



XI SILUBESA

Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental

28/03 a 02/04/2004 - Natal - Rio Grande do Norte - Brasil

I-028 – IMPLANTAÇÃO DO MÉTODO 1623 DA USEPA NO LABORATÓRIO METROPOLITANO DA COMPANHIA DE SANEAMENTO DE MINAS GERAIS PARA DETECÇÃO DE (OO) CISTOS DE *Cryptosporidium* E *Giardia* EM ÁGUAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO.

Patrícia Maria Ribeiro Machado ⁽¹⁾

Mestranda em Saneamento do Programa de Pós-graduação da Escola de Engenharia da UFMG; Bióloga, Bacharelado em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais; Especialização em Engenharia Sanitária Ambiental (UFMG); Parasitologista Ambiental contratada pela COPASA para o projeto *Cryptosporidium* e *Giardia*.

Daniel Adolpho Cerqueira

Doutorando em Saneamento do Programa de Pós-graduação da Escola de Engenharia da UFMG; Mestre em Microbiologia pela Universidade Federal de Minas Gerais; Biólogo, formado pela Pontifícia Universidade Católica (PUC/MG); Belo Horizonte – MG; responsável pelo setor de Apoio Técnico e Desenvolvimento da Divisão de Laboratórios da Metropolitana – COPASA MG.

Endereço ⁽¹⁾: Rua Raposos, 428 - Pompéia- Belo Horizonte - MG - Brasil - CEP: 30.280-530 Fone: +55 (31) 3461-7246 – (31) 3250-2382 (COPASA) - FAX: : +55 (31) 3250-2355

 patricia.ribeiro@copasa.com.br

RESUMO

Os padrões de potabilidade da água de consumo, estabelecidos pela Portaria 1469 do Ministério da Saúde, em vigor desde 23 de fevereiro de 2003 recomendam a pesquisa de microrganismos patogênicos. Dentre esses, a portaria determina o controle da ocorrência em água de abastecimento dos Enterovírus, oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*. A Companhia de Saneamento de Minas Gerais - COPASA, procurando atender esta recomendação tem investido na implantação de um método confiável e sensível que possibilite um eficiente controle da qualidade da água por ela produzida. Considerando que os *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* da AWWA-APHA-WEF em sua última edição (20^a) não incorporam método para detecção desses protozoários, o Laboratório Metropolitano da COPASA realizou pesquisa entre os métodos disponíveis e optou pelo Método 1623 da Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), validado em abril de 2001. Essa implantação significou uma série de atividades incluindo a definição de equipamentos, treinamento de pessoal, adequação de área laboratorial e incorporação de testes de validação do método. Foram realizados testes de controle do grau de recuperação do método utilizando amostras sintéticas positivas (*Spiking*) e negativas (*Blank*) e teste comparativo dos sistemas de filtração Filt-Max (IDEXX) e Envirochek (PALL-GELMAN). A efetivação da pesquisa dos (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* foi realizada a partir de amostras de água do Rio das Velhas, principal fonte de abastecimento para a cidade de Belo Horizonte. Paralelamente foi avaliada a poluição fecal desse manancial através dos indicadores bacterianos, *E. coli* e *Enterococcus*. Os resultados mostraram uma recuperação satisfatória, com a média de 38% para *Cryptosporidium* e 42% para *Giardia*, percentuais estes que estão de acordo com os dados dos estudos de validação do método desenvolvidos pela USEPA.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium*, *Giardia*, Método 1623, USEPA, Qualidade de Água.

INTRODUÇÃO

Critérios e Padrões

A Portaria 1469 do Ministério da Saúde, em vigor desde 23 de fevereiro de 2003, no artigo 11, parágrafo 7^o recomenda 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* sp. Entretanto, devido a preocupação com a qualidade microbiológica da água, a portaria faz exigências quanto ao padrão de turbidez e recomenda enfaticamente no artigo 12, parágrafo 2^o que para filtração rápida, se estabeleça como meta a obtenção de efluente filtrado com valores de turbidez inferiores a 0,5 UT em 95% dos dados mensais e nunca superiores a 5,0 UT.

