

### III-192 – DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE VÍRUS EM LIXIVIADO DE ATERRO DE RESÍDUOS SÓLIDOS

**Natália Maria Lanzarini<sup>(1)</sup>**

Biomédica pela Universidade Federal Fluminense, Mestre em Ciências pelo Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Doutoranda em Saúde Pública e Meio Ambiente pela Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ.

**Rafaela Marinho Mata<sup>(2)</sup>**

Aluna de iniciação científica, bolsista CNPq da Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ. Graduanda em ciências biológicas pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

**Camille Ferreira Mannarino<sup>(3)</sup>**

Engenheira civil, Mestre em Engenharia Ambiental, Doutora em Saúde Pública e Meio Ambiente. Pesquisadora em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ.

**Josino Costa Moreira<sup>(4)</sup>**

Farmacêutico, Mestre e Doutor em Química. Tecnologista Sênior em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ.

**Marize Pereira Miagostovich<sup>(5)</sup>**

Bióloga pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Mestre e Doutora em Ciências pelo Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Pesquisadora em Saúde Pública do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental. Pavilhão Helio e Peggy Pereira, 2º andar, sala B205. Av. Brasil, 4365 - Manguinhos – Rio de Janeiro - RJ - CEP: 21040-360 - Brasil - Tel: (21) 2562-1923 - e-mail: [natalial@ioc.fiocruz.br](mailto:natalial@ioc.fiocruz.br)

#### RESUMO

O lixiviado de aterro de resíduos sólidos é um líquido de composição variável, de difícil tratamento e possível fonte de contaminação de águas subterrâneas e superficiais. Esse trabalho teve como objetivo detectar e quantificar indicadores virais de contaminação humana em lixiviado de aterro de resíduos sólidos utilizando metodologia de concentração viral associada a técnicas moleculares. Três amostras de lixiviado, coletadas em um aterro sanitário localizado no estado do Rio de Janeiro no período de outubro de 2018 a fevereiro de 2019, foram concentradas por ultracentrifugação utilizando o bacteriófago PP7 como controle interno de processo. Após concentração, as amostras foram analisadas pela metodologia de amplificação em cadeia da polimerase (qPCR) utilizando o sistema TaqMan para detecção e quantificação de adenovírus humano (HAdV) e poliomavírus JC (JCPyV). Parâmetros físico-químicos e bacteriológicos também foram avaliados. O HAdV foi detectado por qPCR em todos os lixiviados analisados, obtendo-se uma média de  $3,44 \times 10^6$  cópias genômicas/mL. Não foi possível detectar JCPyV nos lixiviados coletados. As amostras positivas por qPCR foram amplificadas pela metodologia de PCR convencional e visualizadas em gel de agarose. A taxa de sucesso de recuperação do PP7 foi de 100% em todas as amostras, confirmando a eficiência da metodologia utilizada. A média dos parâmetros físico-químicos dos lixiviados coletados classificou o aterro de resíduos sólidos como pertencente à fase metanogênica, com produção de metano aumentada, pH elevado e matéria orgânica de difícil biodegradação. A média de parâmetros bacteriológicos para coliformes totais e *Escherichia coli* foi de  $8,32 \times 10^3$  NMP/mL e  $1,6 \times 10^3$  NMP/mL, respectivamente. A pesquisa de indicadores virais em lixiviados representa uma abordagem inovadora para futura análise de risco à saúde de trabalhadores que exercem atividades no manejo de resíduos sólidos urbanos, e também às populações expostas a diferentes matrizes ambientais contaminadas por esse efluente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lixiviado, HAdV, JCPyV, virologia ambiental, aterro sanitário.

#### INTRODUÇÃO

Membros das famílias *Adenoviridae* e *Polyomaviridae* que incluem um grupo de vírus DNA, os adenovírus humanos (HAdV) e poliomavírus JC (JCPyV), eliminados nas fezes e urina, respectivamente, têm sido apontados como promissores indicadores virais de contaminação humana principalmente devido à alta especificidade do hospedeiro, ausência de sazonalidade e resistência a condições adversas (Hundesa *et al.*, 2006; Bofill-Mas *et al.*, 2013; Hewitt *et al.*, 2013). A presença destes vírus ubíquos em elevadas concentrações

em águas residuárias e recreacionais urbanas contaminadas com excretas (fezes e urina) humanas tem sido amplamente documentada (Metcalf *et al.*, 1995; Cliver, 2010; Haramoto *et al.*, 2018). Entretanto, ainda é escasso o número de trabalhos que detectam e analisam a presença de vírus em aterros de resíduos sólidos ou lixiviado (Carducci *et al.*, 2013).

