

Pesquisa de bacteriófagos em água suspeita de contaminação por vírus da hepatite A

Study of bacteriophages in water suspected of contamination by hepatitis A virus

RIALA6/1288

Ana Maria Ramalho de PAULA^{1*}, Giselle Ibette Lopez LOPES¹, Harumi SAKUMA¹, Ana Paula de SOUZA¹, Christiane Asturiano RISTORI¹, Ruth Estela Gravato ROWLANDS¹, Marli UEDA², Maria Luisa BARBOSA¹, Miyoko JAKABI¹

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Microbiologia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz Central. Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César – São Paulo, SP, Fone: (11) 3068 2932. email: aramalho@ial.sp.gov.br

²Núcleo de Microscopia Eletrônica, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Instituto Adolfo Lutz Central
Recebido: 16.04.2010 – Aceito para publicação: 25.05.2010

RESUMO

Os vírus entéricos, quando presentes no trato gastrointestinal de indivíduos infectados, são eliminados pelas fezes em grandes quantidades podendo contaminar, direta ou indiretamente, as águas destinadas ao consumo humano. O ser humano é o único hospedeiro natural do vírus da hepatite A. A detecção de colifago e de fago de *Shigella sonnei* em água pode ser indicativa da presença destes vírus. No presente estudo foi realizado o diagnóstico laboratorial presuntivo de um surto de hepatite A, pela pesquisa de bacteriófagos, em uma amostra de água de poço e o estudo da sobrevivência dos fagos de *S. sonnei* em água. A análise revelou resultado positivo para fagos de *Shigella* e negativo para colifagos. Quanto aos ensaios de sobrevivência, a presença dos fagos de *S. sonnei* foi detectada na água do poço naturalmente contaminada até o nono dia de conservação em temperatura ambiente.

Palavras chave. colifago, fago de *Shigella sonnei*, água de poço, vírus da hepatite A

ABSTRACT

The enteric viruses are present in the gastrointestinal tract of infected individuals, being eliminated in feces in large quantities and can directly or indirectly contaminate water intended for human consumption. Humans are the only natural hosts for hepatitis A. Detection of coliphages and phage of *Shigella sonnei* in water may indicate the presence of these viruses. In the present study was done the presumptive laboratory diagnosis of an outbreak of hepatitis A through search of bacteriophages in a sample of well water and the study of survival of shigelafagos in water. The analysis revealed positive for phages of *S. sonnei* and negative for coliphages. For the tests of survival, the presence of phages of *S. sonnei* was detected in naturally contaminated well water until the ninth day of storage at room temperature.

Key words. coliphages, phage of *Shigella sonnei*, well water, hepatitis A virus

Os vírus entéricos, quando presentes no trato gastrointestinal de indivíduos infectados, são eliminados por meio das fezes em grandes quantidades, podendo contaminar, direta ou indiretamente, as águas destinadas ao consumo humano ou para fins de recreação. A ingestão de água contaminada com esses vírus pode causar diferentes patologias em humanos¹.

Dentre os diversos tipos de vírus entéricos patogênicos ao homem e que podem estar presentes em água contaminada, destaca-se o vírus da hepatite A que é endêmico no Brasil e na América Latina². Devido à dificuldade de detecção do vírus da hepatite A em água, sugere-se a pesquisa de bacteriófagos como indicadores da presença de vírus entéricos, uma vez que esses fagos podem estar presentes em fezes humanas e de animais, apresentam tamanho e morfologia semelhantes às do grupo de vírus entéricos patogênicos e possuem características de sobrevivência similares¹.

A detecção dos bacteriófagos é baseada na capacidade dos fagos de infectar, multiplicar e lisar células bacterianas específicas³. Os colífagos (fagos de *Escherichia coli*) e os fagos de *Shigella sonnei* podem ser considerados indicadores da presença de vírus entéricos em água⁴.

Os objetivos do presente estudo foram a realização do diagnóstico laboratorial presuntivo de um surto de hepatite A, pela pesquisa de bacteriófagos, em uma amostra de água e o estudo da sobrevivência dos fagos de *Shigella sonnei* em água.

As cepas receptoras de fagos utilizadas no presente estudo foram *Escherichia coli* CIP 5530 e *Shigella sonnei* CIP 6310. As mesmas eram mantidas em ágar gelose conservação e antes do seu uso eram semeadas em caldo BHI (*brain heart infusion broth*) e incubadas a 35°C por 18-24h.

