24. WILCOX, K. R., Jr., et alii. — An epidemic of infectious hepatitis in a rural village attributable to widespread contamination of wells. *Amer. J. Hyg.*, 74 (3):249-258, Nov. 1961.

(concluído)