



Diego de Oliveira Pinto

Aplicabilidade do Método 1623 e do Método de Filtração em Membranas para detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras hídricas considerando diferentes faixas de turbidez, e estudo da etapa de purificação por Separação Imunomagnética.

*Applicability of Method 1623 and Membrane Filtration Method for detection of **Giardia** spp. cysts and **Cryptosporidium** spp. oocysts in water samples considering different levels of turbidity, and study of Immunomagnetic separation phase*

CAMPINAS/SP

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

DIEGO DE OLIVEIRA PINTO

Aplicabilidade do Método 1623 e do Método de Filtração em Membranas para detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras hídricas considerando diferentes faixas de turbidez, e estudo da etapa de purificação por Separação Imunomagnética.

*Applicability of Method 1623 and Membrane Filtration Method for detection of **Giardia** spp. cysts and **Cryptosporidium** spp. oocysts in water samples considering different levels of turbidity, and study of Immunomagnetic separation phase.*

Dissertation presented to the Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Animal Biology, in the area of Anthropic Relations, Environmental and Parasitology.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

Orientador: Dr. Romeu Cantusio Neto

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO DIEGO DE OLIVEIRA PINTO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. ROMEU CANTUSIO NETO.



Dr. Romeu Cantusio Neto

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P658a Pinto, Diego de Oliveira, 1987-
Aplicabilidade do método 1623 e do método de filtração em membranas para detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras hídricas considerando diferentes faixas de turbidez, e estudo da etapa de purificação por separação imunomagnética / Diego de Oliveira Pinto. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Romeu Cantusio Neto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Filtar-Max. 2. Atibaia, Rio (SP). 3. Água bruta. 4. Turbidez da água. 5. Separação imunomagnética. I. Cantusio Neto, Romeu. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Applicability of method 1623 and membrane filtration method for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples considering different levels of turbidity, and study of immunomagnetic separation phase

Palavras-chave em inglês:

Filtar-Max

Atibaia river

Raw water

Water turbidity

Immunomagnetic separation

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestre em Biologia Animal

Banca examinadora:

Romeu Cantusio Neto [Orientador]

Silmara Marques Allegretti

Neliane Ferraz de Arruda Silveira

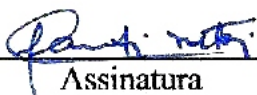
Data de defesa: 19-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

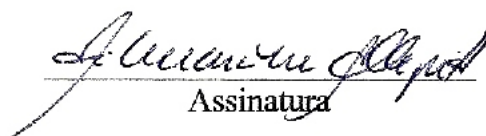
Campinas, 19 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Romeu Cantusio Neto (orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti


Assinatura

Profa. Dra. Neliane Ferraz De Arruda Silveira


Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

Assinatura

Prof. Dr. Adriano Luiz Tonetti

Assinatura

Resumo

Os protozoários patogênicos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. estão entre os principais contaminantes associados à veiculação hídrica e seu monitoramento em águas de abastecimento público é determinado pela Portaria n. 2.914/2011, do Ministério da Saúde do Brasil. Este trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira, foi realizado um estudo da aplicabilidade do Método 1623 utilizando Filtar-Max® (FMx) e Método de Filtração em Membranas (FM). Cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram inoculados artificialmente em amostras de água bruta superficial proveniente do rio Atibaia, coletadas na cidade de Campinas/SP, Brasil, e agrupadas de acordo com faixas de turbidez. Cistos de *Giardia* spp. naturalmente presentes nas amostras foram detectados em todas as faixas de turbidez por ambos os métodos. O método de FM atendeu aos critérios de controle de qualidade analítica da USEPA em todas as faixas de turbidez. Não houve diferença estatística significativa entre os métodos de FMx e FM. Na segunda parte deste trabalho, foi feito um estudo da etapa de purificação por Separação Imunomagnética (IMS) no qual foi avaliado o desempenho dos procedimentos de dissociação: ácida e térmica; bem como investigado possíveis causas de perdas dos organismos-alvo durante execução desta etapa. A dissociação ácida apresentou maior média de eficiência de recuperação e precisão do que a dissociação térmica para cistos de *Giardia* spp.. Para oocistos de *Cryptosporidium* spp. não houve diferença estatística significativa. Após o procedimento de dissociação, tanto ácida quanto térmica, haviam cistos e oocistos aderidos às *beads* (micro-esferas magnéticas) que seriam descartadas de acordo com o protocolo padrão da IMS.

Palavras chave: Filtar-Max®, rio Atibaia, água bruta, turbidez da água, separação imunomagnética.

Abstract

The pathogenic protozoa *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. are some the major waterborne contaminants and their monitoring in water supply is determined in Decree no. 2.914/2011, the Brazil's Ministry of Health. This study was divided in two parts. In the first, a study was conducted to evaluate the applicability of two methods for concentration of pathogenic protozoa *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in water samples: Method 1623 using Filta-Max® (FMX) and Membrane Filtration (MF) Method. *Giardia* spp cysts and *Cryptosporidium* spp oocysts were artificially inoculated in samples of raw surface water from the Atibaia River, collected in Campinas/SP, Brazil, and grouped according to ranges of turbidity. *Giardia* spp. cysts naturally present in the samples were detected in all ranges of turbidity by both methods. The method of FM met the criteria for analytical quality control of USEPA in all ranges of turbidity. There was no statistically significant difference between the methods of FM and FMX. In the second part of this work, a study was made of the purification step by immunomagnetic separation (IMS) in which was evaluate the performance of the dissociation procedures: acid and heat, as well as investigating possible causes loss of target organisms during execution of this step. The acid dissociation showed higher mean recovery efficiency and accuracy than heat dissociation for *Giardia* spp.. For *Cryptosporidium* spp. difference was not statistically significant. After the dissociation procedure, both acid and heat, cysts and oocysts were still adhered to the beads (magnetic microspheres) that would be discarded, according to the standard protocol of IMS.

Key words: Filta-Max®, Atibaia river, raw water, water turbidity, immunomagnetic separation.

Sumário

Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
Lista de Figuras.....	XV
Lista de tabelas.....	XVI
Lista de abreviaturas e siglas.....	XVIII
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	9
2.1. Protozoários de Veiculação Hídrica.....	9
2.1.1. <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.	12
2.2. Métodos de detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. em água.....	17
2.3. Turbidez.....	26
2.4. Legislação brasileira para o controle e vigilância da água para consumo humano – Portaria n. 2.914/2011.....	28
3. Objetivos.....	31
4. Material e Métodos.....	33
4.1. Delineamento Experimental.....	33
4.2. Primeira Parte – Estudo da aplicabilidade dos métodos de detecção: Método 1623 e Método de Filtração em Membranas (FM).....	34
4.2.1. Experimentos.....	35
4.2.1.1. Método de Concentração - <i>IDEXX Filtar-Max</i> ® (FMx).....	37
4.2.1.2. Método de Concentração – Filtração em Membrana (FM).....	38

4.2.1.3.	Eficiência de Recuperação dos Métodos.....	39
4.2.1.4.	Experimentos Controle Negativo.....	39
4.2.1.5.	Análises físico-químicas.....	39
4.3.	Segunda parte: Estudo da etapa de purificação por Separação Imunomagnética (IMS) em amostras de água ultra pura.....	40
4.3.1.	Purificação – Separação Imunomagnética (IMS).....	41
4.3.1.1.	Dissociação Ácida.....	42
4.3.1.2.	Dissociação Térmica.....	42
4.4.	Visualização – microscopia de imunofluorescência.....	43
4.5.	Análises Estatísticas.....	44
5.	Resultados.....	47
Capítulo I: Aplicabilidade do Método 1623 e do Método de Filtração em Membranas, para a detecção de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de água bruta, considerando diferentes faixas de turbidez.....		
	Resumo.....	48
	Abstract.....	49
	1. Introdução.....	49
	2. Material e Métodos.....	51
	3. Resultados e Discussão.....	54
	4. Conclusões.....	58
	5. Referências Bibliográficas.....	58

Capítulo II: Immunomagnetic Separation applied to detection of <i>Giardia</i> spp. cysts and <i>Cryptosporidium</i> spp. oocysts in water samples: comparison between acid dissociation and heat dissociation using Method 1623.....	61
Abstract.....	61
Resumo.....	61
1. Introduction.....	62
2. Material and Methods.....	64
3. Results and Discussion.....	66
4. Conclusion.....	72
5. References.....	73
6. Considerações Finais.....	75
7. Referências Bibliográficas.....	79
8. Anexo: Portaria n. 2.914/2011 – Ministério da Saúde.....	87

“Se não puder voar, corra.

Se não puder correr, ande.

Se não puder andar, rasteje,

mas continue em frente de qualquer jeito.”

Martin Luther King Jr.

Dedico este trabalho à minha família, que foi quem sempre esteve presente mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

À Sanasa, representada pelo Gerente Eng. Vladimir José Pastore, que permitiu e apoiou este trabalho em parceria com a UNICAMP;

À CAPES, que me concedeu bolsa de estudos durante o primeiro ano do mestrado;

À ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, que me apoiou e patrocinou em vários eventos científicos de grande importância para minha formação;

À Luciana, pesquisadora da UNICAMP e companheira, que sempre contribuiu muito com opiniões enriquecedoras durante todo o trabalho, inclusive no Exame Prévio;

À UNICAMP, minha “casa”, onde pude aprender muito, e crescer profissional e pessoalmente desde 2006, quando ingressei na graduação;

Às professoras, Dra. Ana Guaraldo e Dra. Eliana Magalhães, que fizeram parte do Exame de qualificação e deram importantes contribuições para o trabalho;

Ao professor Tuca da Faculdade de Engenharia Civil, que contribuiu com ensinamentos novos e diferenciados durante o Exame Prévio;

À Professora Dra. Silmara, que fez parte de vários momentos da minha trajetória durante a pós- graduação, como no Exame de Qualificação, Exame Prévio e Banca Final, e contribuiu de maneira significativa para com a dissertação;

À pesquisadora Dra. Neliane do ITAL, pela rica contribuição e participação na Banca Final;

Aos colegas de laboratório da Sanasa, Alê e Júnior, pelos ensinamentos quando eu era estagiário, pelos momentos de descontração, pelos ótimos cafés-da-manhã promovidos pela Sra. Mãe do Alê; e ao Andrey, parceiro de laboratório na Sanasa;

À “grande” família, que é sempre muito presente, e que com toda certeza, cada pessoa tem sua importância;

Incluo aqui também a família Marin Stahl, pelo carinho, presença e pelos vários ótimos momentos. Em especial, à Fátima (sogrinha), pelo apoio e contribuição para o começo de toda essa história, quando iniciei meu estágio na Sanasa.

Ao Romeu, orientador e amigo, por todos os ensinamentos desde o início do estágio, por todas as discussões (discussões mesmo) que foram muito produtivas e fundamentais para minha formação; por todos os momentos de alegria, descontração, e trabalho... muito trabalho. Mas acima de tudo, pela amizade, que é tão importante quanto ou mais, do que todo o trabalho construído.

Aos meus pais, 'Wirso' e 'Rose', meus "orientadores da vida", que vão além do significado de serem pais. Estar sempre presente é pouco para eles, que simplesmente mostram o que é o verdadeiro amor incondicional. Meu muito obrigado, pai e mãe... Amo muito vocês!

Ao Rodrigo (Jow), meu irmão, meu brother mesmo. Pela amizade, companheirismo, pelos infinitos momentos inesquecíveis. Pelo exemplo de pessoa que acredita e luta pelos seus mais sinceros sonhos...e alcança. Não, isso não acontece só nos filmes. Vou me ater a escrever isso... O restante não caberia. Jow, muito obrigado. Te amo!

À Ju, minha namorada, amiga, parceira de todas as horas com quem compartilho minhas maiores conquistas e as dificuldades, também. Quem sempre esteve presente, me ajudando desde o início, seja em Campinas, Brasília, Curitiba ou qualquer lugar. Lá estava ela, sempre junto! Ju, muito obrigado. Amo você!

Por fim e acima de tudo à DEUS, que sempre mostrou-se presente em cada momento da minha vida

Lista de figuras

Figura 1: Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) do Estado de São Paulo.....	1
Figura 2: Bacia hidrográfica dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí (PCJ).....	2
Figura 3: Local de coleta das amostras de água bruta na ETA da Sanasa.....	33
Figura 4: Estação de Tratamento de Água (ETA) da Sanasa.....	34
Figura 5: Delineamento experimental da primeira parte: Estudo da aplicabilidade dos métodos de detecção de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp por Filta-Max (FMx) e Filtração em Membranas (FM).....	36
Figura 6: Delineamento experimental da segunda parte: Estudo da etapa de purificação por separação imunomagnética (IMS) em amostras de água ultra-pura (Milli-Q®).....	43

Capítulo II

Figure 1: <i>Giardia</i> spp. cysts (magnification 600X) present in the beads remaining attached to the magnet (MPC-S), after imunofluorescence assay. Some of beads present in the visual field were artificially marked on photo (red circles) for better viewing.....	71
--	----

Lista de tabelas

Tabela 1: Espécies de <i>Cryptosporidium</i> aceitas e infectividade para o ser humano.....	13
Tabela 2: Espécies e genótipos do gênero <i>Giardia</i>	17
Tabela 3: Valores dos critérios de aceitação do CQA para o Método 1623 e para o Método 1623.1.	25

Capítulo I

Tabela 1: Período de coleta, cor, pH e média de turbidez das amostras coletadas, de acordo com as faixas de turbidez estudadas.....	54
Tabela 2: Média e desvio padrão da concentração de cistos de <i>Giardia</i> spp. em amostras de água bruta do rio Atibaia, detectados por FM e FMx nas faixas de turbidez estudadas.....	55
Tabela 3: Média e desvio padrão da concentração de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de água bruta do rio Atibaia, detectados por FM e FMx nas faixas de turbidez estudadas.....	55
Tabela 4: Média da eficiência de recuperação (%) e desvio padrão de cistos de <i>Giardia</i> spp. por FM e FMx em amostras de água bruta do rio Atibaia inoculadas com Color Seed™, nas faixas de turbidez estudadas.....	57
Tabela 5: Média da eficiência de recuperação (%) e desvio padrão de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. por FM e FMx em amostras de água bruta do rio Atibaia inoculadas com Color Seed™, nas faixas de turbidez estudadas.....	57

Capítulo II

Table 1: Quality Control (QC) acceptance criteria for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in water samples, according to the Method 1623.1.....67

Table 2: Quality Control (QC) acceptance criteria for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in water samples, according to the Method 1623.....67

Table 3: Mean of recovery efficiency and Relative Standard Deviation (RSD) for *Cryptosporidium* spp. oocysts, with either acid or heat dissociation in the IMS purification phase in reagent water artificially inoculated with Easy Seed®.....68

Table 4: Mean of recovery efficiency (%) for *Cryptosporidium* spp. oocysts of the first and second dissociation reaction, using both acid or heat dissociation in the purification IMS phase in reagent water artificially inoculated with Easy Seed®.....68

Table 5: Mean of recovery efficiency (%) for *Giardia* spp. cysts, using acid or heat dissociation in the IMS purification phase in reagent water artificially inoculated with Easy Seed®.....69

Table 6: Mean of recovery efficiency (%) for *Giardia* spp. cysts of the first and second dissociation reactions, using, acid or heat dissociation in the IMS purification phase in reagent water artificially inoculated with Easy Seed®.....69

Lista de abreviaturas e siglas

ANA – Agência Nacional das Águas

CDC – Center for Disease Control and Prevention (Centro para Controle e Prevenção de Doenças)

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CFU – Colony-forming Units (Unidades Formadoras de Colônia)

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CQA – Controle de Qualidade Analítica

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

DAPI – 4',6-diamidine-2-phenylindole

DIC – Diferencial Interference Contrast (Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial)

DP – Desvio Padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

ETA – Estação de Tratamento de Água

EUA – Estados Unidos da América

FCC – Floculação em Carbonato de Cálcio

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FM – Filtração em Membranas

FMx – Método 1623 utilizando Filta-Max®

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

HCl – ácido clorídrico

ICTEM – Índice de Coleta e Tratabilidade de Esgoto da População Urbana de Municípios

IMS – Immunomagnetic Separation (Separação Imunomagnética)

IPR – Initial Precision and Recovery (Precisão Inicial e Recuperação)

MS – Ministério da Saúde

NaOH – Hidróxido de sódio

NTU – Nephelometric Turbidity Units (Unidades Nefelométricas de Turbidez)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBST – Phosphate Buffered Saline Tween (Solução tampão fosfato-salino com Tween)

PCFC – Portable Continuous Flow Centrifugation

PCJ – Piracicaba, Capivari e Jundiaí

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia Polimerase)

PIB – Produto Interno Bruto

RID – Reação de Imunofluorescência Direta

RSD – Relative Standard Deviation (Desvio Padrão Relativo)

SAA – Sistema de Abastecimento de Água

SAC – Solução Alternativa Coletiva

SANASA – Sociedade Abastecimento de Água e Saneamento S/A

SUS – Sistema Único de Saúde

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UGRHI – Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

USEPA – United States Environmental Protection Agency (Agência de proteção Ambiental dos Estados Unidos)

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

1. Introdução

O Estado de São Paulo possui a hidrografia organizada por vinte e duas Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI). Trata-se de um modelo de gestão dos recursos hídricos que visa à preservação, conservação e recuperação dos mesmos. Assim, cada uma das bacias hidrográficas deste estado é classificada em uma dessas UGRHI (CETESB, 2009 e 2012).



Figura 1: Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo. A seta indica a 5ª UGRHI, referente à Bacia PCJ. Fonte: Matsumura-Tundisi et al., 2011.

A bacia hidrográfica dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí (Bacia PCJ) pertence à 5ª UGRHI do Estado de São Paulo e abrange área de 58 municípios, totalizando aproximadamente cinco milhões de habitantes. O município de Campinas/SP está inserido nesta bacia hidrográfica, que representa uma das regiões mais importantes do Brasil devido

ao seu desenvolvimento econômico, que representa cerca de 7% do PIB Nacional, e ao seu grau de urbanização, que atingirá 96,8% no ano de 2020, segundo Consórcio PCJ (2012).



Figura 2: Bacia hidrográfica dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá (PCJ). A seta indica a curso do rio Atibaia na bacia PCJ. Fonte: Agência Nacional das Águas (ANA).

O rio Atibaia pertence à bacia PCJ (Figura 2) e apresenta vital importância para a cidade de Campinas, uma vez que é responsável pelo fornecimento de 94% da água destinada ao consumo humano desta cidade, que também é abastecida pelo rio Capivari. Este rio atravessa uma região urbanizada, com alta densidade populacional e apresenta como finalidade preponderante para o homem, o abastecimento público (CETESB, 2012).

Em Campinas, a Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA) é uma autarquia da prefeitura do município e responsável pelas atividades de saneamento como a captação, o tratamento e a distribuição de água para consumo humano, bem como a coleta, o afastamento e o tratamento de efluentes domésticos. Atualmente,

Campinas conta com 1,09 milhões de habitantes, sendo que destes, 99% são abastecidos com água tratada e, 88% atendidos com coleta de esgoto doméstico (SANASA, 2013).

O controle da qualidade da água destinada ao consumo humano em Campinas é realizado pela Sanasa, que segue as determinações previstas pela Portaria nº 2.914/2011 (BRASIL, 2011), do Ministério da Saúde (MS) – legislação vigente que dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (SANASA, 2013).

Quanto à qualidade da água bruta captada do rio Atibaia, na cidade de Campinas, este rio se enquadra na classe 2, de acordo com os critérios estabelecidos na Resolução N. 357 do Conama - Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005). Esta resolução dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes (SANASA, 2013).

Vale ressaltar que o lançamento de efluentes não tratados ou parcialmente tratados representa a principal causa de contaminação e deterioração dos corpos hídricos no Estado de São Paulo. A redução da qualidade das águas dos rios, reservatórios, estuários e costeiras restringe seu uso e contribui para o aumento da ocorrência de doenças de veiculação hídrica, ou seja, causadas pelo contato ou pela ingestão de água contaminada com organismos patogênicos (CETESB, 2012).

Os esforços da Sanasa contribuem para que Campinas atinja a capacidade instalada de tratamento de esgoto de até 80% de tratamento do esgoto produzido na cidade (SANASA, 2013). No entanto, do total de esgoto produzido por toda a Bacia PCJ, apenas 53% é tratado. O Índice de Coleta e Tratabilidade de Esgoto da População Urbana de

Municípios (ICTEM) da Bacia PCJ é de 5,31, abaixo da média estadual de São Paulo (5,49) e de regiões como a UGRHI Sapucaí/Grande (9,81), Aguapeí (9,66), São José dos Dourados (8,39) e outras. O ICTEM destaca o desempenho do sistema de tratamento de esgoto dos municípios levando em consideração o percentual de coleta e de tratamento de esgoto (CETESB, 2012).

Dessa maneira, inserido na Bacia PCJ, o rio Atibaia encontra-se impactado pelas descargas de esgotos domésticos e industriais e por sistemas de tratamento de esgoto ineficientes (CETESB, 2009 e 2012). Estudos científicos desenvolvidos por instituições de pesquisa como a Unicamp, Companhias de Saneamento como a Sanasa, e pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) confirmam a deterioração das águas deste manancial (CANTUSIO-NETO e FRANCO, 2004; FRANCO et al., 2012b; CETESB, 2012; SATO et al., 2013).

Esta deterioração é comprovada pelos indicadores de contaminação fecal como os micro-organismos *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*. O primeiro micro-organismo é bacilar, Gram-negativo, aeróbio ou anaeróbio facultativo, pertencente à família das Enterobacteriaceae e constituinte da microbiota normal do intestino do ser humano e outros animais de sangue quente. Em microbiologia ambiental é utilizado como o principal indicador microbiológico de contaminação fecal em águas. O segundo micro-organismo possui formato de bastão, Gram-positivo, anaeróbico e formador de esporos. Em microbiologia ambiental é utilizado como indicador de contaminação fecal remota em águas, já que seus esporos apresentam grande resistência a fatores ambientais adversos (SILVA et al., 2010; JUNQUEIRA et al., 2012; SANASA, 2013).

Diante disso, a presença de esporos de *C. perfringens* em amostras de água pode ser correlacionada com a presença de cistos e oocistos de protozoários patogênicos de origem fecal, como *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., já que também são bastante resistentes a fatores ambientais adversos (CANTUSIO-NETO et al., 2010; JUNQUEIRA et al., 2012; CETESB, 2012; SANASA, 2013).

Estes protozoários estão entre os principais contaminantes associados à veiculação hídrica e causam grande preocupação para a saúde pública e autoridades sanitárias. Ambos são comumente encontrados em mananciais de captação de água destinada ao consumo humano e juntos, foram responsáveis por 95,5% dos surtos de veiculação hídrica causados por protozoários, reportados no período de 2004 a 2010 (CANTUSIO-NETO et al., 2010; ARAÚJO et al., 2011; BALDURSSON e KARANIS, 2011).

Diante da significativa relevância destes patógenos no cenário mundial de saúde pública, diversos países possuem, em suas legislações aplicadas ao controle e vigilância da qualidade da água, determinações quanto ao monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas destinadas ao consumo humano.

No Brasil, foi publicada pelo Ministério da Saúde em 12 de dezembro de 2011, a Portaria n. 2.914. Esta legislação revisa e substitui a versão anterior, a Portaria n. 518 de 2004 (BRASIL, 2004), e determina o monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos pontos de captação de água destinada ao consumo humano quando a concentração de *E. coli* for superior a 1000 UFC /100mL. Esta nova versão representa um avanço com relação à detecção de protozoários e seus métodos analíticos (BRASIL, 2011).

Atualmente, os métodos de detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras hídricas contemplam basicamente três etapas: i) concentração da amostra; ii) purificação da amostra pela Separação Imunomagnética (IMS) ou métodos convencionais e; iii) visualização e quantificação dos organismos alvo (FRANCO, 2007; CANTUSIO-NETO et al., 2010; USEPA, 2012).

O método de referência internacional para detecção destes patógenos em amostras hídricas, preconizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) é o Método 1623.1 (USEPA, 2012), versão atualizada do Método 1623 (USEPA, 2005).