A amostra de água suspeita de causar hepatite A foi coletada pela Vigilância Sanitária do município de Francisco Morato, São Paulo. A amostra era proveniente de um poço utilizado para consumo de uma residência, habitada por seis pessoas, localizada em frente a um esgoto a céu aberto. No relato do surto, quatro crianças e um adulto apresentaram suspeita de hepatite A, sendo que um dos pacientes apresentou resultado positivo para o vírus (anti-HAV-IgM). A amostra foi coletada cinco dias após a suspeita clínica.

Foram realizados os seguintes ensaios: pesquisa de bacteriófagos, coliformes totais e *E. coli*. As pesquisas de coliformes totais e *E. coli* foram realizadas em meio cromogênico fluorogênico (Colilert-IDEXX).

A metodologia usada para pesquisa de colífagos e de fagos de *Shigella sonnei* seguiu a descrita por Serres et al⁵, com modificação no tempo e temperatura de incubação. As cepas de *E. coli* CIP 5530 e *S. sonnei* CIP 6310 foram semeadas em caldo BHI e incubadas a 30°C por 18-24h. Em um frasco contendo 50 mL de caldo bacteriófago foi semeado 50 mL da amostra de água suspeita e inoculadas 20 gotas da cultura de *S. sonnei* CIP 6310. Em outro frasco com 50 mL de caldo bacteriófago foi semeado 50 mL de água e inoculadas 20 gotas da cultura de *E. coli* CIP 5530. Os frascos foram incubados a 35°C por 6h. Após a incubação, as culturas foram filtradas em membrana filtrante de 0,22 µm. Simultaneamente as culturas de *E. coli* e *S. sonnei* foram semeadas, separadamente, para um novo caldo BHI e incubadas a 35°C por 6h. Após a semeadura, duas a três gotas de cada cultura, de *E. coli* e de *S. sonnei*, foram separadamente semeadas sobre a superfície de placas de ágar nutritivo, com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 35°C por 30 minutos. Após esse período, no centro da placa de ágar nutritivo, contendo cultura de *E. coli*, foi gotejada uma gota do filtrado de *E. coli*. O mesmo procedimento foi realizado com o filtrado de *S. sonnei*. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e após este período foram incubadas a 35°C por 24h.

A área circular, em que foi realizada o gotejamento do filtrado, sem desenvolvimento bacteriano (lise de uma das cepas receptoras), foi submetida à técnica de coloração negativa⁶ utilizando fosfotungstato de potássio 2% (PTK) pH 6.4 para tentativa de detecção de partículas de bacteriófagos por ME (Microscopia Eletrônica). As grades preparadas foram examinadas em um microscópio eletrônico JEOL JEM-1011 operando a 60 kV e os bacteriófagos foram registrados em uma câmera digital CCD.

Os resultados da análise de potabilidade da amostra de água revelaram presença de coliformes totais e *E. coli*, não sendo, portanto, adequada para o consumo humano.

Quanto à pesquisa de bacteriófagos, os ensaios revelaram a inibição da multiplicação de *S. sonnei* no círculo delimitado, ou seja, indicando resultado positivo para a presença de fagos. A placa positiva para os fagos de *S. sonnei* foi submetida à análise por microscopia eletrônica e revelou partículas de bacteriófagos em grandes quantidades. Os fagos apresentavam cabeça em forma hexagonal medindo cerca de 100 nm e uma cauda rígida de aproximadamente 120 nm como mostra a Figura 1.

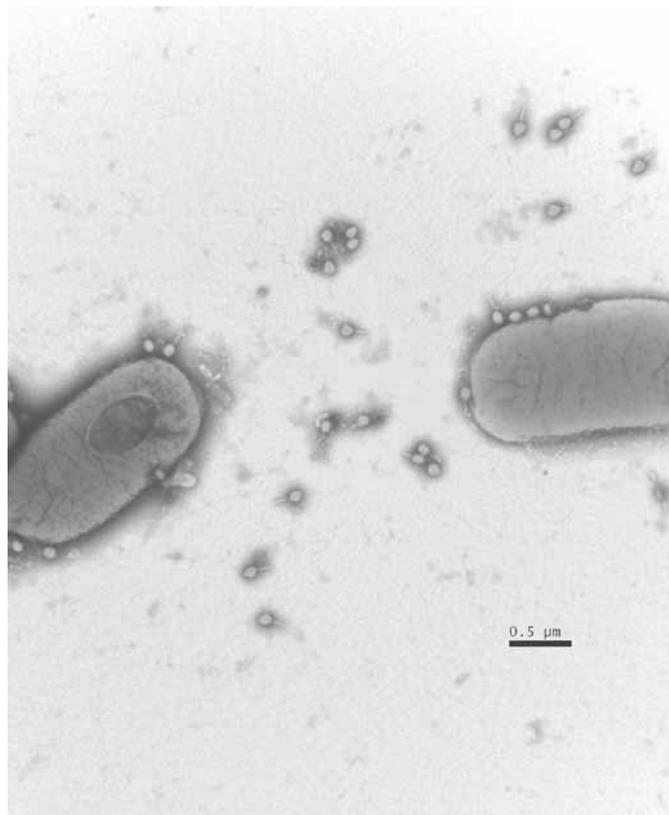


Figura 1. Fotomicrografia demonstrando partículas de fagos de *Shigella sonnei* isolados e acoplados à bactéria