Diversos tipos de resíduos sólidos que possuem o aterro como disposição final tais como: papel higiênico, fraldas descartáveis, excretas de pessoas doentes e lodos de fossas sépticas (Metcalf *et al.*, 1995; D'almeida e Vilhena, 2018) podem carrear vírus para o lixiviado, que é o líquido produzido pela decomposição de substâncias contidas nestes resíduos. O lixiviado de aterro de resíduos sólidos é um líquido de composição variável, de difícil tratamento e possível fonte de contaminação de águas subterrâneas e superficiais (Tchobanoglous *et al.*, 1993; Mannarino *et al.*, 2011).

O presente trabalho tem como objetivo detectar e quantificar HAdV e JCPyV em lixiviados de aterro de resíduos sólidos utilizando metodologia de concentração viral associada a técnicas moleculares.

## MATERIAS E MÉTODOS

Três amostras contendo dois litros de lixiviado cada, provenientes de um aterro urbano de resíduos sólidos, localizado no Estado do Rio de Janeiro, foram coletadas no período de outubro de 2018 a fevereiro de 2019.

Para a detecção e quantificação viral, um volume de 42 mL de lixiviado foi concentrado pelo método de ultracentrifugação, de acordo com o protocolo descrito para amostras de esgoto, obtendo-se um volume final concentrado de 500 µL (Pina *et al.*, 1998). O bacteriófago PP7 foi utilizado como controle interno de processo em todas as amostras estudadas (Rajal *et al.*, 2007).

Para extração do ácido nucleico foi utilizado o kit *QIAmp Fast DNA Stool Mini kit*<sup>®</sup> (Qiagen, EUA). As amostras foram analisadas pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) utilizando sistema TaqMan<sup>®</sup> (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, EUA) e iniciadores e sondas específicas para HAdV (Hernroth *et al.*, 2002) e JCPyV (Pal *et al.*, 2006).

As amostras positivas pelo qPCR foram submetidas ao PCR convencional com iniciadores específicos para HAdV (Allard *et al.*, 2001) e JCPyV (Kunitake *et al.*, 1995; Bofill-Mas *et al.*, 2000).

A caracterização físico-química do lixiviado foi realizada abrangendo os seguintes parâmetros: pH, cor, turbidez, alcalinidade, condutividade, dureza, sólidos, carbono, DQO, UV 254, cloreto, nitrogênio amoniacal e fosfato (Apha, 2012). A quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli* (*E. coli*) foi realizada pelo Kit Colilert Quanti-Tray<sup>®</sup>/2000 (IDEXX Laboratories, EUA).

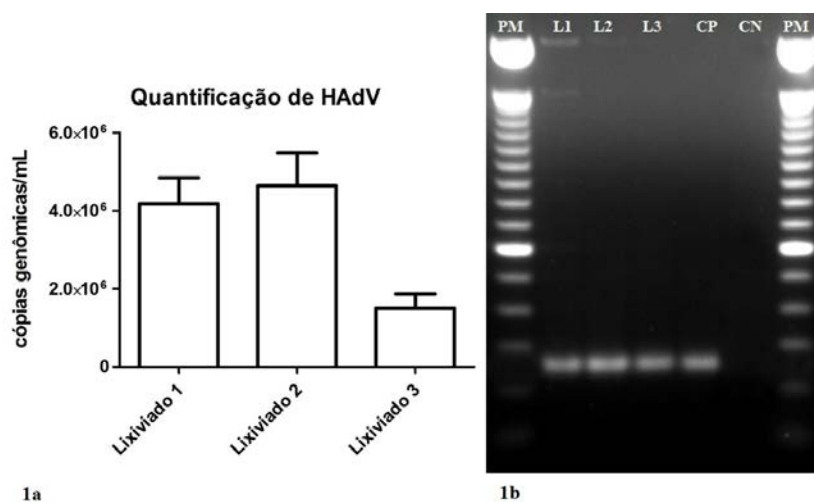
Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz, em parceria com o Laboratório de Engenharia Sanitária da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – LES/UERJ.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a quantificação e detecção de HAdV nas três amostras estudadas com carga viral média de  $3,44 \times 10^6$  cópias genômicas/mL. A taxa de sucesso de recuperação do bacteriófago PP7 foi de 100%. Não foi possível detectar JCPyV nos lixiviados coletados. Nossos resultados corroboram os dados obtidos por Carducci *et al.* (2013) que demonstrou a presença de HAdV infecciosos em um aterro sanitário de uma área com 340.000 habitantes em Pisa, Itália. Como a autora discute, embora sejam relatadas muitas publicações de detecção de vírus em estações de tratamento de esgoto, em aterros sanitários estão limitados a estudos de soroprevalência de Hepatite A, B e C e à detecção de enterovírus no ar de estações de processamento de resíduos, indicando a necessidade de trabalhos avaliando diferentes vias de transmissão (Carducci *et al.*, 2013). Nesse trabalho, a detecção e quantificação de HAdV demonstrou a eficiência do método de concentração utilizado. A metodologia de ultracentrifugação, descrita por Pina (1998) para amostras de esgoto, tem sido aplicada em vários trabalhos de virologia ambiental, e se baseia na centrifugação de partículas virais em alta velocidade para retirada de material suspenso da matriz ambiental. Os títulos de