Com relação à primeira etapa, de concentração da amostra, de acordo com o Método 1623.1 há três opções de filtro descritas tanto para o uso com água bruta quanto para o de água tratada: Envirochek® HV, Filta-Max® e PCFC (fluxo-concentração). Também são consideradas para a etapa de concentração opções alternativas a estas descritas no Método 1623.1. Dentre elas estão: Método de Filtração em Membranas (FM) (FRANCO; CANTUSIO NETO; BRANCO, 2001) e Método de Floculação em Carbonato de Cálcio (FCC) (VESEY et al., 1993).

Na segunda etapa, a Separação Imunomagnética (IMS) promove a purificação da amostra, mediante o uso do Kit Dynabeads® GC Combo, que permite separar os organismos-alvo de sujidades presentes nas amostras. Desta forma, facilita a etapa de visualização com a redução de falso-positivos, contribuindo para eficácia do método (QUINTERO-BETANCOURT; PEELE; ROSE, 2002; CANTUSIO-NETO, 2011).

A IMS consiste na separação seletiva dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. do restante da amostra. Para isso, utiliza-se de esferas microscópicas, uniformes e paramagnéticas denominadas *beads*, que são recobertas com anticorpos

purificados contra cistos (*beads* anti-*Giardia*) e oocistos (*beads* anti-*Crypto*) (CANTUSIO et al., 2010). Então, por meio de uma reação antígeno-anticorpo formam-se complexos *bead*-cisto e *bead*-oocisto, que posteriormente são dissociados por reação em meio ácido - dissociação ácida, ou por calor - dissociação térmica (USEPA, 2005; USEPA, 2012; WARE et al., 2003).

Por fim, a terceira etapa consiste na visualização e quantificação dos organismos alvo com o microscópio de epifluorescência, mediante Reação de Imunofluorescência Direta (RID), com posterior confirmação da morfologia pelo teste de coloração com 4',6-*diamidine-2-phenylindole* (DAPI), e microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (USEPA, 2012).

Assim, diante da importância do monitoramento dos protozoários patogênicos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em águas destinadas ao consumo humano, este trabalho propôs a avaliação da aplicabilidade de dois diferentes métodos de detecção de cistos e oocistos em amostras hídricas, levando em consideração características inerentes à matriz analisada, como a variação de turbidez. Além disso, foram realizados também, estudos da etapa de purificação pela Separação Imunomagnética (IMS), visando avaliar o desempenho das dissociações, ácida e térmica, bem como investigar possíveis perdas dos organismos-alvo na execução da IMS.

2. Revisão de literatura

2.1. Protozoários de veiculação hídrica

Doenças causadas por patógenos de veiculação hídrica ocorrem em todo o mundo causando grande preocupação às autoridades sanitárias. Dados globais do ‘Instituto Trata Brasil’ apontam que cerca de cinco mil crianças morrem diariamente, por conta de doenças diarreicas causadas pela falta de acesso à água de qualidade e de coleta e tratamento de esgoto (INSTITUTO TRATA BRASIL, 2010).

Uma vez contaminada, a água atua como uma eficiente veiculadora de patógenos em razão de sua grande capacidade de dispersão, do uso abrangente e consumo obrigatório (REBOUÇAS; BRAGA; TUDISI et al., 2002).

Dentre os diversos agentes patogênicos veiculados pela água, protozoário e vírus vêm se tornando os mais preocupantes, uma vez que são bastante resistentes às condições ambientais adversas e capazes de causar infecções mesmo com baixas doses infectantes (GALE e STANFIELD, 2000; FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012a).

Os protozoários parasitas de veiculação hídrica estão amplamente distribuídos pelo mundo e as doenças causadas por eles representam impactos em saúde pública, saúde ambiental e também na economia dos países afetados. Estes parasitas são uma das principais causas para os 4 bilhões de casos de diarreia que causam 1,6 milhões de mortes por ano (BALDURSSON e KARANIS, 2011).

Dentre os diversos protozoários patogênicos transmitidos pela água, os principais são *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., responsáveis por 60,3% e 35,2%, respectivamente, dos surtos de veiculação hídrica causados por protozoários no período de 2004 a 2010 em todo o mundo, segundo Baldursson e Karanis (2011). Outros protozoários

parasitas com relevância em transmissão hídrica são: *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba* spp., *Cyclospora cayetanensis*, Microsporidia, *Isospora*, *Blastocystis hominis*, *Sarcocystis* spp., *Naegleria* spp. e *Balantidium coli*. (BALDURSSON E KARANIS, 2011).

Apesar do destaque epidemiológico mundial de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., não há notificado no Brasil nenhum surto de veiculação hídrica causado por estes protozoários. Os pesquisadores atribuem esta ausência a fatores clínicos, como a negligência da criptosporidiose e da giardiose, a não obrigatoriedade de exames clínicos para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* na rotina parasitológica quando avaliada gastroenterites, e a fatores ambientais, como a complexidade dos métodos de detecção em amostras ambientais, necessidade de recursos humanos treinados e alto custo de implementação e operação destes métodos.

No entanto, há no Brasil três casos notificados de surtos de veiculação hídrica causados por outros protozoários. O primeiro surto ocorreu no município de General Salgado/SP, no período de setembro a dezembro de 2000 e foi causado por *Cyclospora cayetanensis* (EDUARDO et al., 2008); o segundo surto, também causado pelo mesmo protozoário, ocorreu na cidade de Antonina/PR, em novembro de 2001 (FUNASA, 2002a); e o terceiro surto, causado pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, ocorreu em Santa Isabel do Ivaí/PR, no período de novembro de 2001 a janeiro de 2002 (FUNASA, 2002b).

O patógeno *Cyclospora cayetanensis* é um parasita coccídio que causa a ciclosporiase que, nas infecções sintomáticas, causa diarreia. Trata-se de um patógeno resistente ao cloro e outros desinfetantes usualmente utilizados para eliminar bactérias e vírus em sistemas de tratamento de água (CVE, 2000; CDC, 2013a).

O surto de ciclosporiase ocorrido em General Salgado/SP estava associado ao sistema de abastecimento público de água da cidade que era composto por quinze poços artesianos com infiltração de águas pluviais e esgotos, e ao tratamento da água que consistia apenas na cloração e fluoretação da mesma. Foram identificados 350 casos e para controlar o surto e eliminar a fonte de transmissão de *C. cayetanensis*, foram necessárias mudanças importantes, como: melhorias no sistema de abastecimento público de água, assim como na coleta e tratamento de esgoto; medidas educativas, monitoramento da diarreia aguda; testes laboratoriais de todos os novos casos de diarreia; e controle da qualidade da água, durante e após a reconstrução dos sistemas (EDUARDO et al., 2008).

O surto de ciclosporiase ocorrido na cidade de Antonina/PR também foi causado pela ingestão de água contaminada por *C. cayetanensis*. Foram notificados mais de 600 casos de diarreia em uma semana com sinais e sintomas condizentes aos de ciclosporiase. A cidade de Antonina/PR, no ano de 2000, possuía um sistema de abastecimento de água que utilizava apenas cloração. O mesmo apresentava rede de distribuição antiga, com mais de 50 anos, e de ferro fundido, o que contribuiu para o rompimento dos canos de distribuição. Dentre as medidas adotadas após o surto, foi recomendado que a população fervesse a água utilizada para o consumo, além de inserida as etapas de coagulação e floculação no tratamento da água, bem como a substituição da rede de distribuição do sistema público de abastecimento de água (FUNASA, 2002a).

O patógeno *Toxoplasma gondii* é um protozoário coccídio intracelular, próprio dos gatos, pertencente à família Sarcocystidae. A toxoplasmose é geralmente assintomática, mas quando apresentada em sua forma branda a moderada, provoca sintomas semelhantes aos causados por gripe, e na forma severa pode causar lesões nos olhos e cérebro. Em

crianças infectadas durante a gravidez pode causar retardo mental, cegueira e anormalidades físicas (DUBEY e JONES, 2008).

O único surto de toxoplasmose documentado no Brasil ocorreu em Santa Isabel do Ivaí/PR. No período de novembro de 2001 a janeiro de 2002, aproximadamente 600 pessoas apresentaram sintomas compatíveis com os de toxoplasmose e 426 apresentaram sorologia sugestiva de infecção aguda por *T. gondii*. A partir disso, foram realizados mapeamento dos casos, estudos epidemiológicos, laboratoriais e ambientais (MOURA et al., 2006).

Dentre os pacientes com sintomas, 290 foram confirmados com toxoplasmose. As investigações associaram os casos de toxoplasmose, principalmente, ao consumo de água de um determinado reservatório, já que inspeções evidenciaram infiltrações e vazamentos no mesmo, além da presença de felinos com sorologia reatora para toxoplasmose, que habitavam o interior da casa de máquina. Quanto à origem da água, era proveniente de poço, não havia filtração e a cloração era inadequada. Este surto registrado no Brasil constituiu o maior surto de toxoplasmose relatado do mundo, superando em número de casos detectados o surto ocorrido na cidade canadense de British Columbia, considerado até então, o maior surto da doença com 100 casos registrados (FUNASA, 2002b).

2.1.1. *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

O protozoário *Cryptosporidium* spp. é considerado um dos principais contaminantes biológicos da água (ROSE; HUFFMAN; GENNACARO, 2002). *Giardia* spp. é, por sua vez, um dos patógenos relatados com maior frequência em águas de recreação, além das águas destinadas ao consumo humano (CRAUN, G; CALDERON; CRAUN, M, 2005; SCHUSTER et al., 2005, FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012a).

A transmissão hídrica é o principal meio de dispersão destes organismos já que a abundância no ambiente e o pequeno tamanho dos cistos e oocistos (formas de resistência e transmissão) os tornam potencialmente capazes de atravessar as barreiras físicas das estações de tratamento de água. Essas características somadas à resistência aos desinfetantes químicos usualmente utilizados nestas estações, bem como à baixa dose infectante (9 a 1042 oocistos de *Cryptosporidium* spp. e 10 a 25 cistos de *Giardia* spp.) são fatores que contribuem para a ocorrência dos surtos de criptosporidiose e giardiose documentados (OKHUYSEN e CHAPPELL, 2002; KATZ et al., 2006; SANTOS et al., 2013).

Cryptosporidium spp. é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, classe Coccidea e ordem Eimeriidae. Trata-se de um parasita intracelular intestinal que infecta diversas espécies animais, como: aves, cães, gatos, roedores, répteis, ovinos, bovinos, entre outros (CVE, 2002). Nos últimos anos, novas espécies pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* foram descritas, inclusive outras espécies zoonóticas que exibem potencial infectante para o homem, conforme tabela 1.

Tabela 1: Espécies de *Cryptosporidium* aceitas e infectividade para o ser humano.

Espécie	Hospedeiro Principal	Infeccioso para o ser humano	Tamanho dos oocistos (µm)	Referência
1. <i>C. hominis</i>	Homem	Sim	4,5 x 5,4	Morgan-Ryan et al., 2002
2. <i>C. parvum</i>	Ruminantes	Sim	4,5 x 5,5	Tyzzar, 1912
3. <i>C. andersoni</i>	Bovinos	Sim	5,5 x 7,4	Lyndsay et al., 2000
4. <i>C. muris</i>	Roedores	Sim	5,6 x 7,4	Tyzzar, 1907
5. <i>C. suis</i>	Suínos	Sim	4,4 x 4,9	Ryan et al., 2007

6. <i>C. felis</i>	Felinos	Sim	4,5 x 5,0	Iseky, 1979
7. <i>C. canis</i>	Canídeos	Sim	3,68 x 5,88	Fayer et al., 2001; Pedraza-Díaz et al., 2001
8. <i>C. bovis</i>	Bovinos	-	4,63 x 4,89	Fayer et al., 2005
9. <i>C. ryanae</i>	Bovinos	-	3,16 x 3,73	Fayer et al., 2008
10. <i>C. Xiaoi</i>	Ovelhas	-	2,94 x 3,44	Fayer & Santin, 2009
11. <i>C. wairi</i>	Cobaíes	-	4,0 x 4,8	Valterling et al., 1971
12. <i>C. baileyi</i>	Aves	Sim	5,2 x 6,3	Current et al., 1986
13. <i>C. meleagridis</i>	Aves	Sim	4,5 x 4,6	Slavin, 1955
14. <i>C. gali</i>	Aves	-	6,2 x 8,5	Ryan et al., 2003
15. <i>C. serpentis</i>	Répteis	-	4,8 x 5,6	Levine, 1980
16. <i>C. fayeri</i>	Cangurus	-	4,3 x 4,9	Ryan et al., 2008
17. <i>C. macropodum</i>	Cangurus	-	4,9 x 5,1	Power & Ryan, 2008
18. <i>C. varanii</i>	Lagartos	-	4,7 x 4,8	Pavlassek & Ryan, 2008
19. <i>C. ubiquitum</i>	Cervos	Sim	5,04 x 4,66	Fayer et al., 2010
20. <i>C. cuniculus</i>	Coelhos	Sim	5,98 x 5,38	Robinson et al., 2010
21. <i>C. fragile</i>	sapo	-	6.2 x 5.5	-
22. <i>C. molnari</i>	peixe	-	4,7 x 4,5	Sitja - Bobadilla, A. et al., 2005
23. <i>C. scophthalmi</i>	peixe	-	4,4 x 3,9	Alvarez-Pellitero, et al., 2009

24. <i>C. scrofarum</i>	suínos	Sim	5,2 x 4,8	Neřmejč et al.,2013
25. <i>C. tyzzeri</i>	rato	Sim	4,6 x 4,2	Ren, et al., 2012; Raskova´ et al.,2013
26. <i>C. viatorum</i>	Homem	Sim	5,4 x 4,7	Elwin et al.,2012; Insulander et al.,2012

Fonte: Franco; Branco; Leal., 2012a.; Chalmers e Katzer, 2013.

O *Cryptosporidium* spp. é conhecido como um dos maiores causadores de doenças transmitidas por água nos Estados Unidos, podendo também ser encontrado no solo, alimentos e superfícies contaminadas por fezes. A forma infectante é o oocisto, que possui uma camada protetora que o permite sobreviver fora do hospedeiro por muito tempo, além de protegê-lo contra a desinfecção (CDC, 2013).

Em países em desenvolvimento, estima-se que 250-500 milhões de casos de criptosporidiose ocorram por ano, contribuindo significativamente para elevação da mortalidade infantil. A doença, transmitida pela rota fecal-oral, pode ser assintomática em imunocompetentes, mas geralmente, causa diarréia, dor abdominal e náuseas moderada . Já em indivíduos imunodeficientes a doença pode se manifestar de forma mais severa, crônica e às vezes fatal (WU et al., 2012; CDC, 2013).

Em países desenvolvidos inúmeros surtos associados à contaminação de água para consumo humano têm sido reportados, como no Reino Unido, Austrália e Suécia (WU et al., 2012). O mais grave e mais conhecido foi o surto de Milwaukee em 1993 (MACKENZIE et al., 1994).

Giardia duodenalis (sinonímia *Giardia lamblia* e *Giardia intestinalis*) é um protozoário parasita flagelado que se reproduz no intestino delgado causando giardiose.

Trata-se de um patógeno cosmopolita capaz de infectar uma ampla gama de hospedeiros, incluindo animais domésticos, selvagens e também o ser humano. A transmissão deste patógeno ocorre por meio da rota fecal-oral e pode resultar em uma infecção assintomática, ou causar sintomas como diarreia, mal estar, flatulência, esteatorreia, dores abdominais, náusea, anorexia e perda de massa corporal (CANTEY et al., 2011).

Giardia duodenalis é um dos principais causadores de doenças diarreicas no mundo. Nos Estados Unidos, *Giardia* é detectada em 4% - 7% das amostras de fezes oriundas de pacientes com diarreia. Apesar de aproximadamente 20.000 infecções causadas por *Giardia* serem reportadas ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) no período de 2006 a 2008, estima-se que o número real de infecções anuais chegue a 1,3 milhões.

De acordo com antiga sistemática, baseada na morfologia, *Giardia* pertence ao filo Sarcomastigophora, Sub-filo Mastigophora (Flagellata), Classe Zoomastigophora, Ordem Diplomonadida a Família Hexamitidae (MORRISON et al., 2007). Já segundo a nova sistemática, baseada na genética e dados bioquímicos e estruturais, *Giardia* pertence ao Filo Metamonada, Sub-filo Trichozoa, Superclasse Eopharyngia, Classe Trepomonadea, Subclasse Diplozoa, Ordem Giardiida e Família Giardiidae (PLUTZER; ONGERTH; KARANIS, 2010).

Entre as espécies de *Giardia* (tabela 2), somente *Giardia duodenalis* é capaz de infectar o ser humano. Com o advento da biologia molecular foi possível confirmar o caráter zoonótico de *Giardia duodenalis*. O parasito apresenta grande diversidade genética, considerado um complexo de espécies, subdividido em sete genótipos ou assembléias, conforme tabela 2.

Tabela 2: Espécies e genótipos do gênero *Giardia*.

Espécie	Genótipo	Hospedeiros Principais	Tamanho dos cistos (µm)	Referências
<i>Giardia duodenalis</i> (<i>G. lamblia</i> e <i>G. intestinalis</i>)	A	Humanos e outros primatas, canídeos, felinos, bovinos, roedores, animais silvestres	12-15 x 6-8	Homan et al., 1992; Mayrhofer et al., 1995
	B	Humanos e outros primatas, canídeos, animais silvestres	12-15 x 6-8	Homan et al., 1992; Mayrhofer et al., 1995
	C	Canídeos	12-15 x 6-8	Meloni & Thompson, 1987
	D	Canídeos	12-15 x 6-8	Monis et al., 1998
	E	Bovinos e animais de pastoreio	12-15 x 6-8	Ey et al., 1997
	F	Felinos	12-15 x 6-8	Monis et al., 1999
	G	Roedores	12-15 x 6-8	Monis et al., 1999
<i>G. agilis</i>	-	Anfíbios	20-30 x 4-5	Kunstler, 1882
<i>G. muris</i>	-	Roedores, aves e répteis	9-12 x 5-7	Grassi, 1879
<i>G. psittaci</i>	-	Aves	14 x 6,0	Erlandesen & Bemrich, 1987
<i>G. ardeae</i>	-	Aves	10 x 6,5	Erlandesen et al., 1990
<i>G. microti</i>	-	Roedores	12-15 x 6-8	Feely, 1988

Fonte: Franco; Branco; Leal, 2012a.

2.2. Métodos de detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp em água.

O monitoramento de protozoários em águas é realizado em países como Estados Unidos (*Drinking Water Standard and Health Advisories* - USEPA), Inglaterra (*Drinking Water Inspectorate*), Austrália (*Drinking Water Guidelines*) e outros. Os dados obtidos

empregando o método “ICR – Information Collection Rule - *Protozoan Method for detecting Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in water by fluorescent antibody procedure*” (USEPA, 1995) apresentavam muitas desvantagens, tais como: complexidade técnica, baixas taxas de recuperação, resultados falso-negativos e falso-positivos (CLANCY et al., 1999; ALLEN; CLANCY; RICE, 2000; FRANCO; CANTUSIO NETO; BRANCO, 2001; NHMRC , 2011; USEPA, 2012).

Em 1996, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) iniciou um programa com o objetivo específico de identificar métodos analíticos para o monitoramento de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de águas. Os métodos 1622 e 1623 (USEPA, 1998 e 1999) foram desenvolvidos em resposta a essa iniciativa (CANTUSIO-NETO, 2008).

A inclusão de novos procedimentos de filtração, como a utilização de cápsulas de filtração (Envirocheck®; Gelman Sciences) ou de eluição, como a separação imunomagnética (IMS) dos oocistos e cistos (Dynalbeads®; Dynal Technologies, Austrália), acarretou um aumento significativo da performance do Método 1623 (USEPA, 1999) com eficiência de recuperação de 19,5% a 54,5% (MCCUIN e CLANCY, 2003).

Os métodos de recuperação e detecção de protozoários na água envolvem três etapas : coleta e filtração da amostra de água com a finalidade de recuperar ou capturar os parasitas (cistos e oocistos); seguidas de eluição e purificação da amostra e, por fim, visualização e enumeração dos protozoários por microscopia de imunofluorescência (JAKUBOWSKI et al., 1996; USEPA, 1999 e 2005).

Os procedimentos iniciais para detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. incluíam filtração de grande volumes de água (1.000 L para água tratada e 100 L para água

bruta), e utilizavam filtros de cartucho de polipropileno de porosidade de 1 μ m. A eluição era conduzida com detergente e mediante a extração mecânica dos oocistos ou cistos a partir das fibras do filtro. Para a etapa de purificação, o líquido de eluição resultante era centrífugo-concentrado a 1.100 – 1.500 x g, com a finalidade de obter um pellet de até 5 mL, que era purificado utilizando-se sacarose ou Percoll- sacarose (com gravidade específica de 1,1) e visualização mediante Reação de Imunofluorescência Direta (RID).

Dentre as limitações apresentadas por esta metodologia, estavam: não fornecer informações sobre a espécie ou a infectividade das formas de resistência dos protozoários; resultados falsos positivos e negativos; grande variabilidade e baixa eficiência de recuperação, variando de 14,0% a 44,0% (MUSIAL et al., 1987; JAKUBOWISKI et al., 1996). A performance e sensibilidade do método dependia da presença ou concentração de fatores interferentes como turbidez, microalgas, argila e polímeros coagulantes usados nos processos de tratamento, como resíduos de ferro e alumínio (USEPA, 1995).

A técnica de Filtração em Membranas, empregada por Aldom e Chagla em 1995, foi desenvolvida, inicialmente, para detecção de oocistos e cistos em água tratada e, há algum tempo, este método também é considerado para determinação destas formas em água bruta. A amostra é filtrada utilizando-se bomba de vácuo e sistema porta-filtro e consiste na captura dos oocistos em membranas. Em seguida, o material é eluído a partir da superfície da membrana por: dissolução em acetona e etanol ou extração mecânica (mediante lavagem da membrana com solução Tween 80 a 0,01% e raspagem da mesma), considerando os diferentes protocolos. O material resultante é concentrado por dupla centrifugação (10 minutos a 1050 x g). Há variações desta metodologia nas quais se empregam membranas de

diferentes tamanhos: 293 mm (ONGERTH e STIBBS, 1987), 142 mm (DAWSON et al., 1993), e 47 mm (FRANCO; CANTUSIO NETO; BRANCO, 2001).

Segundo Carreno (2001) a influência do método de eluição diminui a infectividade a cada etapa na dissolução em acetona e, dependendo do método empregado para eluição, perdas são consideradas. A média de eficiência de recuperação varia de 25,5% a 70,5 % (DAWSON, 1993; ALDOM e CHAGLA, 1995).

A turbidez da água é o maior fator limitante desta técnica, pois pode ocorrer rápida obstrução da malha filtrante, com conseqüente redução do volume efetivamente filtrado e necessidade de substituição das membranas para filtrar todo o volume estipulado (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012a).

A técnica de floculação foi proposta como método de concentração de volumes de 10 L de água por precipitação e floculação química com carbonato de cálcio (VESEY et al., 1993). Em uma primeira etapa, são adicionadas soluções de cloreto de cálcio e bicarbonato de sódio aos volumes de até 10 L de amostra; a seguir, o pH é ajustado para 10,0 (com hidróxido de sódio) sendo a preparação mantida em repouso por um período de, no mínimo 4 horas ou “overnight” em temperatura ambiente. O precipitado é dissolvido com ácido sulfâmico, a suspensão obtida é centrifugada e analisada por reação de imunofluorescência.

Dentre as limitações inerentes a esta metodologia, estão: a possibilidade de ocorrência de resultados falso-positivos ou negativos, já que o sedimento resultante é extremamente rico em material particulado, interferindo na reação de imunofluorescência; além disso, as variações nas concentrações dos reagentes e do pH causam uma diminuição do número de organismos floculados. O emprego de outros agentes floculantes acarreta redução da fluorescência dos cistos e oocistos ou aumento da fluorescência residual. Vale

lembrar que a manipulação de reagentes ácidos e bases fortes requerem cuidado laboratorial (CANTUSIO-NETO, 2008; FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012 a).

Esta técnica também não fornece informações sobre a espécie ou infectividade e não se aplica a amostras com baixa turbidez. A eficiência de recuperação está entre 30,0% a 40,0% (FRICKER e CRABB, 1998; FRANCO, CANTUSIO NETO; BRANCO, 2001; CANTUSIO-NETO, 2004).