A detecção e controle de *Cryptosporidium* e *Giardia* nos EUA é proposta em vários documentos como *Information Collection Rule*, *Interim Enhanced Surface Water Treatment Rule*, *Long Term 1 Enhanced Surface Water Treatment Rule* e *Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule*. Todos esses documentos citados foram editados pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA).

A *Information Collection Rule* - ICR (1996) exige que em sistemas de água que abastecem > 10.000 habitantes que se faça análises mensais para coliformes, turbidez e *Cryptosporidium* em um período de 18 meses.

A *Interim Enhanced Surface Water Treatment Rule* (1998) é aplicado aos sistemas de água que abastecem > 10.000 habitantes e que utilizem a filtração como barreira de controle dos microrganismos em águas superficiais e de profundidade com influência de águas superficiais. Essa regra estipulou uma meta de zero para *Cryptosporidium* como nível máximo de contaminação. Definiu também em 2 unidades logarítmicas (2log) como critério de eficiência de remoção desse protozoário.

O *Long Term 1 Enhanced Surface Water Treatment Rule* (2000) é aplicado a sistemas que abastecem pequenas comunidades (< 10.000 habitantes). As recomendações desse regulamento são aplicadas a todos os sistemas de abastecimento que reciclam água de lavagem de filtros e salienta a importância do processo físico na remoção de oocistos de *Cryptosporidium*.

Os requerimentos da *Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule* - LT2ESWTR (2001) define categorias de tratamento, níveis de remoção (Quadro 1) e limites para alguns indicadores da previsibilidade de ocorrência de *Cryptosporidium* :

- Os sistemas devem monitorar *Cryptosporidium* em seus mananciais quando o limite de *E. coli* for em média anual :

> 10 *E. coli* / 100 ml para lagos e represas

> 50 *E. coli* / 100 ml para cursos d'água

- Sistemas que conseguirem níveis de remoção 2,5 logs em *Cryptosporidium* estariam dispensados do monitoramento para se enquadrarem nas categorias de remoção.

Quadro 1 - Requerimentos de Tratamento da LT2ESWTR

Categoria	Concentração média de <i>Cryptosporidium</i>	Requerimentos de tratamentos adicionais para sistemas com tratamento convencional que atendam a IESWTR
1	Crypto < 0,075/L	Nenhuma ação
2	0,075 ≤ Crypto < 1,0/L	1log de remoção (combinação de técnicas)
3	1,0/L ≤ Crypto < 3,0/L	2log de remoção (Ozônio, Cl ₂ O, UV, MF, FC, FS)
4	Crypto ≥ 3,0/L	2,5log de remoção (Ozônio, Cl ₂ O, UV, MF, FC, FS)

IESWTR : Regra Intermediária do Tratamento Melhorado de Águas Superficiais

MF : Filtração por Membrana

FC : Filtração por Cartucho

FS : Filtração em Solo

Fonte: AWWA Journal, março de 2003

No Reino Unido, agência *Drinking Water Inspectorate* (2001) definiu, em seu padrão de potabilidade, um limite

máximo de 10 oocistos de *Cryptosporidium* por 100 L de água tratada, em uma frequência diária de monitoramento.

Os *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality* (2002) não propõem, até o momento, limites numéricos para *Cryptosporidium* e *Giardia* e recomendam medidas de proteção da bacia e fontes de abastecimento para redução de risco assim como investimentos na otimização do tratamento de água para remoção desses protozoários.

Os *Australian Drinking Water Guidelines* (2002), da mesma forma, que os guias canadenses não propõem limites para o controle de *Cryptosporidium* e *Giardia*, considerando não serem os métodos atuais de detecção suficientes para a identificação da infectividade humana. Esses guias também enfatizam a implementação da sistemática de barreiras múltiplas como forma de controle desses protozoários.