HAdV alcançados nas amostras de lixiviados foram similares a obtidos em esgoto bruto e superiores a amostras obtidas em lodo ativado (Prado *et al.*, 2014; Rames *et al.*, 2016; Haramoto *et al.*, 2018)

Embora não detectado nestas amostras, a presença de JCPyV foi detectada previamente por análise metagenômica realizada em resíduos de banheiros de voos de longa distância (Hjelmsø *et al.*, 2019).



**Figura 1: a) Quantificação de HAdV em cópias genômicas por mL. b) gel de agarose 1% com o fragmento amplificado de 245 pares de base. PM = peso molecular de 100 pares de base. L1, L2 e L3: amostras de lixiviado. CP = controle positivo. CN = controle negativo.**

A Tabela 1 demonstra a média dos parâmetros físico-químicos e bacteriológicos das três amostras coletadas. O lixiviado apresentou pH em torno de 8,0, com cor aparente e verdadeira, turbidez, alcalinidade, condutividade e dureza elevados. As amostras também apresentaram matéria orgânica, sólidos dissolvidos, carbono, DQO e UV 254 aumentados e elevada concentração de cloreto e nitrogênio amoniacal. O fósforo não pode ser quantificado devido ao limite de detecção do método utilizado. Os resultados encontrados estão de acordo com o trabalho de Souto (2009) que descreve as características físico-químicas típicas do lixiviado de aterros brasileiros na fase metanogênica: produção significativa de metano, pH alto e matéria orgânica predominante de baixa biodegradabilidade (Kulikowska e Klimiuk, 2008; Souto, 2009).

Quanto aos parâmetros bacteriológicos, conforme observado na Tabela 1, o lixiviado apresentou concentração de  $8,32 \times 10^3$  número mais provável (NMP)/100 mL para coliformes totais e de  $1,6 \times 10^3$  NMP/100 mL para *E. coli*. Os resultados estão de acordo com a revisão das características de lixiviados brasileiros, que retrata a alta variabilidade de coliformes totais encontrados nos lixiviados, podendo variar de  $2,3 \times 10^2$  a  $1,7 \times 10^8$  NMP/100 mL (Souto, 2009). Resultados diferentes do nosso trabalho foram encontrados em parâmetros bacteriológicos do lixiviado da bacia de caminhão coletor de resíduos sólidos domiciliares no trabalho de Silva *et al.* (2011), que evidenciou  $1,9 \times 10^9$  NMP/100 mL para coliformes totais e  $4,3 \times 10^8$  NMP/100 mL para *E. coli* (Silva *et al.*, 2011).

**Tabela 1: Média dos parâmetros físico-químicos e bacteriológicos das três amostras de lixiviado coletadas em um aterro sanitário localizado no Estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2018 a fevereiro de 2019.**

<b>Parâmetros físico-químicos</b>	<b>Média</b>
pH	7,98
Cor verdadeira (mg Pt-Co L <sup>-1</sup> )	9550
Cor aparente (mg Pt-Co L <sup>-1</sup> )	11883,33
Turbidez (NTU)	334,33
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	11385,33
Condutividade (ms cm <sup>-1</sup> )	1530
Dureza total (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	1384,33
Sólidos totais (mg L <sup>-1</sup> )	14746,67
Sólidos dissolvidos totais (mg L <sup>-1</sup> )	14237
Sólidos suspensos totais (mg L <sup>-1</sup> )	509,67
Sólidos fixos totais (mg L <sup>-1</sup> )	10334,67
Sólidos voláteis totais (mg L <sup>-1</sup> )	4412
Carbono orgânico dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	975,6
Demanda química de oxigênio (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	7333
UV 254 nm	3922
Cloreto (mg Cl L <sup>-1</sup> )	4037,87
Nitrogênio amoniacal total (mg N-NH <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	1846,33
Fósforo (mg P L <sup>-1</sup> )	*
coliformes totais NMP/100 mL	8,32x10 <sup>3</sup>
<i>Escherichia coli</i> NMP/mL	1,6x10 <sup>3</sup>

## CONCLUSÕES

A detecção e quantificação média de HAdV nas amostras de lixiviado estimada foi de 3,44x10<sup>6</sup> cópias genômicas/mL, demonstrando de forma preliminar o potencial da metodologia de ultracentrifugação para detecção do principal indicador viral de contaminação humana.