Em 2010, Cantusio Neto e colaboradores avaliaram os métodos de floculação em carbonato de cálcio, proposto por Vesey (1993) e de filtração em membranas, proposto por Franco; Cantusio Neto e Branco (2001), aplicando ou não a etapa de purificação por separação imunomagnética (IMS). A filtração em membranas apresentou maior eficiência de recuperação nas amostras de água ultra pura inoculadas com Easy Seed®. Nos ensaios com amostras de água bruta, inoculados artificialmente com Color Seed®, houve pequena redução na eficiência de recuperação dos organismos. Os autores concluíram que as características microbiológicas e físico-químicas das amostras, principalmente variações de pH e turbidez, acarretam grande variabilidade na recuperação.

O desempenho para cada método utilizado, principalmente para águas brutas superficiais, é afetado por vários fatores que impõem limitações como: não fornecer informações sobre espécie ou infectividade; sofrer interferência direta da turbidez da água implicando no volume a ser filtrado; e ser influenciado pelo teor de íons de ferro que são comumente encontrados nas amostras hídricas devido à adição de flocculantes utilizados nos sistemas de tratamento (etapa de coagulação), conforme Cantusio-Neto (2008).

Com intuito de promover melhorias na detecção dos protozoários em águas, o Método 1622 representou um grande avanço em relação aos métodos então existentes por

incluir uma etapa de purificação que emprega a separação imunomagnética (IMS), ao invés de procedimentos convencionais de purificação.

A purificação por separação imunomagnética (IMS) promove a separação seletiva dos cistos e oocistos do restante da amostra. Após a filtração da amostra de água em cápsulas de filtração (Envirocheck® ou Filta-Max®), procede-se a eluição de acordo com os respectivos protocolos, resultando em volume de 10 mL que será submetido à IMS. A amostra é incubada sob rotação (1 hora a 20 rpm) com solução tampão e microesferas magnetizadas (*beads*) conjugadas com anticorpos anti-*Cryptosporidium*. Essas microesferas, em uma reação antígeno-anticorpo, se ligam especificamente aos oocistos. O tubo de Leighton, contendo a suspensão de parasitos e microesferas é inserido em um ímã (concentrador magnético de partículas), que promove a separação dos complexos microesfera-anticorpo-oocisto do restante da amostra. Posteriormente, os oocistos são dissociados das microesferas mediante reação em meio ácido (ácido clorídrico 0,1 N). Os oocistos purificados são transferidos para as lâminas de imunofluorescência, previamente tratadas com solução básica para neutralização, para posterior reação de visualização.

Porém, o Método 1622 era destinado à detecção apenas de oocistos de *Cryptosporidium* spp., e logo foi substituído pelo Método 1623 (USEPA, 2005) que contempla também, a detecção de cistos de *Giardia* spp.. O método 1623 prevê, além do uso de separação imunomagnética, a filtração de volumes menores (10 litros) e uso de cápsulas contendo filtros de polisulfona.

Franco e colaboradores (2012b) avaliaram três protocolos de concentração de cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* spp., incluindo: floculação em carbonato de cálcio, filtração em membranas de 47 mm (porosidade de 3 µm) e filtração com sistema

Filta-Max®. Nos ensaios com amostras de água ultra pura, o Filta-Max® obteve os melhores resultados de recuperação dos organismos, entretanto apresentou grande dificuldade em recuperá-los nas amostras de água bruta. Nestes ensaios, as técnicas de filtração em membranas e floculação em carbonato de cálcio conseguiram recuperar os organismos, porém também foram diretamente influenciados pela interferência da turbidez.

Vale ressaltar que em janeiro de 2012 a USEPA publicou o Método 1623.1 (USEPA, 2012), versão que revisa e substitui o Método 1623 (USEPA, 2005). A nova versão manteve o escopo da anterior e, contempla basicamente as mesmas etapas, com algumas modificações. Dentre as principais, estão: novos valores dos critérios de aceitação para o Controle de Qualidade Analítica (CQA) para média da eficiência de recuperação e precisão; inserção de procedimentos visando o aprimoramento da etapa de purificação por Separação Imunomagnética (IMS), como a lavagem das “*beads*” aderidas ao tubo, a remoção de materiais magnéticos (ferro e outros), ajuste do pH e, a inclusão da dissociação térmica como opção para etapa de purificação (USEPA, 2012).

O Método 1623.1 (USEPA) possui uma seção de Controle de Qualidade Analítica que visa reduzir possíveis erros e promover dados confiáveis na análise de protozoários de veiculação hídrica, que consiste em: 1- demonstrar a capacidade inicial do laboratório em realizar a análise mediante teste de Precisão inicial e Recuperação (IPR); 2- testar o efeito da matriz de água e, 3- atestar a precisão na rotina do laboratório mediante a inoculação de cistos e oocistos artificiais em diferentes matrizes de água.

A IPR consiste no processamento de quatro amostras de água ultra pura (10 litros) contaminadas artificialmente com suspensão comercial de cistos e oocistos (Easy Seed®), determinando-se a recuperação média e a precisão (expresso em valores de Desvio Padrão

Relativo – DPR). Os resultados encontrados devem atender aos critérios de CQA do método 1623.1, que apresentam novos valores em relação ao Método 1623 (tabelas 3).

O teste do efeito da matriz de água consiste em ensaio simultâneo com a análise da amostra de campo mediante o uso de suspensões comerciais de oocistos purificados, irradiados e marcados com um fluorocromo diferente do isotiocianato de fluoresceína (FITC), que é conjugado ao anticorpo monoclonal dos *kits* comerciais usados para a visualização dos protozoários. O fluorocromo sulforodamina, cujo nome comercial é Texas Red®, tem sido empregado com maior frequência para marcar os cistos e oocistos a serem utilizados nos ensaios de efeito da matriz. Ou seja, uma vez processada a amostra de água, os protozoários naturalmente presentes e aqueles semeados (controle positivo interno – Color Seed®) são quantificados de forma distinta utilizando-se filtros específicos para cada fluorocromo (FITC: excitação: 495 nm; emissão: 521 nm; Texas Red: excitação: 580 nm; emissão: 615 nm). Com esse procedimento, determina-se a interferência que as características físico-químicas e microbiológicas da amostra de água analisada ocasionam na eficiência de recuperação. Os valores obtidos devem satisfazer os critérios de aceitação estabelecidos pelo Método 1623.1 (USEPA, 2012).

Por fim, a precisão na rotina do laboratório é atestada mediante a inoculação artificial de cistos e oocistos em diferentes matrizes de água (controles positivos), controle negativo (para assegurar ausência de contaminação) e controle de coloração (CANTUSIO-NETO et al., 2011; FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012a).

Tabela 3: Valores dos critérios de aceitação do CQA para o Método 1623 e Método 1623.1.

		Método 1623		Método 1623.1	
		<i>Cryptosporidium</i> <i>spp.</i>	<i>Giardia</i> <i>spp.</i>	<i>Cryptosporidium</i> <i>spp.</i>	<i>Giardia</i> <i>spp.</i>
IPR	Média				
	Recuperação (%)	24 – 100	24 – 100	38 – 100	27 - 100
	Precisão (DPR)	55	49	37	39
Matriz Spike	Média				
	Recuperação (%)	13 – 111	15 – 118	32 – 100	8 - 100
	Precisão (DPR)	61	30	46	97

Fonte: USEPA, 2005 e 2012.

Para a etapa de visualização e enumeração, os organismos são transferidos para lâminas e incubados com anticorpos direcionados contra os epítomos da parede dos (oo)cistos, conjugados com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) que emite coloração verde-maçã brilhante. Simultaneamente à reação de Imunofluorescência Direta (RID) é realizada a coloração com o corante vital DAPI (4', 6' – diamidino-2-phenylindol) para teste confirmatório da morfologia e microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), conforme USEPA (2005).

Nos últimos anos, a biologia molecular tem sido utilizada como uma ferramenta muito importante nos trabalhos de microbiologia e parasitologia ambiental. Técnicas moleculares, especificamente a Reação em Cadeia Polimerase (PCR), são usadas para monitorar patógenos como protozoários, vírus e bactérias e, fornecem meios rápidos, sensíveis e precisos para detectar e quantificar tais organismos. Essas técnicas têm sido utilizadas para avaliar a qualidade microbiológica das águas e a eficiência de remoção dos patógenos em águas destinadas ao consumo humano e também em efluentes tratados. A variedade de métodos disponíveis para a aplicação de técnicas moleculares tem aumentado,

e seus custos, diminuído. Esse desenvolvimento tem permitido a padronização e automação de técnicas, como identificação, genotipagem, enumeração, avaliação da viabilidade e rastreamento de patógenos (GIRONES et al., 2010).

2.3. Turbidez

Os métodos utilizados para detecção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras hídricas são influenciados pelas características físico-químicas da matriz de água, como a turbidez (FRANCO; BRANCO; LEAL., 2012a).

Turbidez é uma propriedade física dos fluidos que se traduz na redução da sua transparência devido à presença de materiais em suspensão que interferem na passagem da luz através do fluido (USEPA, 2012b) e, pode ser causada por material orgânico, inorgânico ou por uma combinação de ambos. É medida pelo turbidímetro, um instrumento capaz de mensurar a perda de intensidade de um feixe de luz que passa através de uma solução. O resultado é expresso em Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU – *Nephelometric Turbidity Units*) (WHO, 2011).

Uma das principais características biológicas dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. é a acentuada resistência dos cistos e oocistos à desinfecção por cloro, cloramina e outros desinfetantes químicos, usualmente utilizados nos processos de tratamento de água destinada ao consumo humano (QUINTERO-BETANCOURT; PEELE; ROSE, 2004). Outras formas de desinfecção como ozônio e luz ultravioleta (UV) mostraram bons resultados para a inativação destes protozoários (CRAIK et al., 2001; HIJNEN et al., 2006), porém sua eficácia depende da turbidez da água e do tempo de exposição e contato com os cistos e oocistos. Ran e colaboradores (2010) detectaram redução das taxas de inativação com o aumento da turbidez.

Dessa forma, durante os processos de tratamento de água a remoção dos protozoários depende basicamente da etapa física. Os processos de floculação, coagulação, sedimentação e filtração atingem, em geral, remoção de 99% dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., diminuindo o risco de contaminação. Micro-organismos como bactérias, vírus e protozoários são, caracteristicamente, ligados à partículas em suspensão na água, e a remoção da turbidez por filtração reduz significativamente a contaminação microbiológica (WHO, 2011).

Nos últimos anos, estudos têm investigado a relação entre os níveis de turbidez antes do tratamento da água, a redução da turbidez (remoção de partículas) via filtração, e a redução de patógenos na água tratada. Estes estudos demonstraram que a alteração da turbidez no efluente filtrado de 1,0 NTU para 0,5 e 0,3 NTU não representou melhoras significativas no controle de patógenos. No entanto, a manutenção dos níveis de turbidez do efluente filtrado abaixo de 0,2 NTU promove melhoras substanciais no controle de qualidade microbiológica (HEALTH CANADA, 2012b).

Nos EUA, visando fortalecer o controle do monitoramento dos protozoários em água tratada, a USEPA identificou que a manutenção do nível de turbidez a 0,15 NTU com limite máximo individual de 0,3 NTU promovem melhoras significativas na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. comparado aos valores anteriormente empregados: manutenção de 0,3 NTU com limite máximo individual de 1,0 NTU (USEPA, 2006).

Portanto, a análise e o controle dos níveis da turbidez da água destinada ao consumo humano são fundamentais, pois atuam como indicadores da eficiência dos processos de filtração e, conseqüentemente, da remoção física dos protozoários patogênicos.

2.4. Legislação brasileira – Portaria n. 2.914/2011, do Ministério da Saúde, e legislações internacionais para o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano.

A Portaria n. 2.914, emitida em 12 de dezembro de 2011 pelo Ministério da Saúde do Brasil, representa um grande avanço nas legislações brasileiras quanto ao controle da qualidade da água para consumo humano, principalmente com relação ao padrão microbiológico referente ao monitoramento de protozoários patogênicos. Esta legislação traz novidades que buscam maior aproximação com legislações de potabilidade de água de países desenvolvidos.

A legislação de gestão de qualidade da água da Austrália – *Australian Drinking Water Guidelines* prevê o monitoramento de cistos e oocistos de protozoários na fonte de água, bem como no ponto de captação de água destinada ao consumo humano, e também nos pontos de armazenamento de água tratada (NHMRC, 2011).

Na Nova Zelândia, a legislação referente à água para consumo humano classifica os parâmetros que devem ser monitorados em quatro classes de prioridades, visando minimizar os custos sem comprometer a saúde pública. O monitoramento de *Giardia* e *Cryptosporidium* se enquadra na prioridade 1, ou seja, de caráter obrigatório e de grande relevância, pois a presença destes em água para consumo humano representam riscos à saúde pública (MINISTRY OF HEALTH, 2008).

Nos EUA, a USEPA prevê o monitoramento de *Giardia* e *Cryptosporidium*, e determina que os sistemas de tratamento de água alcancem 99% de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e 99,9% de inativação/remoção de cistos de *Giardia* spp., de acordo com o “2012 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories” (USEPA,

2012b). No Canadá, as diretrizes de controle de qualidade de água estabelecem como meta a inativação/remoção de no mínimo, 3 log para cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., conforme “*Guidelines for Canadian Drinking Water Quality*” (HEALTH CANADA, 2012a).

No Brasil, a Portaria MS nº 518/2004 abordava o monitoramento dos protozoários patogênicos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. apenas em caráter de recomendação, quando mencionava no §8º que “Em complementação, recomenda-se a inclusão de pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência, dentre outros, de enterovírus, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.” (BRASIL, 2004).

Já na atual Portaria, n. 2.914/2011, a avaliação da presença destes protozoários em mananciais superficiais de abastecimento é mais criteriosa e rigorosa, de forma que esta se torna obrigatória em função da concentração de *Escherichia coli*, principal indicador microbiológico de contaminação fecal. No artigo 31 consta que “os sistemas de abastecimento e soluções alternativas coletivas de abastecimento de água que utilizam mananciais superficiais devem realizar monitoramento mensal de *Escherichia coli* no(s) ponto(s) de captação de água”, seguido pelo §1º, que diz que “quando for identificada média geométrica anual maior ou igual a 1.000 *Escherichia coli*/100mL deve-se realizar monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no(s) ponto(s) de captação de água” (BRASIL, 2011).

No entanto, a inclusão da pesquisa de protozoários patogênicos no monitoramento das amostras ambientais, no Brasil, ainda está iniciando. Embora a atual legislação determine o monitoramento dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em

águas de mananciais de abastecimento em função da concentração de *Escherichia coli*, vários fatores dificultam o atendimento desta legislação em curto prazo. Entre eles, se destacam: a complexidade inerente aos métodos de detecção, a carência de recursos humanos qualificados para o trabalho e a escassez de informações disponíveis sobre a ocorrência desses patógenos nos recursos hídricos nacionais (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012a).

3. Objetivos

- Avaliar a aplicabilidade dos métodos: Método 1623 utilizando *IDEXX Filtta-Max®* e Método de Filtração em Membranas, mediante inoculação artificial de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água bruta do rio Atibaia.
- Avaliar a aplicabilidade dos métodos: Método 1623 utilizando *IDEXX Filtta-Max®* e Método de Filtração em Membrana, mediante detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. naturalmente presentes em amostras de água bruta do rio Atibaia.
- Investigar a influência pela interferência da matriz medida pelo parâmetro turbidez, na execução e desempenho dos métodos estudados.
- Estudar a etapa de purificação por Separação Imunomagnética (IMS) para detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água ultra-pura (Milli-Q®), com ênfase na performance dos procedimentos de dissociação: ácida e térmica.
- Investigar os pontos críticos durante a execução da etapa de purificação por Separação Imunomagnética (IMS), avaliando possíveis perdas dos organismos alvo.

4. Material e Métodos

4.1. Delineamento experimental

O estudo foi dividido em primeira e segunda parte, que resultaram respectivamente nos capítulos I e II, descritos posteriormente.

Na primeira parte foram utilizadas amostras de água bruta superficial do rio Atibaia, que foram coletadas no ponto de entrada de água do Parque da Estação de Tratamento de Água (ETA) da Sanasa (S 22°55'44.6" / W 47°02'14.4"), como mostram as figuras 3 e 4. Na segunda parte foram utilizadas amostras de água ultra pura (Milli-Q®), obtidas pelo equipamento Milli-Q/M Millipore.

Os experimentos deste estudo foram realizados no Laboratório de Microbiologia (Laboratório Central) da Sanasa, situado no parque da ETA.



Figura 3: Local de coleta das amostras de água bruta na ETA da Sanasa. A: local de entrada de água, captada do rio Atibaia e trazida pelas bombas adutoras. B: fluxo de água seguindo em direção a ETA. C: ETA.



Figura 4: Estação de Tratamento de Água (ETA) da Sanasa. Ponto C da figura 3.

4.2. Primeira Parte – Estudo da aplicabilidade dos métodos: Método 1623 e Método de Filtração em Membranas.

A primeira parte do trabalho consistiu em avaliar a aplicabilidade do Método 1623¹ com Filta-Max® (FMx) e do Método de Filtração em Membranas (FM), considerando uma matriz de água bruta superficial que apresenta grande variação de turbidez.

Para isso, foram realizados 48 experimentos considerando avaliar simultaneamente: o percentual de recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. inoculados artificialmente com Color Seed®, pelos métodos estudados (24 experimentos); bem como a detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. naturalmente presentes nas amostras (24 experimentos).

¹ Nota: O Método 1623.1 foi publicado pela USEPA em Janeiro de 2012. Portanto, a parte experimental deste estudo, iniciada em 2011, teve como referência a versão publicada em 2005 (Método 1623), a mais atual no momento dos ensaios.

Para a avaliação simultânea, foram inoculados em cada amostra cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. artificiais, com o Color Seed®. Trata-se de uma suspensão de cistos e oocistos marcados com corante vital vermelho fluorescente (sulforodamina) que constitui o corante “*Texas Red*”, contidos em um tubo de 5 mL, com número conhecido (100 oocistos e 100 cistos $\pm$ 1 DP), e preservados em 1 mL de solução salina. Cada tubo de Color Seed® é selado e esterilizado expondo cada lote a uma dose de radiação gama, garantindo a estabilidade e inatividade dos organismos (CANTUSIO-NETO, 2008).

Desta forma, por serem marcados com outro fluorocromo, foram usados como “auto-controle interno” em amostras naturais, pelo fato da leitura microscópica ter sido realizada com filtros de diferentes comprimentos de onda, em relação ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Ao fazer a leitura final da lâmina que continha a amostra natural e que também foi contaminada artificialmente com o Color Seed®, observava-se inicialmente a presença de cistos ou oocistos que fluorescem em verde maçã brilhante (FITC). A seguir, mudava-se o conjunto de filtros para o vermelho. Se o organismo fluorescia em vermelho, ele era contado como Color Seed®, porém, se não houvesse fluorescência em vermelho era contado como intrínseco da amostra.

4.2.1. Experimentos

Os experimentos foram divididos de acordo com faixas de turbidez das amostras coletadas, da seguinte maneira: até 30 NTU, entre 31 NTU e 60 NTU e, entre 61 NTU e 80 NTU. Para cada uma dessas faixas de turbidez foram processadas quatro amostras por FMx e quatro amostras por FM (figura 5).

Os critérios adotados para escolha das faixas de turbidez utilizadas foram baseados nas médias mensais de turbidez das águas do rio Atibaia no período de março de 2009 e março de 2011, bem como na experiência prévia com o uso dos métodos estudados.

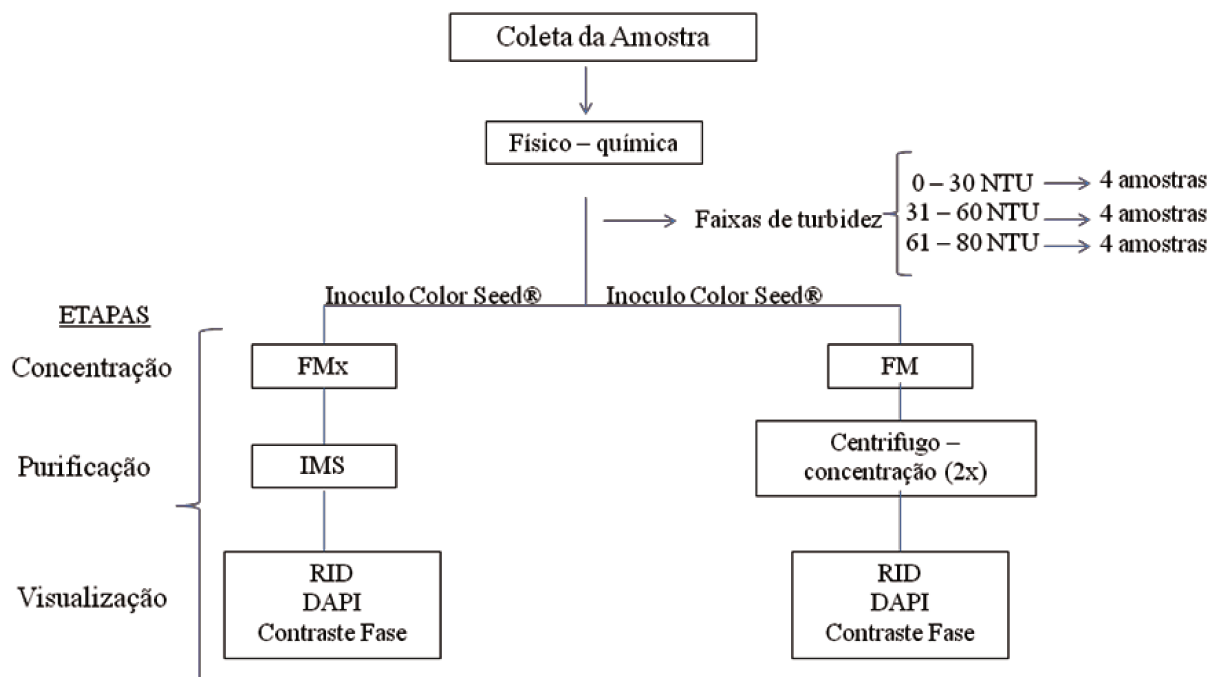


Figura 5: Delineamento experimental da primeira parte: Estudo da aplicabilidade dos métodos de detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp por FMx e por FM.

As amostras foram coletadas e processadas no período de agosto de 2011 à março de 2012. Para tanto, foram coletados volumes totais de 12 litros de água bruta superficial do rio Atibaia em frascos de polietileno (20 litros) descontaminados e lavados com solução de Tween 1%. Após coletadas as amostras eram prontamente processadas ou armazenadas de acordo com as especificações da USEPA (2005). Do volume total coletado, dez litros foram amostrados para a aplicação do Método 1623, utilizando IDEXX Filta-Max® (FMx) na etapa de concentração; um litro para o método de Filtração em Membrana (FM); e, o restante (um litro) para as análises físico-químicas (cor, pH e turbidez).

Os volumes amostrais utilizados nos experimentos foram estabelecidos de acordo com protocolo original de cada método, ou seja, Método 1623 (USEPA, 2005) para FMx, e Franco; Cantusio Neto e Branco (2001) para FM.

4.2.1.1. Método de Concentração - IDEXX Filta-Max® (FMx)

As amostras de água foram filtradas através de um sistema de filtração com bomba à vácuo (fluxo de 1-4 litros/minuto). Os cistos e oocistos, juntamente com as sujidades, foram retidos na espuma contida no módulo de filtro do Filta-Max®, concentrando os parasitos. Após esta etapa, o material retido foi eluído e concentrado por lavagem dessa espuma em solução tampão salina-fosfato com Tween-20 (PBST), no sistema da estação de lavagem (*wash station*), de acordo com USEPA (2005).

O cálculo para estimar o número de (oo)cistos/L (=X) para cada amostra foi realizado de acordo com a fórmula:

$$X = \frac{n^{\circ} \text{ (oo)cistos confirmados}}{V \times F \times R}$$

Em que,

V: Fração do pellet purificado por IMS

F: Fração da amostra analisada ao microscópio

R: Volume da amostra filtrada (L)

Neste estudo foram utilizados volumes amostrais de 10 L, de acordo com o Método 1623. Porém para as amostras com turbidez de 31 – 60 NTU e 61 – 80 NTU não foi possível filtrar o mesmo volume devido à obstrução do fluxo de água através espuma por conta da alta turbidez. Portanto, para essas faixas de turbidez foi estabelecida a filtração de 5 litros de volume amostral.