Evolução Metodológica

Até sua 19ª edição (1995) os *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* da AWWA-APHA-WEF (*Standard Methods*) incorporavam o método de Imunofluorescência para detecção de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* o qual mostrou-se mais eficiente que alguns métodos não padronizados disponíveis até então. A partir do surto de criptosporidiose ocorrido em abril de 1993 em Milwaukee (USA) houve uma grande implementação nos métodos disponíveis para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras ambientais. Em 1996-1997, a ICR determinou que os serviços de água dos Estados Unidos que abastecessem ≥ 100.000 habitantes iniciassem o monitoramento em águas superficiais utilizando então a metodologia proposta nos *Standard Methods*. Entretanto, em estudos posteriores esse método denominado ICR foi avaliado quanto a sua eficiência mostrando-se de baixa reprodutibilidade, sensibilidade, seletividade e alta variabilidade.

Paralelamente ao uso dessa metodologia (ICR) outras foram sugeridas e utilizadas sempre aplicando a imunofluorescência com anticorpos monoclonais. O método da floculação de carbonato de cálcio mostrou-se superior ao ICR mas com a limitação de interferir na viabilidade dos oocistos e apresentar baixa seletividade. Uma série de técnicas foram propostas no sentido de melhorar a recuperação dos (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia*, incluindo novos sistemas de concentração como filtração por fluxo de vórtex, centrifugação contínua e filtração em membranas planas.

O uso da citometria de fluxo mostrou consideráveis melhorias no grau de recuperação sendo, contudo, limitada por seu alto custo e interferências da turbidez e constituintes da amostra. A partir de 1997, a USEPA desenvolveu o método 1622 para detecção de *Cryptosporidium* em que propôs uma sequência de técnicas incluindo filtração, eluição, centrifugação, imunoseparação magnética (IMS) e imunofluorescência direta e confirmação com contraste de interferência diferencial (CID) e coloração DAPI. Em 1999, a USEPA ampliou esse método para o atual 1623, incorporando a detecção de cistos de *Giardia*, sendo validado em abril de 2001. Como a atual edição (20ª de 1998) dos *Standard Methods* não incorpora nenhum método para detecção de protozoários, o Laboratório Metropolitano da COPASA realizou pesquisa entre os métodos disponíveis e optou pelo Método 1623 da USEPA.

O objetivo deste trabalho foi viabilizar o atendimento da COPASA à recomendação do Ministério da Saúde, em sua Portaria 1469 quanto a pesquisa de enterovírus, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em sistemas de abastecimento de água implantando em seu Laboratório Metropolitano o Método 1623 da USEPA e paralelamente associar o uso de indicadores bacterianos na avaliação da ocorrência desses protozoários nos mananciais e sua remoção nas estações de tratamento de água.

MATERIAIS E MÉTODOS

Essa implantação significou uma série de atividades incluindo a definição de equipamentos, treinamento de pessoal, adequação de área laboratorial e incorporação de testes de validação do método. Foram realizados testes de controle do grau de recuperação do método utilizando amostras sintéticas positivas (*Spiking*) e negativas (*Blank*) e teste comparativo dos sistemas de filtração Filta-Max (IDEXX) e Envirochek (PAUL-GELMAN). A efetivação da pesquisa dos (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* foi realizada a partir de amostras de água do Rio das Velhas, principal fonte de abastecimento para a cidade de Belo Horizonte. Paralelamente foi avaliada a poluição fecal do manancial através dos indicadores bacterianos, *Escherichia coli* e *Streptococcus Fecais*.

RESULTADOS

Os resultados (tabela 1) mostraram uma recuperação satisfatória, com até 33% para *Cryptosporidium* e 42% para *Giardia* que estão de acordo com os dados dos estudos de validação do método da USEPA. A tabela 2 apresenta os resultados de ocorrência de (oo)cistos nas 12 campanhas de amostragem incluindo a bacia e medidor *Parshall* da Estação de Tratamento de Água do Rio das Velhas (7 m³/segundo).

Tabela 1 : Taxas de detecção de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras controle.