Após a confirmação dos resultados pela microscopia eletrônica, foram realizados ensaios para avaliar a sobrevivência dos fagos de *S. sonnei* em água. A amostra de água enviada para análise foi mantida em temperatura ambiente por 30 dias e, semanalmente, era realizada a pesquisa de fagos de *Shigella*. A presença de fagos de *S. sonnei* foi detectada na água do poço naturalmente contaminada até o nono dia de conservação.

Muitos fatores influenciam a contaminação viral das águas superficiais. Estes fatores incluem a distância da descarga de esgoto percorrido pelo vírus, o período epidêmico, a concentração viral inicial, a sobrevivência e as propriedades de transporte do vírus, ou seja, os vírus podem estar livres ou unidos aos sólidos em suspensão e às condições ambientais (temperatura, circulação de ar, salinidade e pH). Consequentemente, o monitoramento da água do rio, a maior fonte de água potável, é uma tarefa complexa⁷. Além disso, os processos de tratamento convencional da água para consumo humano podem não ser eficientes para a remoção de alguns vírus, tais como o vírus da hepatite A.

Diferentes autores têm evidenciado surtos de hepatite A associados ao consumo de água potável e a uti-

lização de águas de recreação contaminadas⁸. O HAV tem sido detectado em águas de poço⁹, sistemas de tratamento de esgotos, rios, córregos e esgotos¹⁰.

Em amostras ambientais, especialmente em águas, a detecção de vírus, quando comparada à de bactérias, é mais complexa, considerando que normalmente os vírus são encontrados em baixas quantidades, não se multiplicam na água ou no ambiente e sua sobrevivência fora do hospedeiro é curta, sendo necessária a análise de grandes volumes de água para que haja maior concentração das partículas virais.

Os resultados do presente estudo, quanto aos ensaios de sobrevivência dos fagos de *S. sonnei*, demonstram a importância do tempo entre a coleta e o envio da amostra de água para análise de bacteriófagos e elucidação de casos suspeitos de hepatite A.

REFERÊNCIAS

1. Tavares TM, Cardoso DDP, Brito WMED. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. *Rev Patol Tropical*. 2005; 34(2):85-104.
2. Ferreira CT, Silveira TR. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7 (4):473-87.
3. Gelli DS, Souza A. Bacteriófagos fecais em águas, verduras cruas não lavadas e outros produtos alimentícios: observações quanto ao seu achado durante surto de hepatite infecciosa e em condição normal. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1992;52(1:2):63-9.
4. Amaral LA, Rossi Júnior OD, Filho NA, Alexandre AV. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária da água de poços rasos localizados em uma área urbana: utilização de colifagos em comparação com indicadores bacterianos de poluição fecal. *Rev Saúde Pública*. 1994;28(5):345-8.
5. Serres L, Amariglio S, Petransxiene D. Ministère de L'Agriculture-Direction des Services Vétérinaires-Contrôle de la Qualité des Produits Laitiers- Tome II Analyse Microbiologique et Analyse Sensorielle, Micr.IV-C; 1973.p.8-9.
6. Brenner S & Horne RW. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta*. 1959;34:103-10.
7. Skraber S, Gassilloud B, Gantzer C. Comparison of Coliforms and Coliphages as Tools for Assessment of Viral Contamination in River Water. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(6):3644-9.
8. Frost FJ, Kund TR, Craun GF. Is contaminated groundwater an important cause of viral gastroenteritis in the United States? *J Environ Health*. 2002;65:9-14.
9. Borchardt MA, Bertz PD, Spencer SK, Batigelli DA. Incidence of Enteric Viruses in Groundwater from Household Wells in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(2):1172-80.
10. Sassaroli A, Garrafa P, Santos FM, Hársi CM, Vieira MJ, Monezi TA et al. Detection of Hepatitis A in wastewater samples in São Paulo city, Brazil. *Virus Rev Res*. 2000;5:100.