4.2.1.2. Método de Concentração – Filtração em Membrana (FM)

As amostras de água foram filtradas por membranas compostas por éster mistos de celulose (Millipore®) com 47 mm de diâmetro e porosidade 3,0 µm, utilizando-se de um sistema de filtração com bomba à vácuo (fluxo de 1-4 litros/minuto) e porta-filtro de vidro. Esta membrana é responsável pela retenção dos cistos e oocistos, retendo também sujidades presentes na amostra. Posteriormente, esta membrana foi eluída por raspagem (10 minutos) e lavagem (10 minutos) com solução de eluição (Tween 80 a 0,1%), e em seguida, o líquido (eluído) resultante foi reduzido por centrífugo-concentração (15 minutos a 1500 x g) até obtenção de um pellet. Então, após descartar o sobrenadante, foi realizada uma segunda centrifugação deste sedimento empregando água ultra-pura (15 minutos a 1500 x g), descartando o sobrenadante novamente, de forma a obter o pellet final, de acordo com Franco; Cantusio Neto e Branco (2001).

O cálculo para estimar o número de (oo)cistos/L (=Y) para cada amostra foi realizado de acordo com a fórmula:

$$Y = \frac{A \times 10^6}{B} \times \frac{C}{D}$$

Em que,

A: n° de cistos/oocistos visualizados no well da lâmina;

B: alíquota do sedimento analisado no well da lâmina (µL);

C: volume de sedimento obtido após centrifugação (mL);

D: volume amostral (L);

10⁶: fator de correção.

4.2.1.3. Eficiência de Recuperação dos Métodos

Para os experimentos com inoculação artificial de cistos e oocistos calculou-se a eficiência de recuperação utilizando a fórmula (USEPA, 2005):

$$ER = \frac{N}{M} \times 100$$

Em que,

ER: Eficiência de Recuperação (%)

N: n° de cistos/oocistos recuperados

M: n° de cistos/oocistos inoculados

4.2.1.4. Experimentos controle negativo

Foram realizados oito experimentos controle negativo com o intuito de indicar uma possível contaminação em todas as etapas, desde a concentração até a leitura das lâminas de RID. Para isso foram utilizados volumes de 11 litros de água ultra-pura (Milli-Q®), dos quais 10 litros foram processados de acordo com o protocolo do Método 1623, com *IDEXX Filta-Max*® (FMx); e 1 litro foi processado de acordo com a metodologia de Filtração em Membrana (FM). Estes experimentos foram realizados da seguinte maneira: um no início do trabalho, e então, a cada quatro análises de amostras de água bruta do rio Atibaia, para cada metodologia estudada.

4.2.1.5. Análises físico-químicas

Para as análises físico-químicas, as amostras foram analisadas nos seguintes equipamentos: Turbidímetro (HACH) para turbidez, DR 2500 (HACH) para cor e, pHmetro (DIGIMED) para pH, de acordo com os procedimentos do “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA, 2005).

4.3. Segunda Parte: Estudo da etapa de purificação por Separação Imunomagnética (IMS) em amostras de água ultra-pura.

A segunda parte deste trabalho consistiu em um estudo da etapa de purificação pela Separação Imunomagnética visando avaliar os dois procedimentos de dissociação do complexo *bead*-(oo)cisto: dissociação ácida e dissociação térmica (n=24), conforme figura 6. Esta metodologia propiciou identificar qualitativa e quantitativamente as principais causas de perdas dos cistos e oocistos durante a execução da IMS.

Para tanto, foi inoculado artificialmente em cada amostra de água ultra-pura (Milli-Q®) 100 cistos de *Giardia* spp. e 100 oocistos de *Cryptosporidium* spp. utilizando-se o inoculo Easy Seed™ BTF (Biotechnology Frontiers Austrália). Trata-se de uma suspensão teste de cistos e oocistos (sem fluorocromo) contidos em um tubo de 5,0 mL e preservados em aproximadamente 1,0 mL de solução salina. Cada tubo é selado e esterilizado expondo cada lote a uma dose de radiação gama, garantido a estabilidade e inatividade dos organismos (CANTUSIO-NETO et al., 2011).

Cada amostra foi composta por 1,0 mL de Easy Seed, 2,0 mL de solução Tween 20 (0,05%) e 7,0 mL de água ultra-pura (Milli-Q®), totalizando 10,0 mL de volume amostral, que foi diretamente processado pela IMS, sem passar por nenhuma etapa de concentração.

Para investigar as possíveis causas de perda de cistos e oocistos durante a execução da IMS, foram analisados os descartes dos concentradores magnéticos MPC-1 (Tubo Dynal L-10) e MPC-S (tubo de microcentrifuga). Para isso, foi coletado o volume que seria descartado após estas etapas, e então, este material foi processado de duas maneiras: i) fazendo uma nova IMS, utilizando, isoladamente, tanto a dissociação ácida quanto a dissociação térmica e, ii) analisando uma alíquota de 10 uL do pellet, após centrifugação

(15 minutos à 1500 x g) do material coletado. O material foi submetido à etapa de visualização conforme protocolo do fabricante (*Kit Merifluor®*).

Para analisar as *beads* que continuam aderidas ao imã após o procedimento de dissociação, ou seja, na “gota” que se forma na etapa do segundo imã (MPC-S) foi adicionado 50 uL de água ultra-pura (Milli-Q®) junto a parede do tubo de microcentrífuga. Este material foi submetido à etapa de visualização conforme protocolo do fabricante (*Kit MeriFluor®*).

4.3.1. Purificação – Separação Imunomagnética (IMS)

Na etapa de purificação pela Separação Imunomagnética (IMS) foi utilizado o Kit comercial Dynabeads® GC-Combo. A partir do volume amostral de 10 mL, a amostra foi transferida para o tubo Dynal L10 contendo soluções tampões. As *beads* (Dynabeads anti-*Crypto* e anti-*Giardia*) foram adicionadas ao tubo Dynal L10 (100 µL cada), colocado no “mixer” rotatório (Dynal MX-1) por uma hora e rotacionado a 20 rpm. Após esse período, este tubo foi transferido para o concentrador magnético de partículas (MPC 1) e procedendo a agitação manual do tubo Dynal L10 longitudinalmente num ângulo de 90° por 2 minutos. Após descarte cuidadoso do sobrenadante, a amostra foi novamente suspensa, adicionando-se 1 mL de solução tampão, e a seguir todo o volume presente foi transferido gentilmente para um tubo de microcentrifuga. Então, este tubo de microcentrifuga foi colocado no outro concentrador magnético (MPC-S), efetuando-se nova agitação manual por 1 minuto, com aproximadamente um giro por segundo num ângulo de 180°. Após esse tempo, descartou-se todo o sobrenadante com o auxílio de pipeta. Foi removida a fita magnética do concentrador e conduziu-se a dissociação do complexo *bead*-(oo)cisto.

4.3.1.1. Dissociação ácida

Foram adicionados 50 µL de ácido clorídrico 0,1 N junto à parede do tubo de microcentrífuga, que em seguida foi levado ao vortex por 50 segundos. Após a agitação o tubo foi mantido em repouso por 10 minutos e, então foi levado novamente ao vortex por 30 segundos. Em seguida, o tubo foi transferido para o concentrador magnético de partículas (MPC-S), com a fita magnética, responsável por atrair somente as *beads* e permitindo que os cistos e oocistos permaneçam no líquido no fundo do tubo.

Com auxílio de uma pipeta, todo o volume presente no tubo de microcentrífuga foi cuidadosamente transferido para o poço da lâmina de RID, previamente preparado com 5 µL de hidróxido de sódio 1 N (USEPA, 2012).

Esse procedimento foi realizado em duplicata, conforme descrito no Método 1623.

4.3.1.2. Dissociação térmica

Foram adicionados 50 uL de água ultra-pura (Milli-Q®) junto à parede do tubo de microcentrífuga, que em seguida foi levado ao vortex por 50 segundos. Após a agitação, o tubo de microcentrífuga foi transferido para o banho-seco (Termo-block Nova Ética® modelo 330 – 2D) a 80°C durante 10 minutos, e então agitado novamente por 30 segundos no vortex. Em seguida, o tubo foi transferido para o concentrador magnético de partículas (MPC-S), com a fita magnética responsável por atrair somente as *beads* e permitindo que os cistos e oocistos permaneçam no líquido no fundo do tubo.

Com auxílio de uma pipeta, todo o volume presente no tubo de microcentrífuga foi transferido para o poço da lâmina de RID (USEPA, 2012).

Esse procedimento foi realizado em duplicata, conforme descrito no Método 1623.

Coleta das amostras

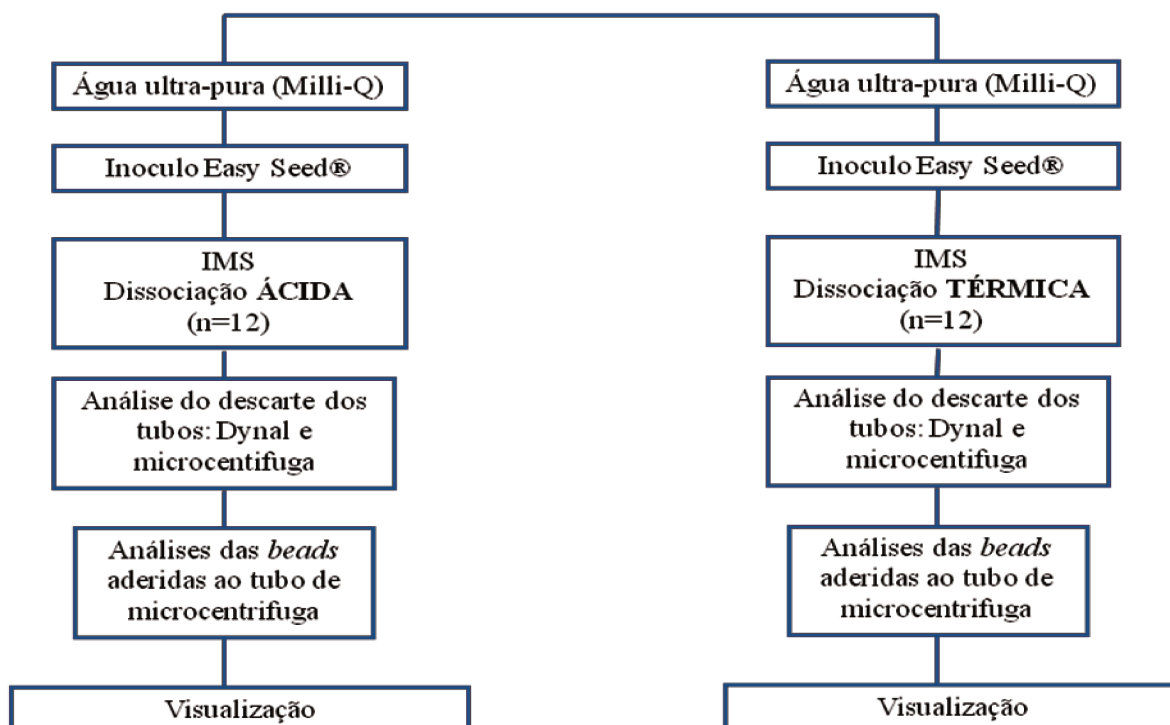


Figura 6: Delineamento experimental da segunda parte: Estudo da etapa de purificação por separação imunomagnética (IMS) em amostras de água ultra-pura (Milli-Q®).

4.4. Visualização – microscopia de imunofluorescência

Na etapa de visualização e enumeração, os cistos e oocistos já concentrados e purificados foram submetidos à Reação de Imunofluorescência Direta (RID). Para tanto, foram transferidos para o *well* da lâmina e, então ligados a anticorpos monoclonais anti-*Crypto* e anti-*Giardia* utilizando-se o Kit *Merifluor*. Após concluída a reação de imunofluorescência, a amostra foi examinada utilizando microscopia de epifluorescência com filtros específicos de acordo com o fluorocromo empregado no ensaio. A avaliação de confirmação da morfologia foi realizada com o 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e microscopia de contraste de fase.

Os critérios para a identificação de oocistos e cistos para imunofluorescência levaram em consideração os seguintes indicadores: imunofluorescência definida pela cor verde-maçã brilhante (comparável àquela exibida por mais de 50% de cistos e oocistos presentes nas suspensões de “controles positivos”); ausência de poros ou apêndices; tamanho e formato compatíveis: 8-12 µm de tamanho e forma oval para os cistos de *Giardia* spp.; e 3-8,5 µm de diâmetro, formato esférico e presença (não obrigatória) de sutura no oocisto para *Cryptosporidium* spp.

No contraste de fase: axonema e núcleos (um a quatro) para cistos; presença das estruturas internas para oocistos. Para as amostras inoculadas com Color Seed, consideraram-se as mesmas características morfológicas, porém com fluorescência vermelha (CANTUSIO-NETO, 2008).

É relevante citar que a etapa de Visualização foi realizada para todos os experimentos deste estudo, ou seja, tanto na primeira quanto na segunda parte do trabalho. Na primeira parte, entretanto, foi realizado o teste confirmatório da morfologia com o DAPI e microscopia de contraste de fase, além da RID; já na segunda parte, foi realizada apenas a RID.

4.5. Análises estatísticas

Os resultados obtidos na primeira parte do estudo foram analisados estatisticamente utilizando-se do Teste *t* de Student pareado, para a comparação das médias (Bilateral), considerando um nível de significância de 5%. Para isso utilizou-se do Software *GraphPad Prism* (versão 5.01).

Para os resultados obtidos na segunda parte do estudo foram realizados as mesmas análises estatísticas descritas para a primeira parte e, também as análises estatísticas

prevista no Método 1623, expressas em média e Desvio Padrão Relativo (DPR) máximo, conforme descrito a seguir.

$$DPR = \left(\frac{DP}{M} \right) \times 100 \%$$

Em que,

DPR: Desvio Padrão Relativo

DP: Desvio Padrão

M: Média de recuperação

5. Resultados

A dissertação foi estruturada em formato de artigos científicos.

O Capítulo I consistiu em um estudo da aplicabilidade dos métodos de concentração: Método 1623 utilizando Filt-Max® e Método de Filtração em Membranas, considerando diferentes faixas de turbidez de uma matriz de água bruta superficial.

O Capítulo II consistiu em um estudo da etapa de purificação por Separação Imunomagnética (IMS) visando avaliar o desempenho de dois diferentes procedimentos de dissociação do complexo *bead*-(oo)cisto: dissociação ácida e dissociação térmica. Além disso, buscou também, identificar qualitativa e quantitativamente as principais causas de perdas dos cistos e oocistos durante a execução da IMS.

Capítulo I

Aplicabilidade do Método 1623 e do Método de Filtração em Membranas para a detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água bruta, considerando diferentes faixas de turbidez.

Pinto, D.O.¹, Santos, L.U.², Franco, R.M.B.¹, Cantusio-Neto, R.^{1,3}

1 – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia (UNICAMP-IB). Campinas/SP, Brasil

2 – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo (UNICAMP-FEC). Campinas/SP, Brasil

3 – Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA). Campinas/SP, Brasil.

Resumo

Os protozoários patogênicos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. estão entre os principais contaminantes associados à veiculação hídrica e seu monitoramento em águas de abastecimento público é determinado pela Portaria n. 2.914/2011, do Ministério da Saúde do Brasil. Neste trabalho foi avaliado a aplicabilidade do Método 1623 com Filta-Max (FMx) e do método de Filtração em Membranas (FM) (n=48) para detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. mediante contaminação artificial (Color Seed®) e detecção natural, em amostras de água bruta superficial do rio Atibaia, em Campinas/SP, Brasil. Os experimentos foram divididos de acordo com faixas de turbidez: até 30 NTU, 31 – 60 NTU e 61 – 80 NTU. Cistos de *Giardia* spp. foram detectados em todas as faixas de turbidez por ambas as metodologias. Oocisto de *Cryptosporidium* spp. não foram detectados pela FM na faixa de 31 – 60 NTU. O método de FM atendeu aos critérios de controle de qualidade analítica da USEPA em todas as faixas de turbidez. Ambas as metodologias mostraram-se aplicáveis para a detecção e recuperação dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras hídricas. A FM apresenta como vantagem o menor custo de implantação e manutenção.

Palavras-chave: Protozoários de Veiculação hídrica, Portaria n. 2.914/2011, Filta-Max®, rio Atibaia.

Abstract

The pathogenic protozoa *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. are some the major waterborne contaminants and their monitoring in water supply is determined in Governmental Decree no. 2.914/2011, the Brazil's Ministry of Health. This study evaluated the applicability of methods: Method 1623 with Filta-Max (FMx) and Membrane Filtration (MF) (n = 48) for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts by artificial contamination (Color Seed ®) and natural detection in raw water samples from Atibaia River, Campinas/SP. The experiments were divided according to range of Turbidity: less or equal 30 NTU, 31 – 60 NTU e 61 – 80 NTU. *Giardia* spp. were detected in all ranges of turbidity by both methodologies. Oocysts of *Cryptosporidium* spp. were not detected by FM in the 31-60 NTU. The method of FM met the criteria for quality control of analytical USEPA in all ranges of turbidity. Both methods proved to be applicable for the detection and recovery of protozoan *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in water samples, and were influenced by turbidity. The MF requires less cost for implementation and maintenance than FMx.

Key words: Waterborne protozoan, Governmental Decree 2.914/2011, Filta-Max®, Atibaia River.

1. Introdução

Os protozoários patogênicos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. estão entre os principais contaminantes associados à veiculação hídrica. Ambos são comumente encontrados em mananciais de captação de água destinada ao consumo humano e juntos, foram responsáveis por 95,5% dos surtos de veiculação hídrica causados por protozoários, reportados no período de 2004 a 2010 em todo o mundo (ARAÚJO et al., 2011; BALDURSSON e KARANIS, 2011; CANTUSIO-NETO et al., 2010).

Os métodos de detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras hídricas contemplam basicamente três etapas: i) concentração da amostra; ii) purificação da amostra pela Separação Imunomagnética (IMS) e; iii) visualização e quantificação dos organismos-alvo (USEPA, 2005, CANTUSIO-NETO et al., 2010).

Atualmente o método de referência internacional para detecção destes patógenos em amostras hídricas, preconizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), é o Método 1623.1 (USEPA, 2012). Esta versão revisa e substitui a versão anterior, Método 1623 (USEPA, 2005), mantendo o escopo e trazendo algumas alterações.

De acordo com o Método 1623, há três opções de filtro para a etapa de concentração da amostra (primeira etapa): Envirochek® HV, Filta-Max® e PCFC (fluxo-concentração), que podem ser utilizados tanto para água bruta quanto para água tratada. Também são consideradas para a etapa de concentração opções alternativas a estas, desde que atestem desempenho igual ou superior ao estabelecido pelos critérios de Controle de Qualidade Analítica (CQA) estabelecidos pela USEPA (2005). Dentre as elas estão: a Filtração em Membranas (FRANCO; CANTUSIO NETO; BRANCO, 2001) e a Floculação em Carbonato de Cálcio (VESEY et al., 1993).

A crescente necessidade de se obter um melhor controle de qualidade das águas dos mananciais utilizados para abastecimento público exige métodos eficazes na detecção dos organismos de interesse em saúde pública, como *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., levando em consideração as características inerentes à matriz utilizada para captação da água que será tratada e distribuída para o consumo humano.

Tal necessidade é evidenciada pela Portaria n. 2.914/2011, legislação de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano no Brasil, que determina monitoramento destes protozoários no ponto de captação de água destinada ao consumo humano (Brasil, 2011).

Desta forma, visando gerar resultados que forneçam subsídios para que os sistemas de tratamento de água possam atender às determinações da Portaria n. 2.914/2011 quanto

ao monitoramento dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., neste trabalho foi realizado um estudo da aplicabilidade do Método 1623 com Filtar-Max® e do método de Filtração em membranas, ambos sem adaptações, em amostras de água bruta superficial considerando diferentes faixas de turbidez.

2. Material e Métodos

2.1. Local de estudo

Foram utilizadas amostras de água bruta superficial do rio Atibaia, em Campinas/SP, Brasil, coletadas no ponto de entrada de água da Estação de Tratamento de Água – ETA (S 22°55'44.6" / W 47°02'14.4"), da Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA) e, processadas no laboratório de microbiologia da mesma.

2.2. Experimentos controle – inóculo artificial (Color Seed®)

Foram inoculados em cada amostra 100 cistos e 100 oocistos marcados com corante vital vermelho fluorescente (sulforodamina) que constitui o corante “*Texas Red*” (Color Seed®). Por serem marcados com outro fluorocromo, diferente do empregado na reação de visualização (isotiocianato de fluoresceína) é possível distinguir os oocistos inoculados artificialmente (Color Seed®) daqueles presentes naturalmente nas amostras.

2.3. Ensaio

Foram realizados 48 experimentos considerando avaliar simultaneamente: o percentual de recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. inoculados artificialmente com Color Seed® (24 experimentos); bem como a detecção de

cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. naturalmente presentes nas amostras nas amostras (24 experimentos), por meio de ambos os métodos: Método 1623¹ com Filtar-Max® (FMx) e Filtração em Membranas (FM).

Os experimentos foram divididos de acordo com faixas de turbidez das amostras coletadas: até 30 NTU, entre 31 NTU e 60 NTU e, entre 61 NTU e 80 NTU. Para cada uma dessas faixas de turbidez foram processadas quatro amostras por FMx e quatro amostras por FM.

Os volumes amostrais utilizados nos experimentos foram estabelecidos de acordo com protocolo original de cada método, ou seja, Método 1623 (USEPA, 2005) para FMx, e Franco; Cantusio Neto e Branco (2001) para FM.

2.4. Métodos de detecção

2.4.1. Método 1623 com Filtar-Max® (FMx)

As amostras de água (10 L) foram filtradas pela espuma contida no módulo de filtro do Filtar-Max - Idexx, concentrando os protozoários. Após esta etapa, o material retido foi eluído e concentrado por lavagem dessa espuma em solução tampão salina-fosfato com Tween-20 (PBST), no sistema da estação de lavagem (*wash station*). Então, foi realizada purificação por IMS e visualização por técnica de imunofluorescência (RID e DAPI) e microscopia de contraste de fase, de acordo com USEPA (2005).

Neste estudo foram utilizados volumes amostrais de 10 L, de acordo com o Método 1623. Porém para as amostras com turbidez de 31 – 60 NTU e 61 – 80 NTU não foi

¹ O Método 1623.1 foi publicado pela USEPA em Janeiro de 2012. Portanto, a parte experimental deste estudo, iniciada em 2011, teve como referência a versão publicada em 2005 (Método 1623), a mais atual no momento dos ensaios.

possível filtrar o mesmo volume devido à obstrução do fluxo de água através espuma por conta da alta turbidez. Portanto, para essas faixas de turbidez foi estabelecida a filtração de cinco litros de volume amostral.

2.4.2. Método de Filtração em Membrana (FM)

As amostras de água (1 L) foram filtradas em membranas compostas por éster mistos de celulose (47 mm de diâmetro e porosidade 3,0 μm). Posteriormente, esta membrana foi eluído por raspagem (10 minutos) e lavagem (10 minutos) com solução de eluição (Tween 80 a 0,1%). Em seguida, o líquido (eluído) resultante foi reduzido por centrífugo-concentração (15 minutos a 1500 x g), e visualizado por técnica de imunofluorescência (RID e DAPI) e microscopia de contraste de fase, de acordo com Franco, Cantusio e Branco (2001).

2.5. Ensaios físico-químicos

As análises físico-químicas para cor, pH e turbidez foram realizadas de acordo com os procedimentos do “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA, 2005) ².

2.6. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente aplicando-se o Teste *t* de Student pareado, para a comparação das médias (Bilateral), considerando um nível de significância de 5%, utilizando-se o Software *GraphPad Prism* (versão 5.01).

² A 22ª edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* foi publicada pela APHA em 2012. Portanto, a parte experimental deste estudo, iniciada em 2011, teve como referência a versão publicada em 2005 (21ª edição), a mais atual no momento dos ensaios.