Amostra Matrix	Recuperação (%)			
	Spike			
	Módulo de Filtro em espuma (IDEXX)		Filtro em cápsula Envirochek (GELMAN)	
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
1 ^a	-	-	12	36
2 ^a	27	41	-	-
3 ^b	33	35	29	42
4 ^c	1	22	19	24
^a Amostra matrix diferente com turbidez de 1,1 UNT ^b Amostra matrix semelhante com suspensão algal e turbidez de 0,7 UNT ^c Amostra matrix semelhante com suspensão algal e turbidez de 0,5 UNT. Os filtros foram mantidos overnight (4 ⁰ C) e o filtro Filta-Max não apresentou expansão satisfatória. Teste realizado com dissociação química				

Tabela 2 : Detecção de (oo) cistos de *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* em amostras de água do rio das Velhas

Amostra	Parâmetros Microbianos				Nº de (oo)cistos detectados/ 10L			
	Turbidez NTU	Coliforme NMP/ 100 mL	<i>E. coli</i> NMP/ 100 mL	<i>E. fecais</i> UFC/ 100 mL	Módulo de Filtro em espuma (IDEXX)	Filtro em Cápsula Envirochek (GELMAN)		
					<i>C. parvum</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>C. parvum</i>	<i>G. lamblia</i>
01	5,5	3,6 x 10 ⁵	5,2x10 ⁴	4,0x10 ³	1,4x10 ¹	1,5x10 ³	6,2x10 ¹	2,6x10 ³
02	18,5-75,5 ^a	>2,4 x 10 ⁴	7,2x10 ³	1,0x10 ¹	2,0x10 ⁰	1,2x10 ²	1,0x10 ⁰	2,6x10 ²
03	13	>2,4 x 10 ⁴	9,8x10 ²	6,6x10 ²	1,0x10 ⁰	1,2x10 ²	3,0x10 ⁰	2,9x10 ²
04	125-200 ^b	>2,4 x 10 ⁴	9,2x10 ³	1,6x10 ¹	-	-	-	-
06	124-73 ^c	>2,4 x 10 ⁴	2,4x10 ⁴	2,2x10 ¹	8,2x10 ⁰	2,6x10 ²	1,6x10 ¹	2,7x10 ²
07	126-58 ^d	>2,4 x 10 ⁴	1,7x10 ⁴	1,5x10 ¹	6,6x10 ⁰	4,6x10 ²	1,1x10 ¹	4,7x10 ²
08	68-26 ^e	>2,4 x 10 ⁴	6,4x10 ³	7,6x10 ³	2,0x10 ⁰	1,7x10 ²	4,0x10 ⁰	1,6x10 ²

09	111	$>2,4 \times 10^4$	$6,8 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^0$	$9,5 \times 10^1$	-	-
10	73-44 ^f	$>2,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$	$5,6 \times 10^3$	0	$2, \times 10^0$	-	-
11	13,5	$>2,4 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$3,0 \times 10^0$	$7,6 \times 10^1$	-	-
12	5,3	$>2,4 \times 10^4$	$9,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^0$	$8,4 \times 10^1$	-	-

^a Valores de turbidez 18,5 NTU para sistema Filta-Max e 75,5 NTU para sistema Envirochek

^b Valores de turbidez 125 NTU para sistema Filta-Max e 200 NTU para sistema Envirochek

^c Valores de turbidez para ambos os sistemas Filta-Max e Envirochek com diluição 1 : 1

^d Valores de turbidez para ambos os sistemas Filta-Max e Envirochek com diluição 1 : 1

^e Valores de turbidez para ambos os sistemas Filta-Max e Envirochek com diluição 1 : 1

^f Valores de turbidez para o sistema Filta-Max com diluição 1 : 1

CONCLUSÕES

O Laboratório Metropolitano da COPASA encontra-se com a metodologia 1623 da USEPA implantada, apto a processar amostras de águas naturais e amostras obtidas no processo de tratamento, viabilizando a COPASA em seu atendimento à Portaria 1469.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20^a edição, Washington, AWWA, APHA, WEF, 1998.

2. Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria nº1469, de 29 dez.2000. Diário Oficial, Brasília, 22 fev. 2001.

3. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 1623 : *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. Washington, DC : EPA, April, 1999 (EPA-821-R-99-006).

4. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Results of the Interlaboratory Method Validation Study for Determination of *Cryptosporidium* and *Giardia* Using U.S. EPA Method 1623. Washington, DC : EPA, April, 2001 (EPA-821-R-01-028).