Foi observado por parâmetros físico-químicos do lixiviado, que o aterro de resíduos sólidos do Estado do Rio de Janeiro apresenta características de fase metanogênica e parâmetros bacteriológicos típicos para essa matriz ambiental.

Dessa forma, reforça-se a necessidade do desenvolvimento de mais estudos que busquem demonstrar a infecciosidade de HAdV em lixiviados de aterros de resíduos sólidos, visando a futura determinação de risco de exposição a trabalhadores desses locais e a populações expostas a matrizes ambientais contaminadas por lixiviados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol*, v. 39, n. 2, p. 498-505, 2001.
2. APHA. Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater. 22. Washington D.C.: American Public Health Association & American Water Works Association, 2012.
3. OFILL-MAS, S.; PINA, S.; GIRONES, R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol*, v. 66, n. 1, p. 238-45, 2000.
4. BOFILL-MAS, S. et al. Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. *Biomed Res Int*, v. 2013, p. 192089, 2013.
5. CARDUCCI, A.; FEDERIGI, I.; VERANI, M. Virus occupational exposure in solid waste processing facilities. *Ann Occup Hyg*, v. 57, n. 9, p. 1115-27, 2013.
6. CLIVER, D. O. Early Days of Food and Environmental Virology. *Food Environ Virol*, v. 2, n. 1, p. 1-23, 2010.
7. D'ALMEIDA, M.; VILHENA, A. Lixo Municipal - Manual de gerenciamento integrado. CEMPRE. São Paulo: IPT 2018.

8. HARAMOTO, E. et al. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res*, v. 135, p. 168-186, 2018.
9. HERNROTH, B. E. et al. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol*, v. 68, n. 9, p. 4523-33, 2002.
10. HEWITT, J. et al. Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *Water Res*, v. 47, n. 17, p. 6750-61, 2013.
11. HJELMSØ, M. H. et al. Metagenomic analysis of viruses in toilet waste from long distance flights-A new procedure for global infectious disease surveillance. *PLoS One*, v. 14, n. 1, p. e0210368, 2019.
12. HUNDESA, A. et al. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol*, v. 72, n. 12, p. 7886-93, 2006.
13. KULIKOWSKA, D.; KLIMIUK, E. The effect of landfill age on municipal leachate composition. *Bioresour Technol*, v. 99, n. 13, p. 5981-5, 2008.
14. KUNITAKE, T. et al. Parent-to-child transmission is relatively common in the spread of the human polyomavirus JC virus. *J Clin Microbiol*, v. 33, n. 6, p. 1448-51, 1995.
15. MANNARINO, C. F.; FERREIRA, J. A.; MOREIRA, J. C. Tratamento combinado de lixiviado de aterros de resíduos sólidos urbanos e esgoto doméstico como alternativa para a solução de um grave problema ambiental e de saúde pública - revisão bibliográfica. *Cad Saúde Colet*. Rio de Janeiro. 19: 11-9 p. 2011.
16. METCALF, T. G.; MELNICK, J. L.; ESTES, M. K. 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*, v. 49, p. 461-87, 1995.
17. PAL, A. et al. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J Virol Methods*, v. 135, n. 1, p. 32-42, 2006.
18. PINA, S. et al. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol*, v. 64, n. 11, p. 4485-8, 1998.
19. PRADO, T.; GASPAR, A. M.; MIAGOSTOVICH, M. P. Detection of enteric viruses in activated sludge by feasible concentration methods. *Braz J Microbiol*, v. 45, n. 1, p. 343-9, 2014.
20. PRADO, T.; MIAGOSTOVICH, M. P. [Environmental virology and sanitation in Brazil: a narrative review]. *Cad Saude Publica*, v. 30, n. 7, p. 1367-78, 2014.
21. RAJAL, V. B. et al. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res*, v. 41, n. 7, p. 1411-22, 2007.
22. RAMES, E. et al. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Res*, v. 96, p. 308-26, 2016.
23. SILVA, C. A. M. D. C. et al. Microbiological characterization of leachate from domestic and hospital solid wastes from Rio de Janeiro city. *Eng Sanit Ambient*, v. 16, n. 2, p. 127-132, 2011.
24. SOUTO, G. D. Lixiviado de aterros sanitários brasileiros: estudo de remoção do nitrogênio amoniacal por processo de arraste com ar (stripping). 2009. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo.
25. TCHOBANOGLIOUS, G. et al. Integrated solid waste management: engineering principles and management issues. McGraw-Hill International Editions. 1993.