2. Resultados e Discussão

No período de agosto de 2011 a março de 2012 a média mensal dos níveis de turbidez das águas do rio Atibaia variaram de 16,5 NTU (setembro de 2011) a 295,2 NTU (janeiro/2012) (SANASA, 2013). Cabe ressaltar que os níveis de turbidez deste manancial são muito elevados, por ser um sistema lótico. Devido também as diferenças climáticas e hidrológicas, os níveis de turbidez são normalmente mais baixos em outros países. A amostragem para este trabalho baseou-se nestas médias, de forma a atender as faixas de turbidez previamente estabelecidas, conforme tabela 1.

Tabela 1: Período de coleta, cor, pH e média de turbidez das amostras coletadas, de acordo com as faixas de turbidez estudadas.

Faixas de Turbidez (NTU)	Período de coleta das amostras	Cor (Uc)	pH	Média de Turbidez das amostras (NTU)
até 30	15/08/11 - 29/09/11	152	7,1	19,3
31 - 60	21/10/11 - 16/02/12	418	6,9	52,8
61 - 80	09/01/12 - 19/03/12	485	6,9	72,5

Foram detectados cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. naturalmente presentes na amostras de água bruta do rio Atibaia com turbidez até 30 NTU por ambos os métodos, FMx e FM, conforme tabelas 2 e 3. Não houve diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$).

Nas amostras com turbidez entre 31 e 60 NTU, cistos de *Giardia* spp. foram detectados tanto por FMx como por FM, entretanto oocistos de *Cryptosporidium* spp. não foram detectados pelo método de FM, e observou-se que os valores encontrados deste organismo por FMx também foram muito baixos (0,1 oocistos/L), como mostram as tabelas 2 e 3. Não houve diferença estatística significativa ($p = 0,34$) entre os métodos nesta faixa de turbidez.

Nas amostras com turbidez entre 61 e 80 NTU foram detectados cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. naturalmente presentes por ambos os métodos, conforme as tabelas 2 e 3, e também não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Tabela 2: Média e desvio padrão da concentração de cistos de *Giardia* spp. em amostras de água bruta do rio Atibaia, detectados por FM e FMx nas faixas de turbidez estudadas.

Faixas de Turbidez (NTU)	FM (cistos/L)	FMx (cistos/L)
até 30	13 ± 6,2	9,6 ± 10,6
31 - 60	7,5 ± 9,6	2,4 ± 3,8
61 - 80	7,5 ± 5,0	8,9 ± 9,1

Tabela 3: Média e desvio padrão da concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água bruta do rio Atibaia, detectados por FM e FMx nas faixas de turbidez estudadas.

Faixas de Turbidez (NTU)	FM (oocistos/L)	FMx (oocistos/L)
até 30	1,8 ± 3,5	0,1 ± 0,1
31 - 60	ND	0,1 ± 0,1
61 - 80	2,5 ± 5,0	1,0 ± 1,0

ND: Não detectado.

Os resultados obtidos estão de acordo com recentes trabalhos publicados na literatura. Sato e colaboradores (2013) descrevem que num total de 206 amostras coletadas em 28 locais, *Giardia* spp. foi detectada em 49,5% das amostras em concentrações de 0,1 cistos/L até 97 cistos/L, destacando que a maioria das amostras positivas apresentaram concentração de 0,1 a 10 cistos/L. Neste mesmo estudo, *Cryptosporidium* spp. foi detectado em 9,2% das amostras em concentrações entre 0,1 oocisto/L a 6 oocistos/L, destacando que a maioria das amostras positivas apresentaram concentração de 0,1 a 1,0 oocisto/L, pelo método de concentração por filtração em membranas de polycarbonato. Esses resultados confirmam uma variabilidade acentuada inerente as matrizes estudadas e a maior dificuldade em detectar os oocistos por ocorrerem em menor quantidade do que os cistos no

manancial analisado e por apresentarem menor tamanho, dificultando a visualização pela microscopia. (FRICKER e CRABB, 1998; DI GIORGIO; GONZALES; HUITT, 2002).

A presença dos protozoários patogênicos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em águas do rio Atibaia já é conhecida e atribuída, principalmente a lançamentos de esgotos domésticos não tratados nos mananciais da região (Bacia PCJ), bem como pelas fezes de animais contaminados, que ocupam áreas próximas à bacia hidrográfica, e são carregadas pela água da chuva (CETESB, 2012; CASTRO-HERMIDA et al, 2011)

Quanto aos experimentos controle com inoculo artificial (Color Seed®), os resultados obtidos com amostras de água bruta na faixa de turbidez até 30 NTU, não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre os métodos de FMx e FM ($p > 0,05$) para recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Ambos os métodos apresentaram maior eficiência de recuperação para cistos do que para oocistos (tabelas 4 e 5) e atenderam aos critérios de aceitação do Controle de Qualidade Analítica estabelecidos pela USEPA (13-111% para *Cryptosporidium* spp. e 15-118% para *Giardia* spp.) para detecção dos protozoários.

Nas amostras com turbidez entre 31 e 60 NTU novamente não houve diferença estatística significativa entre os métodos avaliados. No entanto, os valores de eficiência de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp por FMx não atenderam aos critérios do CQA da USEPA, como mostram as tabelas 4 e 5. Apesar de não ter sido apontado diferença estatística significativa quanto à eficiência de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por FM nesta faixa de turbidez, que apresentou valores dentro dos critérios de CQA da USEPA, o valor de p encontrado (0,07) esteve muito próximo de p estabelecido (0,05).

Nas amostras com turbidez entre 61 e 80 NTU, tanto FMx quanto FM apresentaram

médias de eficiência de recuperação superiores para cistos de *Giardia* spp. do que para oocistos de *Cryptosporidium* spp. (tabelas 4 e 5). Não houve diferença estatística significativa entre os métodos e ambos atenderam aos critérios de CQA da USEPA.

Tabela 4: Média da eficiência de recuperação (%) e desvio padrão de cistos de *Giardia* spp. por FM e FMx em amostras de água bruta do rio Atibaia inoculadas com Color Seed™, nas faixas de turbidez estudadas.

Faixas de Turbidez (NTU)	FM (%)	FMx (%)
até 30	30,0 ± 5,2	31,5 ± 5,4
31 - 60	25,8 ± 7,9	23,5 ± 5,1
61 - 80	31,0 ± 13,3	37,3 ± 13,1

Tabela 5: Média da eficiência de recuperação (%) e desvio padrão de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por FM e FMx em amostras de água bruta do rio Atibaia inoculadas com Color Seed™, nas faixas de turbidez estudadas.

Faixas de Turbidez (NTU)	FM (%)	FMx (%)
até 30	18,3 ± 3,1	16,8 ± 2,1
31 - 60	27,6 ± 10,3	11,8 ± 5,4
61 - 80	15,5 ± 5,3	15,5 ± 9,7

Dados da literatura atestam que a etapa de purificação por IMS, empregada nos experimentos de FMx, é influenciada negativamente por níveis de turbidez elevados, já que é uma etapa de captura dos cistos e oocistos livres e não daqueles ligados a matéria orgânica particulada. Além disso, a presença de metais pesados na água pode interferir na ligação das microesferas-anticorpo aos protozoários (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012). Neste trabalho, as amostras na faixa de turbidez de 31 – 60 NTU foram coletadas no período entre outubro de 2011 a fevereiro de 2012 (tabela 1), meses em que ocorrem grande quantidade de chuvas (pluviosidade média de 206,9 mm) e que apresentaram altas concentrações de ferro (até 12,8 mg/L) no rio Atibaia (SANASA, 2013). Vale ressaltar que

o Método 1623.1 prevê a remoção de materiais magnéticos visando à otimização da IMS (USEPA, 2012), fato este não presente no Método 1623 (USEPA, 2005).

Recentemente, Franco e colaboradores (2012b), obtiveram valores de recuperação para FMx que atenderam aos critérios estabelecidos pela USEPA, para ambos os protozoários (41,3% para *Giardia* spp. e 22,0% para *Cryptosporidium* spp.). Já quanto a FM, os valores de recuperação para oocistos de *Cryptosporidium* spp. não atenderam a estes critérios (1,1% e 2,75%), evidenciando assim, a dificuldade em detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. comparado a cistos de *Giardia* spp., e a variabilidade da eficiência de recuperação inerente aos métodos (CANTUSIO-NETO et al, 2010).

3. Conclusões

Ambos os métodos mostraram-se aplicáveis para a concentração de cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras hídricas, e demonstraram reprodutibilidades semelhantes nas amostras analisadas. A turbidez mostrou-se como um importante fator de influência no desempenho de ambos os métodos. No entanto, a FM apresenta como vantagem o menor custo para implementação e operação, além de a maior parte dos equipamentos necessários para execução já serem utilizados nas análises de rotina das Estações de Tratamento de Água.

5. Referências Bibliográficas

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Microbiological Examination. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21 ed. Washington: AWWA, 2005.
- ARAÚJO, R. S.; DROPA, M.; FERNANDES, L. N.; CARVALHO, T. T.; SATO, M. I. Z.; SOARES, R. M.; MATTE, R. M.; MATTE, M. H. Genotypic Characterization of

- Cryptosporidium hominis* from Water Samples in São Paulo, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.85, n.5, p.834–838, 2011.
- BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. **Water Research**, v.45, p.6603-6614, 2011.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Portaria 2.914** de 12 de Dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2011.
- CANTUSIO-NETO, R. **Estudos dos métodos: floculação em carbonato de cálcio e adaptação das técnicas de filtração em membrana e separação imunomagnética para a detecção *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras hídricas**. 2008. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- CANTUSIO-NETO, R.; SANTOS, L. U.; SATO M. I. Z.; FRANCO, R. M. B. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, Southeast Brazil. **Water Science & Technology – WST**, p.217-222, 2010.
- CASTRO-HERMIDA J.A.; GARCÍA-PRESEDO I.; ALMEIDA A.; GONZÁLEZ-WARLETA M.A.; DA COSTA J.M.C.; MEZO M.. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). **Science of the Total Environment**, v.409, p.2451–2459, 2011.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2011**. São Paulo: CETESB, 2012.
- DI GIORGIO C.L.; GONZALES, D.A.; HUITT C. *Cryptosporidium* an *Giardia* recoveries in natural waters by using EPA method 1623. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.5952-5955, 2002.
- FRANCO, R. M. B.; CANTUSIO NETO, R.; BRANCO, N. Detecção de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em água pela técnica de filtração em membrana: estudo comparativo entre diferentes técnicas de eluição. **J. Bras. Patol.**, v.37, n.4, p.205, 2001.
- FRANCO, R.M.B.; HACHICH, E.M.; SATO, M.I.Z.; NAVEIRA, R.M.L.; SILVA, E.C.; CAMPO, M.M.C.; CANTUSIO-NETO, R.; CERQUEIRA, D.A.; BRANCO, N.; LEAL, D.A. Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde.Brasília**, v.21, n.2, p.233-242, 2012.

- FRICKER, C.R.; CRABB, J. Waterborne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. **Adv. Parasitol.**, v.40, p.241-278, 1998.
- SANASA – Sociedade de Abastecimento de Água S/A. Disponível em www.sanasa.com.br. Acesso em: 31/05/2013. 2013.
- SATO, M.I.Z.; GALVANI, A.N.; PADULA, J.A.; NARDOCCI, A.C.; LAURETTO, M.S.; RAZZOLINI, M.T.P.; HACHICH, E.M. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Science of the Total Environment**, v.442, p.389–396, 2013.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Office of Water. Washington DC. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA**. EPA-815-R-05-002, 2005.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Office of Water. Washington DC. **Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA**. EPA-816-R-12-001, 2012.
- VESEY, G.; SLADE, J. S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; DENNIS, P. J.; FRICKER, C. R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **J. Appl. Bacteriol.**, v.75, p.82-86, 1993.
- WARNECKE, M.; WEIR, C. and VESEY, G. Evaluation of an internal positive control for *Cryptosporidium* and *Giardia* testing in water samples. **Appl. Microbiol.**, v.37, p.244-248, 2003.

Capítulo II

Immunomagnetic separation applied to detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples: comparison between acid and heat dissociation based on Method 1623

Pinto, D.O.¹, Santos, L.U.², Franco, R.M.B.¹, Cantusio-Neto, R.^{1,3}

1 – University of Campinas. Biology Institute (IB-UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

2 – University of Campinas. School of Civil Engineering, Architecture and Urbanism (FEC-UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

3 – Society for Water Supply and Sanitation S/A (SANASA), Campinas, São Paulo, Brazil.

Abstract

The objective of this work was to study the IMS purification phase by comparing acid and heat dissociation procedures and to investigate possible losses of target organism. Ultra pure water samples (n=24) were directly inoculated with microorganisms in an artificial pellet (Easy Seed™ BTF). For this purpose, there must be a known, large quantity of organisms in the sample, excluding interference from the concentration phase. Acid dissociation showed higher mean of efficiency recovery and precision than heat dissociation for *Giardia* spp. cysts. There were not significant statistic differences for *Cryptosporidium* spp. oocysts. The bead-cyst/bead-oocysts dissociation phase is fundamental for better results since a huge loss of organisms may take place in this phase, specifically including the cysts and oocysts that remain aggregated in the beads that stick to the magnet.

Key words: Waterborne protozoan, Governmental Decree 2.914/2011, IMS, ultra pure water.

Resumo

No presente trabalho foi estudada a etapa de purificação por Separação Imunomagnética (IMS) visando avaliar o desempenho da dissociação ácida e dissociação térmica. Foram investigadas também possíveis causas de perda dos organismos durante execução da IMS. Amostras de água ultra pura (n=24) foram processadas diretamente da etapa de purificação. Em cada uma das amostras foram inoculados artificialmente 100 cistos de *Giardia* spp. e 100 oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Easy Seed™BTF). A dissociação ácida apresentou maior média de eficiência de recuperação e precisão do que a dissociação térmica para cistos de *Giardia* spp.. Para oocistos de *Cryptosporidium* spp. não houve diferença estatística significativa. Após o procedimento de dissociação cistos de *Giardia* spp. e

oocistos de *Cryptosporidium* spp. continuaram aderidos nas *beads* que ficam retidas no imã.

Palavras-chave: Protozoários de veiculação hídrica, Portaria n. 2.914/2011, IMS, água ultra pura.

1. Introduction

Cryptosporidium spp. and *Giardia* spp. protozoa are some of the most significant waterborne contaminants in recent years (Franco, 2007). Both species are widespread in Brazil and around the globe. They are common in the water supply (Araújo et al., 2011; Baldursson & Karanis, 2011; Cantusio et al., 2010).

These pathogens have characteristics that increase the probability of waterborne dissemination. Their abundance and resistance to the environment, as well as their small cyst and oocyst size (types of resistance and transmission) enable them to cross the physical barriers of water treatment plants.

These characteristics, their resistance to common chemical disinfectants used in the plants, and their low infection dose are three of the key factors that contribute to the occurrence of documented cryptosporidiosis and giardiasis outbreaks (Karanis; Kourenti; Smith, 2007; Baldursson & Karanis, 2011).

These outbreaks show how important it is to study these protozoa in water and improve current detection methods. In Brazil, drinking water Regulation 2914/MS, published on December 12, 2011, mandates the monitoring of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts at the intake site when the geometric average of annual concentration of *Escherichia coli* is higher than 1000/100 mL (Brazil, 2011).

Currently, the official method for the detection of these pathogens in water samples is EPA Method 1623.1 (USEPA, 2012), an updated version of Method 1623. Among the

most important innovations are the new Quality Control (QC) acceptance criteria for average recovery and precision and insertion procedures to improve the purification step of IMS, such as the washing of beads attached to the tube, the removal of magnetic materials (Fe and others), the heat dissociation and pH.

The scope of the method retains the same structure as the original and consists basically of three phases: i) sample concentration; ii) sample purification through immunomagnetic separation (IMS); and iii) visualization and quantification of organisms by epifluorescence microscope by means of Immunofluorescence Assay (IFA) and a test confirming morphology using 4',6-diamidine-2-phenylindole (DAPI) staining and differential interference contrast (DIC) microscopy.

The IMS purification phase enables the microorganisms from the debris present in the samples to be separated, facilitating the visualization phase and reducing false positives. It offers a considerable improvement in the efficacy of the method (Quintero-Betancourt; Peele; Rose, 2004). IMS consists of a selective separation of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts. Separation uses uniform paramagnetic microscopic spheres covered with purified antibodies against the cysts and oocysts (Cantusio-Neto et al., 2010) that have been dissociated from organisms. The bead-organism complex undergoes either acid or heat dissociation (Ware et al., 2003; USEPA, 2012).

This work studied the IMS purification phase by comparing two dissociation procedures: acid and heat, and to investigate possible losses of target organisms.

2. Material and methods

2.1 Easy Seed™ BTF (Biotechnology Frontiers Australia)

It is a suspension test for *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts preserved in approximately 1 mL of saline solution. The test used a 5 mL vial and 100 organisms (± 1 DP). Each vial was sealed and sterilized by exposure to gamma radiation, guaranteeing stability and inactivity of organisms (Cantusio-Neto et al., 2011).

2.2. Assays

Twenty four experiments were performed to evaluate the performance of acid dissociation (12 experiments) and heat dissociation (12 experiments).

Giardia spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts were artificially inoculated into the sample at the beginning of the purification phase (Easy Seed™ BTF). Each sample contained 1 mL of Easy Seed™, 2mL of 0.05% Tween 20 to suspend the Easy Seed™ and clean the vial, and 7 mL of reagent water, for a total sample volume of 10 mL.

To carry out this analysis, there must be a significant known number of organisms in the sample, excluding interference from the concentration phase.

The study also considered analyzing the discharges of the magnetic particle concentrator (MPC-1 and MPC-S) and beads that can continue adhering to the magnet after the dissociation step (drops formed in the second magnet step, MPC-S).

For the evaluation of the MPC-1 and MPC-S magnetic concentrator residues, the excess volume was collected. It was processed in two ways: i) new IMS, separately using either acid or heat dissociation or; ii) evaluation of 10 uL aliquot of the pellet after

centrifuging (1500 x g for 15 min.). The material collected underwent visual characterization according to the protocol.

To evaluate the beads that could still be stuck to the magnet after the dissociation phase, 50 uL of reagent water was added to the “drop” formed after the second magnet was applied (MPC-S). The reagent water was added on the centrifuge vial wall. This material underwent visual characterization according to protocol (described below).

2.3. Purification

In the IMS purification phase of the samples (USEPA, 2005), Invitrogen GC-Combo Dynabeads® (lot 615376) were used according to the protocol of the supplier.

2.4. Acid dissociation

Fifty µL of 0.1 N HCl were added to the centrifuge tube wall. The sample was then vortexed for 50 seconds. The tube was kept at rest for 10 minutes, and vortexed again for 30 seconds. Immediately after this, the tubes were transferred to the magnetic particle concentrator (MPC-S) with magnetic tape, which attracts only the beads and allows the cysts and oocysts to remain in the liquid at the bottom of the tube.

The remaining volume of the tube was carefully pipetted into the IFA well, which had been previously prepared with 5 µL of NaOH 1 N (USEPA, 2005).

2.5. Heat dissociation

Fifty µL of reagent water were added to the wall of the microcentrifuge tube, which was immediately centrifuged for 50 seconds. After shaking, the microcentrifuge tube was transferred to the dry bath (Nova Ética® Thermo-block model 330 – 2D) at 80°C for 10 minutes and then centrifuged again for 30 seconds. After that, the tube was transferred to

the magnetic particle concentrator (MPC-S) with magnetic tape. Magnetic tape attracts only the beads, allowing the cysts and oocysts to remain in the liquid at the bottom of the tube. The remaining volume of the tube was carefully pipeted into the IFA well (Ware et al., 2003; USEPA, 2012).

2.6. *Imunofluorescence assay*

Samples were submitted to IFA using the Merifluor[®] kit (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio), for observation and quantification of cysts and oocysts. The preparations were examined in a Zeiss Axiolab epifluorescence microscope (USEPA, 2005).

2.7. *Statistical Analyses*

The results were statistically analyzed using the paired Student t test for comparison of means (Bilateral), considering a significance level of 5%, using the GraphPad Prism software (version 5.01).

3. Results and discussion

EPA Method 1623 has recently been revised in January 2012, the US EPA published version 1623.1, which contains changes in the Quality Control values of recovery efficiency and accuracy for *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts (USEPA, 2012).

According to this method, procedure validation studies require tests that are controllable and can be analyzed. They must also be accurate and recovery must be possible using experiments that prove the efficiency of the tested method. Thus, the average of the recovery efficiency and the relative standard deviation (RSD) of at least 4 assays

(n=4) must be calculated. These results must be in accordance with Quality Control values established in method 1623.1 (Table 1).

Table 1: Quality Control (QC) acceptance criteria for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in water samples, according to the Method 1623.1.

	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
Recovery mean (%)	38 – 100	27 – 100
RSD	37	39

The results of the average recovery efficiency of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts and the RSD values seen in this work for both acid dissociation and heat dissociation were within the limits set by method 1623 Quality Control (USEPA, 2005), shown on Table 2.

Table 2: Quality Control (QC) acceptance criteria for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in water samples, according to the Method 1623.

	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
Recovery mean (%)	24 – 100	24 – 100
RSD	55	49

Thus, the results obtained by acid dissociation remain within the range established by the new version, Method 1623.1, for both *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. However, heat dissociation had an average *Giardia* spp. recovery efficiency below the new standards and the relative standard deviation was not within limits established for *Cryptosporidium* spp.

For *Cryptosporidium* spp. oocysts, better recovery was observed when acid dissociation was used on the bead-oocysts complex, with an average of 57,2% recovery, whereas heat dissociation had 40,5% average recovery. Acid dissociation experiments for these protozoa were more accurate, according to RSD values (Table 3). However, there

were not significant statistic differences between acid and heat dissociation for *Cryptosporidium* spp. oocysts.

Table 3: Mean of recovery efficiency and Relative Standard Deviation (RSD) for *Cryptosporidium* spp. oocysts, with either acid or heat dissociation in the IMS purification phase in reagent water artificially inoculated with Easy Seed®.

	Acid	Heat
Recovery Mean (%)	57,2	40,5
RSD	21,8	55,7

The dissociation procedure in Method 1623 (USEPA, 2005) states that the reaction must be performed twice. In the first reaction most of the sample oocysts are recovered; however, the second dissociation reaction was very relevant since it does not add any extra cost and leads to an increase in *Cryptosporidium* spp. oocysts recovery of (11,0%) in acid and (15,9%) in heat reactions (Table 4).

Table 4: Mean of recovery efficiency (%) for *Cryptosporidium* spp. oocysts of the first and second dissociation reaction, using both acid or heat dissociation in the purification IMS phase in reagent water artificially inoculated with Easy Seed®.

	Acid		Heat	
Recovery Mean (%)	1 ^a dissoc.	2 ^a dissoc.	1 ^a dissoc.	2 ^a dissoc.
	51,5	5,7	34,6	5,5

For *Giardia* spp. cyst recovery, acid dissociation was more efficient than heat dissociation. Acid dissociation had an average recovery efficiency of 50% while heat had 25%. The assays using acid dissociation are more accurate than heat dissociation, according to RSD values (Table 5). The analyses showed significant statistical differences between acid and heat dissociation for *Giardia* spp. cysts.

Table 5: Mean of recovery efficiency (%) for *Giardia spp.* cysts, using acid or heat dissociation in the IMS purification phase in reagent water artificially inoculated with Easy Seed®.

	Acid	Heat
Recovery Mean (%)	50,4	25,1
RSD	28,2	72,3

The assays for *Giardia spp.* cysts demonstrated that in the second heat dissociation reaction, the majority of sample cysts are recovered. This is different from what was obtained in *Cryptosporidium spp.* oocysts assays. It is probable that the time required for bead-cyst dissociation is longer than the 10 minutes used in the first reaction, which is verified in the second reaction, which recovered twice as many cysts as the first reaction (Table 6).

Table 6: Mean of recovery efficiency (%) for *Giardia spp.* cysts of the first and second dissociation reactions, using, acid or heat dissociation in the IMS purification phase in reagent water artificially inoculated with Easy Seed®.

	Acid		Heat	
Recovery Mean (%)	1 ^a dissoc.	2 ^a dissoc.	1 ^a dissoc.	2 ^a dissoc.
	39,3	11,1	8,3	16,8

Note that the hydrophobic behavior of *Giardia spp.* cysts (Cantusio-Neto, 2008) may contribute to hinder bead-cyst separation in aqueous media. *Giardia spp.* cysts are also larger than *Cryptosporidium spp.* oocysts and their wall is almost entirely made up of carbohydrates with a few peptides (43% dry mass), which in turn may influence this process.

Acid dissociation of the cysts has the same pattern as with the oocysts. Most of the cysts were recovered in the first reaction, though when the second reaction was performed, recovery increased by 28%, confirming the importance of this phase for better *Giardia spp.* cyst recovery results (Table 6).

The recovery efficiency of organisms varies widely in the methods currently established for protozoa detection (Cantusio-Neto et al., 2010). This variability is due to losses throughout sample processing, from concentration to the immunofluorescence reaction in the visualization phase. There are also differences between commercially available kits and differences in characteristics of the matrix when analyzing raw water (Quintero-Betancourt; Peele; Rose, 2004; Hu et al., 2004; Warnecke; Weir; Vesey., 2003).

The IMS purification phase is very delicate and must be skillfully done, which is probably the main cause for cyst and oocyst loss. In this phase, the complete dissociation of the bead-cyst and bead-oocyst complex is fundamental for good results, so the choice of dissociation procedure (acid or heat) is very important.

For the residues from the magnetic particle concentrators (MPC-1 and MPC-S), no cysts or oocysts were found in this material, demonstrating that this phase of the procedure does not generally cause a significant loss of organisms. Special attention must be given to carrying out the procedure (IMS), which requires good skills and directly influences the results.

For the evaluation of the beads that remain stuck to the magnet after dissociation in the “drop” formed in the second magnet phase (MPC-S), the analyzed material still contained 10% cysts and 5% oocysts for both dissociation procedures. This is one of the main causes of reduced recovery of organisms (Figure 1).

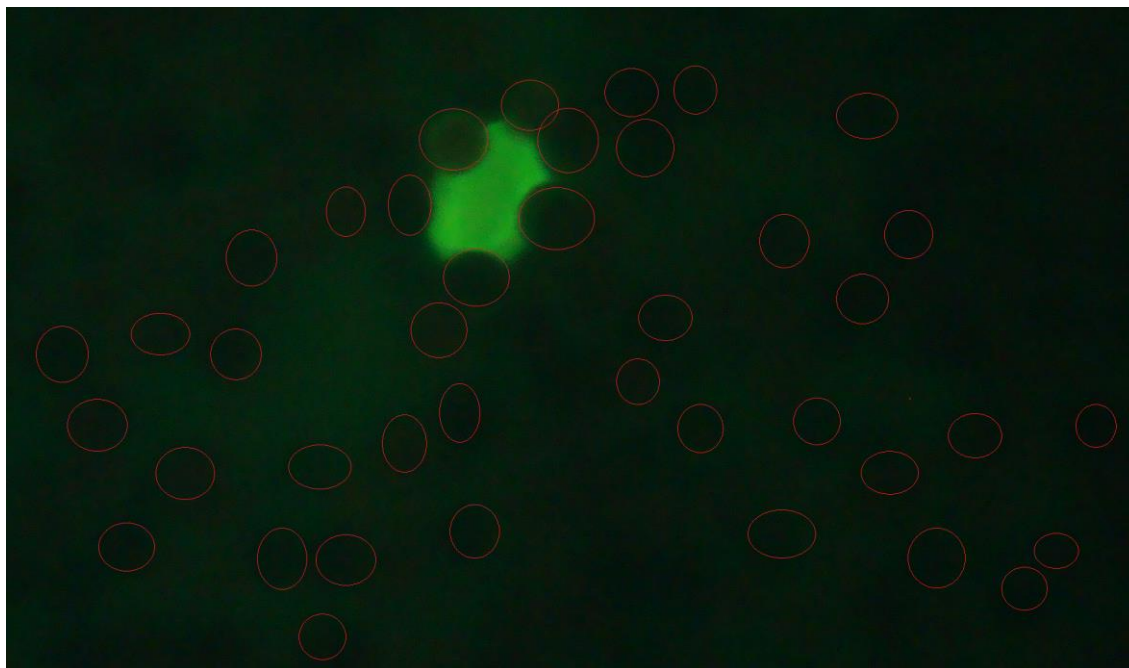


Figure 1: *Giardia* spp. cysts (magnification 600X) present in the beads remaining attached to the magnet (MPC-S), after imunofluorescence assay. Some of beads present in the visual field were artificially marked on photo (red circles) for better viewing.

Heat dissociation was proposed by Ware and colleagues in 2003 as an alternative to an improved acid dissociation procedure for *Cryptosporidium* spp. oocysts in water, although it is also used for *Giardia* spp. cysts. Ware has shown average oocyst recovery in reagent water of 71% through heat and 41% through acid dissociation. The authors claimed that in an acid medium, the reaction pH is altered, reducing antibody binding and fluorochrome expression. However, in the acid dissociation experiments, after incubating the sample in 50 uL of HCl 0.1 N for 10 minutes at room temperature as specified in Method 1623, Ware transfers the oocysts, isolated from the beads by the magnetic bar, to another tube with 5 uL of NaOH 1 N and 50 uL of reagent water, and they are incubated for 10 more minutes at 80 °C. This incubation and the temperature increase to 80°C, which are not described in Method 1623, may have contributed to the pH alteration of the reaction, compromising the stability and action of the antibodies (Cook et al., 2006) that are directed

and bound to the oocyst epitopes. This modification to the procedure in Method 1623 resulted in a lower recovery rate for acid dissociation of the *Cryptosporidium* spp. oocysts.

In this study, this hypothesis was evaluated through acid dissociation according to Ware et al. (2003). The recovery efficiency found for *Giardia* spp. cysts was 37% and *Cryptosporidium* spp. oocysts was 32%, lower than the values obtained here. Acid dissociation was carried out as described in Method 1623 (without incubation at 80 °C) and had higher recovery efficiency and was more accurate in the assays for both protozoa (Table 3 and 5).

There was probably no pH alteration during the dissociation procedure, according to Ware et al. (2003). It may have led to smaller losses than heat dissociation. It is also likely that the increase in incubation time during heat dissociation contributes to better recovery results.

4. Conclusion

Acid dissociation was more efficient than heat dissociation for *Giardia* spp. cysts. Acid had better average recovery and was also more accurate in the assays. There was no statistically significant difference between acid and heat dissociation for *Cryptosporidium* oocysts. The experiments also showed that the bead-cyst and bead-oocyst dissociation phase is fundamental for better results since a significant loss of organisms may take place in this phase, specifically including the cysts and oocysts that remain stuck to the beads in the drop formed in the second magnetic step.

5. References

- ARAÚJO, R. S.; DROPA, M.; FERNANDES, L. N.; CARVALHO, T. T.; SATO, M. I. Z.; SOARES, R. M.; MATTÉ, R. M.; MATTÉ, M. H. Genotypic Characterization of *Cryptosporidium hominis* from Water Samples in São Paulo, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.85, n.5, p.834–838, 2011.
- BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. *Water Research*, v.45, p.6603-6614, 2011.
- BRAZIL. Ministry of Health. - **Decree n° 2914**, December, 12, 2011. The Ministry of Health of Brazil establishes the procedures and responsibilities related to the control and surveillance of the quality of water for human consumption and its potability standards. 2011.
- CANTUSIO-NETO, R. **Estudos dos métodos: floculação em carbonato de cálcio e adaptação das técnicas de filtração em membrana e separação imunomagnética para a detecção *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras hídricas.** 2008. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- CANTUSIO-NETO, R.; SANTOS, L. U.; SATO M. I. Z.; FRANCO, R. M. B. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, Southeast Brazil. *Water Science & Technology – WST*, p.217-222, 2010.
- CANTUSIO-NETO, R.; SANTOS, L.U.; SATO, M.I.Z.; FRANCO, R.M.B. Controle de qualidade analítica dos métodos utilizados para a detecção de protozoários patogênicos em amostras de água. *Arquivos Instituto Biológico*, v.78, n.1, p.169-174, 2011.
- COOK, N.; PATON, C.A.; WILKINSON, N.; NICHOLS, R.A.B.; BARKER, K.; SMITH, H.V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. *International Journal Food Microbiology*, v.109, n.3, p.215-221, 2006.
- FRANCO, R.M.B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. *Revista Panamericana Infectologia*, v.9, n.4, p.36-43, 2007.
- HU, J.; FENG, Y.; ONG, S.L.; NJ, W.J.; SONG, L.; TAN, X.; CHU, X. Improvement of recoveries for the determination of protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water using method 1623. *Journal Microbiology Methods*, v.58, p.321-325, 2004.

- KARANIS P.; KOURENTI C.; SMITH H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal Water Health**, v.5, n.1, p.1-38. 2007.
- QUINTERO-BETANCOURT, W.; PEELE, E.R.; ROSE, J.B. Drinking Water treatment process for removal *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Vet. Parasitol.**, v.126, p.219-234, 2004.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Office of Water. Washington DC. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA**. EPA-815-R-05-002, 2005.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Office of Water. Washington DC. **Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA**. EPA 816-R-12-001, 2012.
- WARE, M.W.; WYMER, L.; LINDQUIST, H.D.A; SCHAFFER, F.W. Evaluation of an alternative IMS dissociation procedure for use with Method 1622: detection of *Cryptosporidium* in water. **Journal Microbiology Methods**, v.55, p.575-83, 2003.
- WARNECKE, M.; WEIR, C. and VESEY, G. Evaluation of an internal positive control for *Cryptosporidium* and *Giardia* testing in water samples. **Appl. Microbiol.**, v.37, p.244-248, 2003.

6. Considerações Finais

Atualmente, a necessidade do monitoramento dos protozoários patogênicos *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas destinadas ao consumo humano é evidente. Fato este comprovado pelos surtos causados por estes patógenos nos últimos anos, bem como suas implicações em saúde pública, saúde ambiental e economia das regiões atingidas.

Diante dessa realidade muitos países, como EUA, Canadá, Nova Zelândia e outros, possuem legislações aplicadas ao controle de qualidade da água para consumo humano que contemplam a obrigatoriedade deste monitoramento. O Brasil obteve uma grande conquista em prol da saúde pública quando o Ministério da Saúde emitiu a Portaria n. 2914, em 12 de dezembro de 2011. Com esta publicação todos os municípios brasileiros, por meio dos seus Sistemas de Abastecimentos de Água (SAA) ou Soluções Alternativas Coletivas (SAC) têm 24 meses (a partir data da publicação) para se adequarem às novas exigências, como o monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em mananciais de captação de água para consumo humano, em função da concentração de *Escherichia coli*.

No entanto, como é de conhecimento geral, o Brasil é um país de enormes disparidades sócio-econômicas e a legislação de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano deve atentar-se a estas discrepâncias, a fim de garantir que as exigências sejam atendidas por todos os municípios sem que haja prejuízo na qualidade técnica.

No entanto, não basta tornar uma determinada análise obrigatória quando se tem conhecimento de que, na realidade, a grande maioria dos municípios (SAA ou SAC) não

terá condições de executá-la. É necessário ter, além de uma legislação tecnicamente atualizada como a nossa Portaria n. 2.914/2011, planos de ação para que os 5.564 municípios brasileiros tenham condições de fornecerem água em quantidade suficiente e qualidade necessária, conforme os princípios do Sistema Único de Saúde (SUS).

Portanto, é necessária a viabilização de recursos financeiros em prol de investimentos em infra-estrutura nos laboratórios das Estações de Tratamento de Água (ETA), do treinamento continuado de recursos humanos para que estejam capacitados a executar métodos complexos como os utilizados no monitoramento dos protozoários, objeto deste estudo.

Neste trabalho foi demonstrado que é possível, utilizando-se de métodos economicamente acessíveis como a Filtração em Membranas e sem o uso da IMS, realizar o monitoramento de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em águas, de forma fidedigna e com o mesmo nível de qualidade e precisão oferecida pelos métodos oficiais.

Investimentos financeiros fazem-se necessário também na área de ciências e tecnologia visando o incentivo às pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos analíticos, assim como o aprimoramento e otimização daqueles já existentes. A purificação por IMS é uma etapa que apresenta alto grau de dificuldade de execução e é muito utilizada nas pesquisas em parasitologia ambiental. Este estudo demonstrou que esta etapa apresenta pontos de atenção, como as perdas de organismos alvo após o procedimento de dissociação e isso, portanto, deve ser levado em consideração em pesquisas subseqüentes.

Por fim, os trabalhos e estudos na área da qualidade da água para consumo humano devem sempre apresentar como principal objetivo a garantia da qualidade. Portanto, deverão focar na prevenção da contaminação microbiológica e química da água de

abastecimento, contribuindo para importantes mudanças de orientação sob o ponto de vista de saúde pública e de paradigma na abordagem da gestão dos sistemas de abastecimento de água para consumo humano. Desta maneira, poderemos buscar garantir a qualidade da água desde sua captação na fonte até a torneira do consumidor.

7. Referências Bibliográficas

- ALDOM, J.E.; CHAGLA, A.H. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by membrane filter dissolution method. **Let. Appl. Microbiol.**, v.20, p.186-187, 1995.
- ALLEN, M.J.; CLANCY, J.L.; RICE, E.W. The plain, hard truth about pathogen monitoring. **J. AWWA**, v.92, n.2, p.64-76, 2000.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological Examination. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21 ed. Washington: AWWA, 2005.
- ANA - AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. Disponível em: <<http://www.agua.org.br/>>. Acessado em: 13/05/2013.
- ARAÚJO, R. S.; DROPA, M.; FERNANDES, L. N.; CARVALHO, T. T.; SATO, M. I. Z.; SOARES, R. M.; MATTÉ, R. M.; MATTÉ, M. H. Genotypic Characterization of *Cryptosporidium hominis* from Water Samples in São Paulo, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.85, n.5, p.834–838, 2011.
- BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. **Water Research**, v.45, p.6603-6614, 2011.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Portaria 518** de 25 de Março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2004.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Portaria 2.914** de 12 de Dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2011.
- BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Resolução nº357** de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, e dá outras providências. 2005.
- CANTEY, P.T.; ROY, S.; LEE B.; CRONQUIST, A.; SMITH, K.; LIANG, J.; BEACH, M.J. Study of Nonoutbreak Giardiasis: Novel Findings and Implications for Research. **The American Journal of Medicine**, v.124, n.12, 2011.
- CANTUSIO-NETO, R.; FRANCO, R.M.B. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in different water treatment processes at Campinas, São Paulo, Brazil. **Higiene Alimentar**, v.18, p.52–9, 2004.

- CANTUSIO-NETO, R. **Estudos dos métodos: floculação em carbonato de cálcio e adaptação das técnicas de filtração em membrana e separação imunomagnética para a detecção *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras hídricas.** 2008. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- CANTUSIO-NETO, R.; SANTOS, L.U.; SATO M.I.Z.; FRANCO, R.M.B. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, Southeast Brazil. **Water Science & Technology**, v.62, n.1, p.217-222, 2010.
- CANTUSIO-NETO, R.; SANTOS, L.U.; SATO, M.I.Z.; FRANCO, R.M.B. Controle de qualidade analítica dos métodos utilizados para a detecção de protozoários patogênicos em amostras de água. **Arquivos Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.169-174, 2011.
- CARRENO, R.A.; POKORNY, N.J.; WEIR, S.C.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Decrease in *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in vitro by using the membrane filter dissolution method for recovering oocyst from water samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.7, n.7, p.3309-3313, 2001.
- CASTRO-HERMIDA, J.A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; DA COSTA, J.M.C.; MEZO, M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). **Science of the Total Environment**, v.409, p.2451–2459, 2011.
- CDC, 2013a – Center for Disease Control and Prevention. **Parasites – Cyclosporiasis.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/>>. Acessado em: 01/06/2013.
- CDC, 2013b – Center for Disease Control and Prevention. **Parasites – Cryptosporidiosis.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/crypto/disease.html>>. Acessado em: 01/06/2013.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Determinação de *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp em esgoto tratado pela técnica de filtração, separação imunomagnética e microscopia de imunofluorescência.** Laboratório de Referência em Microbiologia Aplicada ao Saneamento Ambiental. 2009.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2011.** São Paulo: CETESB, 2012.
- CHALMERS, R.M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends in Parasitology**, v.29, p.237-251, 2013.

- CLANCY, J.L.; BUKHARI, Z.; MCCUIN, R.M.; MATHESON, Z.; FRICKER, C.R. USEPA Method 1622. **J. AWWA**, v.91, p.60-67, 1999.
- CONSÓRCIO PCJ, 2012. **Consórcio da Bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí**. Disponível em: <<http://www.agua.org.br>>. Acessado em: 25/05/2013.
- COOK, N.; PATON, C.A.; WILKINSON, N.; NICHOLS, R.A.B.; BARKER, K.; SMITH, H.V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. **International Journal Food Microbiology**, v.109, n.3, p.215-221, 2006.
- CRAIK, S.A.; WELDON, D.; FINCH, G.R.; BOLTON, J.R.; BELOSEVIC, M. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium and low pressure ultraviolet radiation. **Wat. Res.**, v.35, p.1387-1398, 2001.
- CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; CRAUN, M.F. Outbreaks associated with recreational water in the United States. **Int. J. Environ. Health Res.**, v.15, p.243-262, 2005.
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica. Manual das doenças transmitidas por alimentos. **Ciclosporíases / Cyclospora caytanensis**, 2000. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/inf_cyclospora.htm>. Acessado em: 01/06/2013.
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica. Manual das doenças transmitidas por alimentos. **Cryptosporidium parvum / Criptosporidiose**, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/ifnet_cryptos.pdf>. Acessado em: 01/06/2013.
- DAWSON, D.J.; MADDOCKS, M.; ROBERTS, J.; VIDLER, J.S. Evaluation of recovery of *Cryptosporidium parvum* oocysts using membrane filtration. **Letters Appl. Microbiol.**, v.17, p.276-279, 1993.
- DI GIORGIO, C.L.; GONZALES, D.A.; HUITT C. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using EPA method 1623. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.5952-5955, 2002.
- DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.11, p.1257–1278, 2008.
- EDUARDO, M.P.; VILELA, D.B.; ALVAREZ, G.G.; CARMO, G.M.I.; REINA, M.C.F.P.; EID, V.R.T.; VIEIRA, A.M.; CALDEIRA, R.P.; BALDI, E.R.S.S.; ELMEC, A.M.; SILVA, A.J. Primeiro surto de *Cyclospora cayetanensis* investigado no Brasil,

- ocorrido em 2000, no município de General Salgado (SP), e medidas de controle. In: **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPa)**, v.5, n.49, p.5-11, 2008.
- FRANCO, R.M.B.; CANTUSIO-NETO, R.; BRANCO, N. Detecção de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em água pela técnica de filtração em membrana: estudo comparativo entre diferentes técnicas de eluição. **J. Bras. Patol.**, v.37, n.4, p.205, 2001.
- FRANCO, R.M.B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana Infectologia**, v.9, n.4, p.36-43, 2007.
- FRANCO R.M.B.; BRANCO N.; LEAL D.A.G. Parasitologia Ambiental: Métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, n.2, p.119-135, 2012a.
- FRANCO, R.M.B.; HACHICH, E.M.; SATO, M.I.Z.; NAVEIRA, R.M.L.; SILVA, E.C.; CAMPO, M.M.C.; CANTUSIO-NETO, R.; CERQUEIRA, D.A.; BRANCO, N.; LEAL, D.A. Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde.Brasília**, v.21, n.2, p.233-242, 2012b.
- FRICKER, C.R.; CRABB, J. Waterborne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. **Adv. Parasitol.**, v.40, p.241-278, 1998.
- FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. MOURA, J.E.; PENAFORTE, C.; KERTI, R.; DAUFENBACH, L.Z.; CAMARGO, N.J.; TREVISAN, R.; SILVA, L.A.; SANTOS, S.F.; ASSAMURA, M.H.; SILVEIRA, N.T.M.; GEROLOMO, M.; CALIXTO, C.E.A; FLORIANO, N.R.; GARRETT, D.O. **Surto de doença diarreica aguda por *Cyclospora cayetanensis* em Antonina – Paraná.** Boletim Eletrônico Epidemiológico. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano02_n07_surto_diarreia_cyclospora_pr.pdf>. 2002a.
- FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. MOURA, L.; WADA, M.Y.; CARMO, E.H.; DUSI, R.M.; TUBOI, S.H.; DAUFENBACH, L.Z.; CARMO, G.M.I; MURICY, C.M.; ARAÚJO, W.N.; SIQUEIRA, A.A.; RAMALHO, V.M.; CAMARGO, N.J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R.M.T.; MAZZOTINI, A.E.A; FELIPE, C.K.K.; GARRETT, D.O. **Surto de toxoplasmose no município de Santa Isabel do Ivaí – Paraná.** Boletim Epidemiológico Eletrônico. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano02_n07_surto_toxoplasmose_per.pdf>. 2002b.

- GALE, P.; STANFIELD, G. *Cryptosporidium* during a simulated outbreak. **J. Am. Water Works Assoc.**, v.92, p.105-116, 2000.
- GIRONES, R.; FERRÚS, M.A.; ALONSO, J.L.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; CALGUA, B.; CORRÊA, A.A.; HUNDESA, A.; CARRATALA, A.; BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. **Water Research**. v.44, n.15, p.4325-4339, 2010.
- HEALTH CANADA. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality – Summary Table**. Prepared by the Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. 2012.
- HEALTH CANADA. **Turbidity in Drinking Water**. Document for Public Consultation. Prepared by the Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. 2012b.
- HIJNEN, W.; BEERENDONK, E.F.; MEDEMA, G.J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. **Wat. Res.**, v.40, p.3-22, 2006.
- HU, J.; FENG, Y.; ONG, S.L.; NJ, W.J.; SONG, L.; TAN, X.; CHU, X. Improvement of recoveries for the determination of protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water using method 1623. **Journal Microbiology Methods**, v.58, p.321-325, 2004.
- INSTITUTO TRATA BRASIL. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/situacao-no-mundo-2>>. Acessado em: 26/06/2013.
- JAKUBOWSKI, W.; BOUTROS, S.; FABER, W.; FAYER, R.; GHIORSE, W.; LECHEVALLIER, M.; ROSE, J.; SCHAUB, S.; SINGH, A.; STEWART, M. Environmental methods for *Cryptosporidium*. **J. Am. Water Works Assoc.**, v.88, p.107-121, 1996.
- JUNQUEIRA, V.C.A; CANTUSIO-NETO, R; SILVA, N.; TERRA, J.H. Comparison of methods for the enumeration of *Clostridium perfringens* spores in water. **Water Science & Technology**, v. 65, p.227-232, 2012.
- KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal Water Health**, v.5, n.1, p.1-38, 2007.
- KATZ, D.E.; HEISEY-GROVE, D.; BEACH, M.; DICKER, R.C.; MATYAS, B.T. Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. **Epidemiology and Infection**, v.134, n.5, p. 935-941, 2006.

- MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B.; DAVIS, J.P. A massive outbreak in milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine**, v.331, n.3, p.161-167, 1994.
- MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J.G. Check list of fresh-water *Copepoda Calanoida* from São Paulo State, Brazil. **Biota Neotrop.**, v.11, n.1, p.551-557, 2011.
- McCUIM, R.M.; CLANCY, J.L. Modifications to Unites States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.267–274, 2003.
- MINISTRY OF HEALTH. **Drinking-water Standards for New Zealand 2005 (Revised 2008)**. Wellington: Ministry of Health.
- MORRISON, H.G.; MCARTHUR, A.G.; GILLIN, F.D.; ALEY, S.B.; ADAM, R.D.; OLSEN, G.J.; BEST, A.A.; CANDE, W.Z.; CHEN, F.; CIPRIANO, M.J. *et al.* Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Science**, v.317, p.1921-6, 2007.
- MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; WADA, M.Y.; JONES, J.L.; TUBOI, S.H.; CARMO, E.H.; RAMALHO, W.R.; CAMARGO, N.J.; TREVISAN,R.; GRAÇA, R.M.T.; SILVA, A.J.; MOURA, I.; DUBEY, J.P.; GARRETT, D.O. Waterborne Toxoplasmosis, Brazil, from Field to Gene. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.2, p.326-329, 2006.
- MUSIAL, C.E.; ARROWOOD, M.J.; STERLING, G.R.; GERBA, C.P. Detection of *Cryptosporidium* in water using Polypropylene Cartridge Filters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, p.687-692, 1987.
- NHMRC - National Resource Management Ministerial Council. **Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy**. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, Canberra. 2011.
- OKHUYSEN, P.C.; CHAPPELL, C.L. *Cryptosporidium* virulence determinants – are we there yet? **Int. J. Parasitol.**, v.32, p.517-525, 2002.
- ONGERTH, J.E.; STIBBS, H.H. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in River Water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, p.672-676, 1987.

- PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v.213, p.321-333, 2010.
- QUINTERO-BETANCOURT, W.; PEELE, E.R.; ROSE, J.B. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. **Journal of Microbiological Methods**, v.49, p.209–224, 2002.
- QUINTERO-BETANCOURT, W.; PEELE, E.R.; ROSE, J.B. Drinking Water treatment process for removal *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Vet. Parasitol.**, v.126, p.219-234, 2004.
- RAN, Z.; LI, S.; HUANG, J.; YUAN, Y.; CHUI, X.; WILLIAMS, C.D. Inactivation of *Cryptosporidium* by ozone and cell ultrastructures. **J. Environ. Sci.**, v.22, p.1954-1959, 2010.
- REBOUÇAS, A.C.; BRAGA, B.; TUDISI, J.G. **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. São Paulo: Escrituras, 2002.
- ROSE J.B.; HUFFMAN, D.E.; GENNACARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.26, p.113-123, 2002.
- SANASA - Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A. Disponível em: <<http://www.sanasa.com.br>>. Acessado em: 18/05/2013, 31/05/2013.
- SANTOS, L.U.; ALVES, D.P.; GUARALDO, A.N.A; CANTUSIO-NETO, R.; DURIGAN, M.; FRANCO, R.M.B. Infectivity of *Giardia duodenalis* Cysts from UV Light-Disinfected Wastewater Effluent Using a Nude BALB/c Mouse Model. **ISRN Parasitology**. 2013.
- SATO, M.I.Z.; GALVANI, A.N.; PADULA, J.A.; NARDOCCI, A.C.; LAURETTO, M.S.; RAZZOLINI, M.T.P.; HACHICH, E.M. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Science of the Total Environment**, v.442, p.389–396, 2013.
- SCHUSTER, C.J.; ELLIS, A.G.; ROBERTSON, W.J.; CHARRON, D.F.; ARAMINI, J.J.; MARCHAL, B.J.; MEDEIROS, D.T. Infectious disease outbreaks related to drinking water in Canada, 1974-2001. **Canadian J. Pub. Health**, n.96, p.254-258, 2005.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.; GOMES, R.A.R.. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. v. 1. 632p .

- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **ICR Protozoan Method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by fluorescent antibody procedure.** EPA/814-B-95-003, 1995.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Water. Washington DC. **Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA.** EPA-821-R-98-010, 1998.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Water. Washington DC 20460. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA.** EPA-821-R-99-006, 1999.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Water. Washington DC. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA.** EPA-815-R-05-002, 2005.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Water. Washington DC. **Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA.** EPA-816-R-12-001, 2012a.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Water U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC. **Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories.** EPA 822-S-12-001, 2012b.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Disponível em <http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms55.cfm>. Atualizado em 06/03/2012. 2012 c.
- VESEY, G.; SLADE, J. S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; DENNIS, P. J.; FRICKER, C. R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **J. Appl. Bacteriol.**, v.75, p.82-86, 1993.
- WARE, M.W.; WYMER, L.; LINDQUIST, H.D.A; SCHAFFER, F.W. Evaluation of an alternative IMS dissociation procedure for use with Method 1622: detection of *Cryptosporidium* in water. **Journal Microbiology Methods**, v.55, p.575-83, 2003.
- WARNECKE, M.; WEIR, C.; VESEY, G. Evaluation of an internal positive control for *Cryptosporidium* and *Giardia* testing in water samples. **Appl. Microbiol.**, v.37, p.244-248, 2003.
- WHO – World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality.** 4. ed. 2011.
- WU, M.; BRIDLE, H.; BRADLEY, M. Targeting *Cryptosporidium parvum* capture. **Wat. Res.**, v.46, p.1715-1722, 2012.

8. Anexo: Portaria n. 2.914/2011

ADVERTÊNCIA

Este texto não substitui o publicado no Diário Oficial da União



Ministério da Saúde Gabinete do Ministro

PORTARIA Nº- 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011(*)

Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

O MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE, no uso da atribuição que lhe confere os incisos I e II do parágrafo único do art. 87 da Constituição, e

Considerando a Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, que configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas;

Considerando a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes;

Considerando a Lei nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997, que institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989;

Considerando a Lei nº 11.107, de 6 de abril de 2005, que dispõe sobre normas gerais de contratação de consórcios públicos;

Considerando a Lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007, que estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico; altera as Leis nºs 6.766, de 19 de dezembro de 1979, 8.036, de 11 de maio de 1990, 8.666, de 21 de junho de 1993, 8.987, de 13 de fevereiro de 1995; e revoga a Lei nº 6.528, de 11 de maio de 1978;

Considerando o Decreto nº 79.367, de 9 de março de 1977, que dispõe sobre normas e o padrão de potabilidade de água;

Considerando o Decreto nº 5.440, de 4 de maio de 2005, que estabelece definições e procedimentos sobre o controle de qualidade da água de sistemas de abastecimento e institui mecanismos e instrumentos para divulgação de informação ao consumidor sobre a qualidade da água para consumo humano; e Considerando o Decreto nº 7.217, de 21 de junho de 2010, que regulamenta a Lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007, que estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico, resolve:

Art. 1º Esta Portaria dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

CAPÍTULO I DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

§ 5º Na proporção de amostras com resultado positivo admitidas mensalmente para coliformes totais no sistema de distribuição, expressa no Anexo I desta Portaria, não são tolerados resultados positivos que ocorram em coleta, nos termos do § 1º deste artigo.

§ 6º Quando o padrão microbiológico estabelecido no Anexo I desta Portaria for violado, os responsáveis pelos sistemas e soluções alternativas coletivas de abastecimento de água para consumo humano devem informar à autoridade de saúde pública as medidas corretivas tomadas.

§ 7º Quando houver interpretação duvidosa nas reações típicas dos ensaios analíticos na determinação de coliformes totais e *Escherichia coli*, deve-se fazer a coleta.

Art. 28. A determinação de bactérias heterotróficas deve ser realizada como um dos parâmetros para avaliar a integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede).

§ 1º A contagem de bactérias heterotróficas deve ser realizada em 20% (vinte por cento) das amostras mensais para análise de coliformes totais nos sistemas de distribuição (reservatório e rede).

§ 2º Na seleção dos locais para coleta de amostras devem ser priorizadas pontas de rede e locais que alberguem grupos populacionais de risco à saúde humana.

§ 3º Alterações bruscas ou acima do usual na contagem de bactérias heterotróficas devem ser investigadas para identificação de irregularidade e providências devem ser adotadas para o restabelecimento da integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede), recomendando-se que não se ultrapasse o limite de 500 UFC/mL.

Art. 29. Recomenda-se a inclusão de monitoramento de vírus entéricos no(s) ponto(s) de captação de água proveniente(s) de manancial(is) superficial(is) de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico.

Art. 30. Para a garantia da qualidade microbiológica da água, em complementação às exigências relativas aos indicadores microbiológicos, deve ser atendido o padrão de turbidez expresso no Anexo II e devem ser observadas as demais exigências contidas nesta Portaria.

§ 1º Entre os 5% (cinco por cento) dos valores permitidos de turbidez superiores ao VMP estabelecido no Anexo II desta Portaria, para água subterrânea com desinfecção, o limite máximo para qualquer amostra pontual deve ser de 5,0 uT, assegurado, simultaneamente, o atendimento ao VMP de 5,0 uT em toda a extensão do sistema de distribuição (reservatório e rede).

§ 2º O valor máximo permitido de 0,5 uT para água filtrada por filtração rápida (tratamento completo ou filtração direta), assim como o valor máximo permitido de 1,0 uT para água filtrada por filtração lenta, estabelecidos no Anexo II desta Portaria, deverão ser atingidos conforme as metas progressivas definidas no Anexo III desta Portaria.

§ 3º O atendimento do percentual de aceitação do limite de turbidez, expresso no Anexo II desta Portaria, deve ser verificado mensalmente com base em amostras, preferencialmente no efluente individual de cada unidade de filtração, no mínimo diariamente para desinfecção ou filtração lenta e no mínimo a cada duas horas para filtração rápida.

Art. 31. Os sistemas de abastecimento e soluções alternativas coletivas de abastecimento de água que utilizam mananciais superficiais devem realizar monitoramento mensal de *Escherichia coli* no(s) ponto(s) de captação de água.

§ 1º Quando for identificada média geométrica anual maior ou igual a 1.000 *Escherichia coli*/100mL deve-se realizar monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no(s) ponto(s) de captação de água.

§ 2º Quando a média aritmética da concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. for maior ou igual a 3,0 oocistos/L no(s) ponto(s) de captação de água, recomenda-se a obtenção de efluente em filtração rápida com valor de turbidez menor ou igual a 0,3 uT em 95% (noventa e cinco por cento) das amostras mensais ou uso de processo de desinfecção que comprovadamente alcance a mesma eficiência de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

§ 3º Entre os 5% (cinco por cento) das amostras que podem apresentar valores de turbidez superiores ao VMP estabelecido no § 2º do art. 30 desta Portaria, o limite máximo para qualquer amostra pontual deve ser menor ou igual a 1,0 uT, para filtração rápida e menor ou igual a 2,0 uT para filtração lenta.

§ 4º A concentração média de oocistos de *Cryptosporidium* spp. referida no § 2º deste artigo deve ser calculada considerando um número mínimo de 24 (vinte e quatro) amostras uniformemente coletadas ao longo de um período mínimo de um ano e máximo de dois anos.

Art. 32. No controle do processo de desinfecção da água por meio da cloração, cloraminação ou da aplicação de dióxido de cloro devem ser observados os tempos de contato e os valores de concentrações residuais de desinfetante na saída do tanque de contato expressos nos Anexos IV, V e VI desta Portaria.

§ 1º Para aplicação dos Anexos IV, V e VI deve-se considerar a temperatura média mensal da água.

§ 2º No caso da desinfecção com o uso de ozônio, deve ser observado o produto, concentração e tempo de contato (CT) de 0,16 mg.min/L para temperatura média da água igual a 15º C.

§ 3º Para valores de temperatura média da água diferentes de 15º C, deve-se proceder aos seguintes cálculos:

I - para valores de temperatura média abaixo de 15º C: duplicar o valor de CT a cada decréscimo de 10º C.

II - para valores de temperatura média acima de 15º C: dividir por dois o valor de CT a cada acréscimo de 10º C.

§ 4º No caso da desinfecção por radiação ultravioleta, deve ser observada a dose mínima de 1,5 mJ/cm² para 0,5 log de inativação de cisto de *Giardia* spp.

Art. 33. Os sistemas ou soluções alternativas coletivas de abastecimento de água supridas por manancial subterrâneo com ausência de contaminação por *Escherichia coli* devem realizar cloração da água mantendo o residual mínimo do sistema de distribuição (reservatório e rede), conforme as disposições contidas no art. 34 desta Portaria.

§ 1º Quando o manancial subterrâneo apresentar contaminação por *Escherichia coli*, no controle do processo de desinfecção da água, devem ser observados os valores do produto de concentração residual de desinfetante na saída do tanque de contato e o tempo de contato expressos nos Anexos IV, V e VI desta Portaria ou a dose mínima de radiação ultravioleta expressa no § 4º do art. 32 desta Portaria.

§ 2º A avaliação da contaminação por *Escherichia coli* no manancial subterrâneo deve ser feita mediante coleta mensal de uma amostra de água em ponto anterior ao local de desinfecção.

§ 3º Na ausência de tanque de contato, a coleta de amostras de água para a verificação da presença/ausência de coliformes totais em sistemas de abastecimento e soluções

alternativas coletivas de abastecimento de águas, supridas por manancial subterrâneo, deverá ser realizada em local à montante ao primeiro ponto de consumo.

Art. 34. É obrigatória a manutenção de, no mínimo, 0,2 mg/L de cloro residual livre ou 2 mg/L de cloro residual combinado ou de 0,2 mg/L de dióxido de cloro em toda a extensão do sistema de distribuição (reservatório e rede).

Art. 35. No caso do uso de ozônio ou radiação ultravioleta como desinfetante, deverá ser adicionado cloro ou dióxido de cloro, de forma a manter residual mínimo no sistema de distribuição (reservatório e rede), de acordo com as disposições do art. 34 desta Portaria. Art. 36. Para a utilização de outro agente desinfetante, além dos citados nesta Portaria, deve-se consultar o Ministério da Saúde, por intermédio da SVS/MS.

Art. 37. A água potável deve estar em conformidade com o padrão de substâncias químicas que representam risco à saúde e cianotoxinas, expressos nos Anexos VII e VIII e demais disposições desta Portaria.

§ 1º No caso de adição de flúor (fluoretação), os valores recomendados para concentração de íon fluoreto devem observar a Portaria nº 635/GM/MS de 30 de janeiro de 1976, não podendo ultrapassar o VMP expresso na Tabela do Anexo VII desta Portaria.

§ 2º As concentrações de cianotoxinas referidas no Anexo VIII desta Portaria devem representar as contribuições da fração intracelular e da fração extracelular na amostra analisada.

§ 3º Em complementação ao previsto no Anexo VIII desta Portaria, quando for detectada a presença de gêneros potencialmente produtores de cilindrospermopsinas no monitoramento de cianobactérias previsto no § 112 do art. 40 desta Portaria, recomenda-se a análise dessas cianotoxinas, observando o valor máximo aceitável de 1,0 µg/L.

§ 4º Em complementação ao previsto no Anexo VIII desta Portaria, quando for detectada a presença de gêneros de cianobactérias potencialmente produtores de anatoxina-a(s) no monitoramento de cianobactérias previsto no § 1º do art. 40 desta Portaria, recomenda-se a análise da presença desta cianotoxina.

Art. 38. Os níveis de triagem que conferem potabilidade da água do ponto de vista radiológico são valores de concentração de atividade que não excedem 0,5 Bq/L para atividade alfa total e 1 Bq/L para beta total.

Parágrafo único. Caso os níveis de triagem citados neste artigo sejam superados, deve ser realizada análise específica para os radionuclídeos presentes e o resultado deve ser comparado com os níveis de referência do Anexo IX desta Portaria.

Art. 39. A água potável deve estar em conformidade com o padrão organoléptico de potabilidade expresso no anexo X desta Portaria.

§ 1º Recomenda-se que, no sistema de distribuição, o pH da água seja mantido na faixa de 6,0 a 9,5.

§ 2º Recomenda-se que o teor máximo de cloro residual livre em qualquer ponto do sistema de abastecimento seja de 2 mg/L.

§ 3º Na verificação do atendimento ao padrão de potabilidade expresso nos Anexos VII, VIII, IX e X, eventuais ocorrências de resultados acima do VMP devem ser analisadas em conjunto com o histórico do controle de qualidade da água e não de forma pontual.

§ 4º Para os parâmetros ferro e manganês são permitidos valores superiores ao VMPs estabelecidos no Anexo X desta Portaria, desde que sejam observados os seguintes critérios:

I - os elementos ferro e manganês estejam complexados com produtos químicos comprovadamente de baixo risco à saúde, conforme preconizado no art. 13 desta Portaria e nas normas da ABNT;

II - os VMPs dos demais parâmetros do padrão de potabilidade não sejam violados; e

III - as concentrações de ferro e manganês não ultrapassem 2,4 e 0,4 mg/L, respectivamente.

§ 5º O responsável pelo sistema ou solução alternativa coletiva de abastecimento de água deve encaminhar à autoridade de saúde pública dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios informações sobre os produtos químicos utilizados e a comprovação de baixo risco à saúde, conforme preconizado no art. 13 e nas normas da ABNT.

CAPÍTULO VI DOS PLANOS DE AMOSTRAGEM

Art. 40. Os responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistemas ou soluções alternativas coletivas de abastecimento de água para consumo humano, supridos por manancial superficial e subterrâneo, devem coletar amostras semestrais da água bruta, no ponto de captação, para análise de acordo com os parâmetros exigidos nas legislações específicas, com a finalidade de avaliação de risco à saúde humana.

§ 1º Para minimizar os riscos de contaminação da água para consumo humano com cianotoxinas, deve ser realizado o monitoramento de cianobactérias, buscando-se identificar os diferentes gêneros, no ponto de captação do manancial superficial, de acordo com a Tabela do Anexo XI desta Portaria, considerando, para efeito de alteração da frequência de monitoramento, o resultado da última amostragem.

§ 2º Em complementação ao monitoramento do Anexo XI desta Portaria, recomenda-se a análise de clorofila-a no manancial, com frequência semanal, como indicador de potencial aumento da densidade de cianobactérias.

§ 3º Quando os resultados da análise prevista no § 2º deste artigo revelarem que a concentração de clorofila-a em duas semanas consecutivas tiver seu valor duplicado ou mais, deve-se proceder nova coleta de amostra para quantificação de cianobactérias no ponto de captação do manancial, para reavaliação da frequência de amostragem de cianobactérias.

§ 4º Quando a densidade de cianobactérias exceder 20.000 células/ml, deve-se realizar análise de cianotoxinas na água do manancial, no ponto de captação, com frequência semanal.

§ 5º Quando as concentrações de cianotoxinas no manancial forem menores que seus respectivos VMPs para água tratada, será dispensada análise de cianotoxinas na saída do tratamento de que trata o Anexo XII desta Portaria.

§ 6º Em função dos riscos à saúde associados às cianotoxinas, é vedado o uso de algicidas para o controle do crescimento de microalgas e cianobactérias no manancial de abastecimento ou qualquer intervenção que provoque a lise das células.

§ 7º As autoridades ambientais e de recursos hídricos definirão a regulamentação das excepcionalidades sobre o uso de algicidas nos cursos d'água superficiais.

Art. 41. Os responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistema e solução alternativa coletiva de abastecimento de água para consumo humano devem elaborar e

submeter para análise da autoridade municipal de saúde pública, o plano de amostragem de cada sistema e solução, respeitando os planos mínimos de amostragem expressos nos Anexos XI, XII, XIII e XIV.

§ 1º A amostragem deve obedecer aos seguintes requisitos:

I - distribuição uniforme das coletas ao longo do período;

II - representatividade dos pontos de coleta no sistema de distribuição (reservatórios e rede), combinando critérios de abrangência espacial e pontos estratégicos, entendidos como:

a) aqueles próximos a grande circulação de pessoas: terminais rodoviários, terminais ferroviários, entre outros;

b) edifícios que alberguem grupos populacionais de risco, tais como hospitais, creches e asilos;

c) aqueles localizados em trechos vulneráveis do sistema de distribuição como pontas de rede, pontos de queda de pressão, locais afetados por manobras, sujeitos à intermitência de abastecimento, reservatórios, entre outros; e

d) locais com sistemáticas notificações de agravos à saúde tendo como possíveis causas os agentes de veiculação hídrica.

§ 2º No número mínimo de amostras coletadas na rede de distribuição, previsto no Anexo XII, não se incluem as amostras extras (recoletas).

§ 3º Em todas as amostras coletadas para análises microbiológicas, deve ser efetuada medição de turbidez e de cloro residual livre ou de outro composto residual ativo, caso o agente desinfetante utilizado não seja o cloro. § 4º Quando detectada a presença de cianotoxinas na água tratada, na saída do tratamento, será obrigatória a comunicação imediata às clínicas de hemodiálise e às indústrias de injetáveis.

§ 5º O plano de amostragem para os parâmetros de agrotóxicos deverá considerar a avaliação dos seus usos na bacia hidrográfica do manancial de contribuição, bem como a sazonalidade das culturas.

§ 6º Na verificação do atendimento ao padrão de potabilidade expressos nos Anexos VII, VIII, IX e X desta Portaria, a detecção de eventuais ocorrências de resultados acima do VMP devem ser analisadas em conjunto com o histórico do controle de qualidade da água.

§ 7º Para populações residentes em áreas indígenas, populações tradicionais, dentre outras, o plano de amostragem para o controle da qualidade da água deverá ser elaborado de acordo com as diretrizes específicas aplicáveis a cada situação.

CAPÍTULO VII DAS PENALIDADES

Art. 42. Serão aplicadas as sanções administrativas previstas na Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, aos responsáveis pela operação dos sistemas ou soluções alternativas de abastecimento de água que não observarem as determinações constantes desta Portaria, sem prejuízo das sanções de natureza civil ou penal cabíveis.

Art. 43. Cabe ao Ministério da Saúde, por intermédio da SVS/MS, e às Secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal dos Municípios, ou órgãos equivalentes, assegurar o cumprimento desta Portaria.

CAPÍTULO VIII DAS DISPOSIÇÕES FINAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 44. Sempre que forem identificadas situações de risco à saúde, o responsável pelo sistema ou solução alternativa coletiva de abastecimento de água e as autoridades de saúde pública devem, em conjunto, elaborar um plano de ação e tomar as medidas cabíveis, incluindo a eficaz comunicação à população, sem prejuízo das providências imediatas para a correção da anormalidade.

Art. 45. É facultado ao responsável pelo sistema ou solução alternativa coletiva de abastecimento de água solicitar à autoridade de saúde pública a alteração na frequência mínima de amostragem de parâmetros estabelecidos nesta Portaria, mediante justificativa fundamentada.

Parágrafo único. Uma vez formulada a solicitação previstano caput deste artigo, a autoridade de saúde pública decidirá no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, com base em análise fundamentada no histórico mínimo de dois anos do controle da qualidade da água considerando os respectivos planos de amostragens e de avaliação de riscos à saúde, da zona de captação e do sistema de distribuição.

Art. 46. Verificadas características desconformes com o padrão de potabilidade da água ou de outros fatores de risco à saúde, conforme relatório técnico, a autoridade de saúde pública competente determinará ao responsável pela operação do sistema ou solução alternativa coletiva de abastecimento de água para consumo humano que:

- I - amplie o número mínimo de amostras;
- II - aumente a frequência de amostragem; e
- III - realize análises laboratoriais de parâmetros adicionais.

Art. 47. Constatada a inexistência de setor responsável pela qualidade da água na Secretaria de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, os deveres e responsabilidades previstos, respectivamente, nos artigos 11 e 12 desta Portaria serão cumpridos pelo órgão equivalente.

Art. 48. O Ministério da Saúde promoverá, por intermédio da SVS/MS, a revisão desta Portaria no prazo de 5 (cinco) anos ou a qualquer tempo.

Parágrafo único. Os órgãos governamentais e não-governamentais, de reconhecida capacidade técnica nos setores objeto desta regulamentação, poderão requerer a revisão desta Portaria, mediante solicitação justificada, sujeita a análise técnica da SVS/MS.

Art. 49. Fica estabelecido o prazo máximo de 24 (vinte e quatro) meses, contados a partir da data de publicação desta Portari para que os órgãos e entidades sujeitos à aplicação desta Portaria promovam as adequações necessárias ao seu cumprimento, no que se refere ao monitoramento dos parâmetros gosto e odor, saxitoxina, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.

§ 1º Para o atendimento ao valor máximo permitido de 0,5 uT para filtração rápida (tratamento completo ou filtração direta), fica estabelecido o prazo de 4 (quatro) anos para cumprimento, contados da data de publicação desta Portaria, mediante o cumprimento das etapas previstas no §2º do art. 30 desta Portaria.

§ 2º Fica estabelecido o prazo máximo de 24 (vinte e quatro) meses, contados a partir da data de publicação desta Portaria, para que os laboratórios referidos no art. 21 desta Portaria promovam as adequações necessárias para a implantação do sistema de gestão da qualidade, conforme os requisitos especificados na NBR ISO/IEC 17025:2005.

§ 3º Fica estabelecido o prazo máximo de 24(vinte e quatro) meses, contados a partir da data de publicação desta Portaria, para que os órgãos e entidades sujeitos à aplicação desta Portaria promovam as adequações necessárias no que se refere ao monitoramento dos parâmetros que compõem o padrão de radioatividade expresso no Anexo IX desta Portaria.

Art. 50. A União, os Estados, o Distrito Federal e os Municípios deverão adotar as medidas necessárias ao fiel cumprimento desta Portaria.

Art. 51. Ao Distrito Federal competem as atribuições reservadas aos Estados e aos Municípios.

Art. 52. Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 53. Fica revogada a Portaria nº 518/GM/MS, de 25 de março de 2004, publicada no Diário Oficial da União, Seção 1, do dia 26 seguinte, página 266.

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA

* Republicada por ter saído com incorreção no original, publicado no Diário Oficial da União nº 239, de 14 de dezembro de 2011, Seção 1, página 39/46

[ANEXOS](#)

Saúde Legis - Sistema de Legislação da Saúde

ANEXO I

Tabela de padrão microbiológico da água para consumo humano

Tipo de água		Parâmetro		VMP ⁽¹⁾
Água para consumo humano		Escherichia coli ⁽²⁾		Ausência em 100 mL
Água tratada	Na saída do tratamento	Coliformes totais ⁽³⁾		Ausência em 100 mL
	No sistema de distribuição (reservatórios e rede)	Escherichia coli		Ausência em 100 mL
		Coliformes totais ⁽⁴⁾	Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes	Apenas uma amostra, entre as amostras examinadas no mês, poderá apresentar resultado positivo
			Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem a partir de 20.000 habitantes	Ausência em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês.

NOTAS:

(1) Valor máximo permitido.

(2) Indicador de contaminação fecal.

(3) Indicador de eficiência de tratamento.

(4) Indicador de integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede).

ANEXO II

Tabela de padrão de turbidez para água pós-filtração ou pré-desinfecção

Tratamento da água	VMP ⁽¹⁾
Desinfecção (para águas subterrâneas)	1,0 uT ⁽²⁾ em 95% das amostras
Filtração rápida (tratamento completo ou filtração direta)	0,5 ⁽³⁾ uT ⁽²⁾ em 95% das amostras
Filtração lenta	1,0 ⁽³⁾ uT ⁽²⁾ em 95% das amostras

NOTAS:

(1) Valor máximo permitido.

(2) Unidade de Turbidez.

(3) Este valor deve atender ao padrão de turbidez de acordo com o especificado no § 2º do art. 30.

ANEXO III

Tabela de metas progressivas para atendimento ao valor máximo permitido de 0,5 uT para filtração rápida e de 1,0 uT para filtração lenta

Filtração rápida (tratamento completo ou filtração direta)		
Período após a publicação da Portaria	Turbidez ≤ 0,5 uT	Turbidez ≤ 1,0 uT
Final do 1º ano	Em no mínimo 25% das amostras mensais coletadas	No restante das amostras mensais coletadas
Final do 2º ano	Em no mínimo 50% das amostras mensais coletadas	
Final do 3º ano	Em no mínimo 75% das amostras mensais coletadas	
Final do 4º ano	Em no mínimo 95% das amostras mensais coletadas	
Filtração Lenta		
Período após a publicação da Portaria	Turbidez ≤ 1,0uT	Turbidez ≤ 2,0 uT
Final do 1º ano	Em no mínimo 25% das amostras mensais coletadas	No restante das amostras mensais coletadas
Final do 2º ano	Em no mínimo 50% das amostras mensais coletadas	
Final do 3º ano	Em no mínimo 75% das amostras mensais coletadas	
Final do 4º ano	Em no mínimo 95% das amostras mensais coletadas	

ANEXO IV

Tempo de contato mínimo (minutos) a ser observado para a desinfecção por meio da cloração, de acordo com concentração de cloro residual livre, com a temperatura e o pH da água⁽¹⁾

C ⁽²⁾	Temperatura = 5°C							Temperatura = 10°C							Temperatura = 15°C						
	Valores de pH							Valores de pH							Valores de pH						
	$\leq 6,0$	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	$\leq 6,0$	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	$\leq 6,0$	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
$\leq 0,4$	38	47	58	70	83	98	114	27	33	41	49	58	70	80	19	24	29	35	41	48	57
0,6	27	34	41	49	59	69	80	19	24	29	35	41	49	57	13	17	20	25	29	34	40
0,8	21	26	32	39	46	54	63	15	19	23	27	32	38	45	11	13	16	19	23	27	31
1,0	17	22	26	32	38	45	52	12	15	19	23	27	32	37	9	11	13	16	19	22	26
1,2	15	19	23	27	32	38	45	11	13	16	19	23	27	32	7	9	11	14	16	19	22
1,4	13	16	20	24	28	34	39	9	11	14	17	20	24	28	7	8	10	12	14	17	20
1,6	12	15	18	21	25	30	35	8	10	16	15	18	21	25	6	7	9	11	13	15	17
1,8	11	13	16	19	23	27	32	7	9	11	14	16	19	22	5	7	8	10	11	14	16
2,0	10	12	15	18	21	25	29	7	8	10	12	15	17	20	5	6	7	9	10	12	14
2,2	9	11	14	16	19	23	27	6	8	10	12	14	16	19	5	6	7	8	10	11	13
2,4	8	10	13	15	18	21	25	6	7	9	11	13	15	17	4	5	6	8	9	11	12
2,6	8	10	12	14	17	20	23	5	7	8	10	12	14	16	4	5	6	7	8	10	12
2,8	7	9	11	13	15	19	22	5	6	8	9	11	13	15	4	4	5	7	8	9	11
3,0	7	9	10	13	15	18	20	5	6	7	9	11	12	14	3	4	5	6	8	9	10

Tempo de contato mínimo (minutos) a ser observado para a desinfecção por meio da cloração, de acordo com concentração de cloro residual livre, com a temperatura e o pH da água⁽¹⁾ (continuação)

C ⁽²⁾	Temperatura = 20°C							Temperatura = 25°C							Temperatura = 30°C						
	Valores de pH							Valores de pH							Valores de pH						
	≤ 6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	≤ 6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	≤ 6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
≤ 0,4	14	17	20	25	29	34	40	9	12	14	18	21	24	28	6	8	10	12	15	17	20
0,6	10	12	14	17	21	24	28	7	8	10	1	15	17	20	5	6	7	9	10	12	14
0,8	7	9	11	14	16	19	22	5	6	8	10	11	13	16	3	5	6	7	8	10	11
1,0	6	8	9	11	13	16	18	4	5	6	8	9	11	13	3	4	5	6	7	8	9
1,2	5	7	8	10	11	13	16	4	5	5	7	8	10	11	3	3	3	5	6	7	8
1,4	5	6	7	9	10	11	14	3	4	5	6	7	8	10	2	3	3	4	5	6	7
1,6	4	5	6	8	9	11	12	3	4	4	5	6	7	9	2	3	3	4	4	5	6
1,8	4	5	6	7	8	10	12	3	3	4	5	6	7	8	2	2	3	3	4	5	6
2,0	3	4	5	6	7	9	10	2	3	4	4	5	6	7	2	2	3	3	4	4	5
2,2	3	4	5	6	7	8	9	2	3	3	4	5	6	7	2	2	2	3	3	4	5
2,4	3	4	4	5	6	8	9	2	3	3	4	4	5	6	2	2	2	3	3	4	4
2,6	3	3	4	5	6	7	8	2	2	3	3	4	5	6	1	2	2	3	3	4	4
2,8	3	3	4	5	6	7	8	2	2	3	3	4	5	5	1	2	2	2	3	3	4
3,0	2	3	4	4	5	6	77	2	2	3	3	4	4	5	1	2	2	3	3	3	4

NOTAS:

(1) Valores intermediários aos constantes na tabela podem ser obtidos por interpolação.

(2) C: residual de cloro livre na saída do tanque de contato (mg/L).

ANEXO V

Tempo de contato mínimo (minutos) a ser observado para a desinfecção por meio de cloraminação, de acordo com concentração de cloro residual combinado (cloraminas) e com a temperatura da água, para valores de pH da água entre 6 e 9 ⁽¹⁾

C ⁽²⁾	Temperatura (°C)					
	5	10	15	20	25	30
≤ 0,4	923	773	623	473	323	173
0,6	615	515	415	315	215	115
0,8	462	387	312	237	162	87
1,0	369	309	249	189	130	69
1,2	308	258	208	158	108	58
1,4	264	221	178	135	92	50
1,6	231	193	156	118	81	43
1,8	205	172	139	105	72	39
2,0	185	155	125	95	64	35
2,2	168	141	113	86	59	32
2,4	154	129	104	79	54	29
2,6	142	11	9 96	73	50	27
2,8	132	11	0 89	678	46	25
3,0	123	103	83	63	43	23

NOTAS:

(1) Valores intermediários aos constantes na tabela podem ser obtidos por interpolação.

(2) C: residual de cloro combinado na saída do tanque de contato (mg/L).

ANEXO VI

Tempo de contato mínimo (minutos) a ser observado para a desinfecção com dióxido de cloro, de acordo com concentração de dióxido de cloro e com a temperatura da água, para valores de pH da água entre 6 e 9 ⁽¹⁾.

C ⁽²⁾	Temperatura (°C)					
	5	10	15	20	25	30
≤ 0,4	13	9	8	7	6	6
0,6	9	6	5	6	4	4
0,8	7	5	4	4	3	3
1,0	5	4	3	3	3	2
1,2	4	3	3	3	2	2
1,4	4	3	2	2	2	2
1,6	3	2	2	2	2	1
1,8	3	2	2	2	1	1
2,0	3	2	2	2	1	1
2,2	2	2	2	1	1	1
2,4	2	2	1	1	1	1
2,6	2	2	1	1	1	1
2,8	2	1	1	1	1	1
3,0	2	1	1	1	1	1

NOTAS:

(1) Valores intermediários aos constantes na tabela podem ser obtidos por interpolação.

(2) C: residual de dióxido de cloro na saída do tanque de contato (mg/L).

ANEXO VII

Tabela de padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde

Parâmetro	CAS ⁽¹⁾	Unidade	VMP ⁽²⁾
INORGÂNICAS			
Antimônio	7440-36-0	mg/L	0,005
Arsênio	7440-38-2	mg/L	0,01
Bário	7440-39-3	mg/L	0,7
Cádmio	7440-43-9	mg/L	0,005
Chumbo	7439-92-1	mg/L	0,01
Cianeto	57-12-5	mg/L	0,07
Cobre	7440-50-8	mg/L	2
Cromo	7440-47-3	mg/L	0,05
Fluoreto	7782-41-4	mg/L	1,5
Mercúrio	7439-97-6	mg/L	0,001
Níquel	7440-02-0	mg/L	0,07
Nitrato (como N)	14797-55-8	mg/L	10
Nitrito (como N)	14797-65-0	mg/L	1
Selênio	7782-49-2	mg/L	0,01
Urânio	7440-61-1	mg/L	0,03
ORGÂNICAS			
Acrilamida	79-06-1	µg/L	0,5
Benzeno	71-43-2	µg/L	5
Benzo[a]pireno	50-32-8	µg/L	0,7
Cloreto de Vinila	75-01-4	µg/L	2
1,2 Dicloroetano	107-06-2	µg/L	10
1,1 Dicloroetano	75-35-4	µg/L	30
1,2 Dicloroetano (cis + trans)	156-59-2 (cis) 156-60-5 (trans)	µg/L	50
Diclorometano	75-09-2	µg/L	20
Di(2-etilhexil) ftalato	117-81-7	µg/L	8
Estireno	100-42-5	µg/L	20
Pentaclorofenol	87-86-5	µg/L	9
Tetracloroeto de Carbono	56-23-5	µg/L	4
Tetracloroetano	127-18-4	µg/L	40

Parâmetro	CAS ⁽¹⁾	Unidade	VMP ⁽²⁾
ORGÂNICAS (continuação)			
Triclorobenzenos	1,2,4-TCB (120-82-1) 1,3,5-TCB (108-70-3) 1,2,3- TCB (87-61-6)	µg/L	20
Tricloroeteno	79-01-6	µg/L	20
AGROTÓXICOS			
2,4 D + 2,4,5 T	94-75-7 (2,4 D) 93-76-5 (2,4,5 T)	µg/L	30
Alaclor	15972-60-8	µg/L	20
Aldicarbe + Aldicarbesulfona +Aldicarbesulfóxido	116-06-3 (aldicarbe) 1646-88-4 (aldicarbesulfona)	µg/L	10
	1646-87-3 (aldicarbe sulfóxido)		
Aldrin + Dieldrin	309-00-2 (aldrin) 60-57-1 (dieldrin)	µg/L	0,03
Atrazina	1912-24-9	µg/L	2
Carbendazim + benomil	10605-21-7 (carbendazim) 17804-35-2 (benomil)	µg/L	120
Carbofurano	1563-66-2	µg/L	7
Clordano	5103-74-2	µg/L	0,2
Clorpirifós + clorpirifós-oxon	2921-88-2 (clorpirifós) 5598-15-2 (clorpirifós-oxon)	µg/L	30
DDT+DDD+DDE	p, p'-DDT (50-29-3) p, p'-DDD (72-54-8) p, p'-DDE (72-55-9)	µg/L	1
Diuron	330-54-1	µg/L	90
Endossulfan (α β e sais) ⁽³⁾	115-29-7; I (959-98-8); II (33213-65-9); sulfato (1031-07-8)	µg/L	20
Endrin	72-20-8	µg/L	0,6

Parâmetro	CAS ⁽¹⁾	Unidade	VMP ⁽²⁾
AGROTÓXICOS (continuação)			
Glifosato + AMPA	1071-83-6 (glifosato) 1066-51-9 (AMPA)	µg/L	500
Lindano (gama HCH) ⁽⁴⁾	58-89-9	µg/L	2
Mancozebe	8018-01-7	µg/L	180
Metamidofós	10265-92-6	µg/L	12
Metolacoloro	51218-45-2	µg/L	10
Molinate	2212-67-1	µg/L	6
Parationa Metílica	298-00-0	µg/L	9
Pendimentalina	40487-42-1	µg/L	20
Permetrina	52645-53-1	µg/L	20
Profenofós	41198-08-7	µg/L	60
Simazina	122-34-9	µg/L	2
Tebuconazol	107534-96-3	µg/L	180
Terbufós	13071-79-9	µg/L	1,2
Trifluralina	1582-09-8	µg/L	20
DESINFETANTES E PRODUTOS SECUNDÁRIOS DA DESINFECÇÃO ⁽⁵⁾			
Ácidos haloacéticos total	⁽⁶⁾	mg/L	0,08
Bromato	15541-45-4	mg/L	0,01
Clorito	7758-19-2	mg/L	1
Cloro residual livre	7782-50-5	mg/L	5
Cloraminas Total	0599-903	mg/L	4,0
2,4,6 Triclorofenol	88-06-2	mg/L	0,2
Trihalometanos Total	⁽⁷⁾	mg/L	0,1

NOTAS:

(1) CAS é o número de referência de compostos e substâncias químicas adotado pelo Chemical Abstract Service.

(2) Valor Máximo Permitido.

(3) Somatório dos isômeros alfa, beta e os sais de endossulfan, como exemplo o sulfato de endossulfan.

(4) Esse parâmetro é usualmente e equivocadamente conhecido como BHC.

(5) Análise exigida de acordo com o desinfetante utilizado.

(6) Ácidos haloacéticos: Ácido monocloraacético (MCAA) - CAS = 79-11-8, Ácido monobromoacético (MBAA) - CAS = 79-08-3, Ácido dicloroacético (DCAA) - CAS = 79-43-6, Ácido 2,2 - dicloropropiônico (DALAPON) - CAS = 75-99-0, Ácido tricloroacético (TCAA) - CAS = 76-03-9, Ácido bromocloroacético (BCAA) - CAS = 5589-96-3, 1,2,3, tricloropropano (PI) - CAS = 96-18-4, Ácido dibromoacético (DBAA) - CAS = 631-64-1, e Ácido bromodicloroacético (BDCAA) - CAS = 7113-314-7.

(7) Trihalometanos: Triclorometano ou Clorofórmio (TCM) - CAS = 67-66-3, Bromodiclorometano (BDCM) - CAS = 75-27-4, Dibromoclorometano (DBCM) - CAS = 124-48-1, Tribromometano ou Bromofórmio (TBM) - CAS = 75-25-2.

ANEXO VIII

Tabela de padrão de cianotoxinas da água para consumo humano

CIANOTOXINAS		
Parâmetro ⁽¹⁾	Unidade	VMP ⁽²⁾
Microcistinas	µg/L	1,0 ⁽³⁾
Saxitoxinas	µg equivalente STX/L	3,0

NOTAS:

(1) A frequência para o controle de cianotoxinas está prevista na tabela do Anexo XII.

(2) Valor máximo permitido.

(3) O valor representa o somatório das concentrações de todas as variantes de microcistinas.

ANEXO IX

Tabela de padrão de radioatividade da água para consumo humano

Parâmetro ⁽¹⁾	Unidade	VMP
Rádio-226	Bq/L	1
Rádio-228	Bq/L	0,1

NOTAS: (1) Sob solicitação da Comissão Nacional de Energia Nuclear, outros radionuclídeos devem ser investigados.

ANEXO X

Tabela de padrão organoléptico de potabilidade

Parâmetro	CAS	Unidade	VMP ⁽¹⁾
Alumínio	7429-90-5	mg/L	0,2
Amônia (como NH ₃)	7664-41-7	mg/L	1,5
Cloreto	16887-00-6	mg/L	250
Cor Aparente ⁽²⁾		uH	15
1,2 diclorobenzeno	95-50-1	mg/L	0,01
1,4 diclorobenzeno	106-46-7	mg/L	0,03
Dureza total		mg/L	500
Etilbenzeno	100-41-4	mg/L	0,2
Ferro	7439-89-6	mg/L	0,3
Gosto e odor ⁽³⁾		Intensidade	6
Manganês	7439-96-5	mg/L	0,1
Monoclorobenzeno	108-90-7	mg/L	0,12
Sódio	7440-23-5	mg/L	200
Sólidos dissolvidos totais		mg/L	1000
Sulfato	14808-79-8	mg/L	250
Sulfeto de hidrogênio	7783-06-4	mg/L	0,1
Surfactantes (como LAS)		mg/L	0,5
Tolueno	108-88-3	mg/L	0,17
Turbidez ⁽⁴⁾		uT	5
Zinco	7440-66-6	mg/L	5
Xilenos	1330-20-7	mg/L	0,3

NOTAS:

(1) Valor máximo permitido.

(2) Unidade Hazen (mgPt-Co/L).

(3) Intensidade máxima de percepção para qualquer característica de gosto e odor com exceção do cloro livre, nesse caso por ser uma característica desejável em água tratada.

(4) Unidade de turbidez.

ANEXO XI

Frequência de monitoramento de cianobactérias no manancial de abastecimento de água

Quando a densidade de cianobactérias (células/mL) for:	Frequência
≤ 10.000	Mensal
> 10.000	Semanal

ANEXO XII

Tabela de número mínimo de amostras e frequência para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises físicas, químicas e de radioatividade, em função do ponto de amostragem, da população abastecida e do tipo de manancial.

Parâmetro	Tipo de Manancial	Saída do Tratamento		Sistema de distribuição (reservatórios e redes)					
		Nº Amostras	Frequência	Número de amostras			Frequência		
				População abastecida					
				<50.000 hab.	50.000 a 250.000 hab.	>250.000 hab.	<50.000 hab.	50.000 a 250.000 hab.	>250.000 hab.
Cor	Superficial	1	A cada 2horas	10	1 para cada 5mil hab	40 + (1 para cada 25 mil hab)	Mensal		
	Subterrâneo	1	Semanal	5	1 para cada 10 mil hab	20 + (1 para cada 50 mil hab)	Mensal		
Turbidez, Cloro Residual Livre ⁽¹⁾ , Cloraminas ⁽¹⁾ , Dióxido de Cloro ⁽¹⁾	Superficial	1	A cada 2 horas	Conforme § 3º do art. 41			Conforme § 3º do art. 41		
	Subterrâneo	1	2 vezes por semana						
pH e fluoreto	Superficial	1	A cada 2 horas	Dispensada a análise			Dispensada a análise		
	Subterrâneo	1	2 vezes por semana						
Gosto e odor	Superficial	1	Trimestral	Dispensada a análise			Dispensada a análise		
	Subterrâneo	1	Semestral						
Cianotoxinas	Superficial	1	Semanal quando nº de cianobactérias ≥ 20.000 células/mL	Dispensada a análise			Dispensada a análise		
Produtos secundários da desinfecção	Superficial	1	Trimestral	1 ⁽²⁾	4 ⁽²⁾	4 ⁽²⁾	Trimestral		
	Subterrâneo	Dispensada a análise	Dispensada a análise	1 ⁽²⁾	1 ⁽²⁾	1 ⁽²⁾	Anual	Semestral	Semestral
Demais parâmetros ⁽³⁾⁽⁴⁾	Superficial ou Subterrâneo	1	Semestral	1 ⁽⁵⁾	1 ⁽⁵⁾	1 ⁽⁵⁾	Semestral		

NOTAS:

- (1) Análise exigida de acordo com o desinfetante utilizado.
- (2) As amostras devem ser coletadas, preferencialmente, em pontos de maior tempo de detenção da água no sistema de distribuição.
- (3) A definição da periodicidade de amostragem para o quesito de radioatividade será definido após o inventário inicial, realizado semestralmente no período de 2 anos, respeitando a sazonalidade pluviométrica.
- (4) Para agrotóxicos, observar o disposto no § 5º do art. 41.
- (5) Dispensada análise na rede de distribuição quando o parâmetro não for detectado na saída do tratamento e, ou, no manancial, à exceção de substâncias que potencialmente possam ser introduzidas no sistema ao longo da distribuição.

ANEXO XIII

Número mínimo de amostras mensais para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises microbiológicas, em função da população abastecida

Parâmetro	Saída do Tratamento (Número de amostras por unidade de tratamento)	Sistema de distribuição (reservatórios e rede)			
		População abastecida			
		< 5.000 hab.	5.000 a 20.000 hab.	20.000 a 250.000 hab.	> 250.000 hab.
Coliformes totais	Duas amostras semanais ⁽¹⁾	110	1 para cada 500	hab. 30 + (1 para cada 2.000 hab.)	105 + (1 para cada 5.000 hab.) Máximo de 1.000
Escherichia coli					

NOTA:

- (1) Recomenda-se a coleta de, no mínimo, quatro amostras semanais.

ANEXO XIV

Tabela de número mínimo de amostras mensais para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises microbiológicas, em função da população abastecida

Parâmetro	Saída do Tratamento (Número de amostras por unidade de tratamento)	Sistema de distribuição (reservatórios e rede)			
		População abastecida			
		< 5.000 hab.	5.000 a 20.000 hab.	20.000 a 250.000 hab.	> 250.000 hab.
Coliformes totais Escherichia coli	Duas amostras semanais ⁽¹⁾		1 para cada 115000 hab.	30 + (1 para cada 2.000 hab.)	105 + (1 para cada 5.000 hab.) Máximo de 1.000

NOTA:

(1) Recomenda-se a coleta de, no mínimo, quatro amostras semanais.

ANEXO XV

Tabela de número mínimo de amostras e frequência mínima de amostragem para o controle da qualidade da água de solução alternativa coletiva, para fins de análises físicas, químicas e microbiológicas, em função do tipo de manancial e do ponto de amostragem

Parâmetro	Tipo de manancial	Saída do tratamento (para água canalizada)	Número de amostras retiradas no ponto de consumo (para cada 500 hab.)	Frequência de amostragem
Cor, turbidez, pH e coliformes totais ⁽¹⁾ e ⁽²⁾	Superficial	1	1	Semanal
	Subterrâneo	1	1	Mensal
Cloro residual livre ⁽¹⁾	Superficial ou Subterrâneo	1	1	Diário

NOTAS:

(1) Para veículos transportadores de água para consumo humano, deve ser realizada uma análise de cloro residual livre em cada carga e uma análise, na fonte de fornecimento, de cor, turbidez, pH e coliformes totais com frequência mensal, ou outra amostragem determinada pela autoridade de saúde pública.

(2) O número e a frequência de amostras coletadas no sistema de distribuição para pesquisa de Escherichia coli devem seguir o determinado para coliformes totais.