



NORMA TÉCNICA

L5.503

Mar/1987
24 PÁGINAS

Enterovirus em água - concentração de amostras a partir de grandes volumes de água: método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	<p style="text-align: center;">ENTEROVÍRUS EM ÁGUA - CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS A PARTIR DE GRANDES VOLUMES DE ÁGUA</p> <p style="text-align: center;">Método de ensaio</p>	<p style="text-align: center;">L5.503</p> <p style="text-align: center;">MAR/87</p>
--------	---	---

<u>Sumário</u>	Pág.
Introdução	1
1 Objetivo	2
2 Normas Complementares	2
3 Definições	2
4 Aparelhagem	3
5 Execução do Ensaio	7
Anexo A Prescrições Gerais	19
Anexo B Esquemas de Procedimento.....	21
Anexo C Referências Bibliográficas	23

INTRODUÇÃO

A eficiência de um método de concentração de vírus pode variar amplamente, dependendo da qualidade da água.

A detecção de vírus infecciosos na água requer três etapas gerais:

- a) coletar uma amostra representativa;
- b) concentrar os vírus da amostra;
- c) identificar e estimar as quantidades dos vírus concentrados.

A escolha de um método adequado de concentração para isolamento de vírus depende não só do conteúdo viral como das características da amostra em estudo, pois a matéria orgânica ou substâncias que conferem turbidez à água podem interferir no processo.

Diferentes métodos têm sido empregados na concentração a partir de grandes volumes de água, visando à detecção de vírus. Alguns, com bons resultados frente a amostras experimentais, isto é, que contêm concentrações conhecidas de vírus.

Os métodos de concentração viral freqüentemente são capazes de processar somente volumes limitados de água de determinada qualidade. Para água potável e outras águas relativamente não muito poluídas, os níveis de vírus são presumivelmente tão baixos que cen

tenas ou talvez milhares de litros precisam ser coletados para aumentar a probabilidade de detectar os vírus.

O método de concentração viral por adsorção e eluição de filtros microporosos pode ser usado tanto para pequenos volumes de água natural quanto para grandes volumes de água potável ou altamente tratada.

Embora vários dos métodos empregados tenham se mostrado eficientes para a concentração de alguns vírus entéricos, nem sempre se mostram igualmente eficientes para outros grupos de vírus importantes para a saúde pública. Convém lembrar também que os métodos de concentração continuam constantemente em desenvolvimento.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método de concentração de enterovírus a partir de grandes volumes de água, "in loco" e/ou em laboratório.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- a) M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia;
- b) L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos;
- c) L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura;
- d) L5.114 - Determinação de cloro residual em águas, método ortotoluidina-arsenito, medida em campo.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.7.

3.1 Adsorção

Associação de partículas virais à superfície da matriz da membrana filtrante, por meio de processos físico-químicos.

3.2 Concentração

Processo pelo qual se reduz a porção líquida de uma amostra, mantendo todo seu conteúdo sólido.

3.3 Concentração por filtração

Concentração efetuada com o uso de membrana filtrante.

3.4 ETA

Estação de tratamento de água.

3.5 "in loco"

No local.

3.6 p.a.

Para análise.

3.7 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

4 APARELHAGEM

4.1 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado e ser equipada com termostato, válvula de segurança, um manômetro e um termômetro, cujo bulbo fique na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave é normalmente operada a uma pressão de vapor de 15 libras por polegada quadrada, produzindo, em seu interior, uma temperatura de $121,6^{\circ}\text{C}$ ao nível do mar. Deve-se observar, em seu funcionamento, a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara. A operação total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operações e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121°C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

4.2 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, frascos para reagentes e meios de cultura e toda vidraria e aparelhagem que pode ser esterilizada por calor seco, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170 a 180°C . O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 2 horas, à temperatura de 170 a 180°C .

4.3 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas, quando o material de trabalho estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande, devem ser colocados um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deverá manter 75 a 85% de umidade relativa e ser colocada em local onde a temperatura permanece preferencialmente na faixa de 16 a 27°C .

4.4 Destilador de água ou aparelho para deionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram no desenvolvimento das culturas de células.

4.5 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C , com capacidade para conter os meios de cultura e as soluções a serem mantidas sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.6 Congelador

Com regulagem para manter a temperatura na faixa de -20°C a -70°C . É destinado ao armazenamento de solução e dos concentrados das amostras. A limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.7 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com exatidão e com precisão mínima de 0,1 unidade de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de pH 4,00, pH 6,86 e pH 9,18.

4.8 Balanças

4.8.1 Com sensibilidade para 0,1 g ao pesar 150 g.

4.8.2 Com sensibilidade para 1 mg ao pesar 10 g.

4.9 Câmaras de fluxo laminar vertical

Sistemas eletromecânicos capazes de criar uma massa contínua de ar ul

trafiltrado, livre de partículas e bactérias. Proporcionam grande segurança nos manuseios que devem ser realizados em condições de esterilidade.

4.10 Centrífuga refrigerada

Com velocidade até 6 000 rpm e que tenham rotores com caçapas para volumes de até 20 ml e 1 000 ml.

4.11 Dosador de fluido com câmara de mistura

Equipamento utilizado em campo para auxiliar na filtração de grandes volumes de água. Determina medidas precisas das soluções ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ e mistura) que são adicionadas ao fluido principal (água) da operação. É completamente hidráulico e não requer energia elétrica.

4.12 Fonte de pressão

Bomba de pressão ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão de 147,1 kPa.

4.13 Porta-filtros

De aço inoxidável, diâmetro de 293 mm.

4.14 Vasilhames de pressão

De aço inoxidável, com capacidade de 5 a 20 litros.

4.15 Placa agitadora magnética

Com velocidade regulável.

4.16 Barra magnética

Recoberta por teflon, tamanho 6 cm x 1 cm.

4.17 Materiais para preparação de meios de cultura e reagentes

Recipiente de vidro neutro (borossilicato) ou aço inox. O material de aquecimento e os bastões devem estar limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

4.18 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 1 ml, 5 ml e 10 ml, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5%, e com bocal para tampão de algodão. Devem ser guardadas em caixas de aço inoxidável, podendo também ser embrulhadas individualmente em papel kraft. Devem ser esterilizadas por calor seco a 170-180°C, durante 2 horas.

4.19 Porta-pipetas de aço inoxidável

4.20 Provetas graduadas

Com marcação externa, nos volumes de 100, 250, 500, 1.000 e 2.000 ml.

4.21 Tubos de ensaio

De borossilicato ou vidro neutro, de 15 mm x 150 mm, com tampa de rosca.

4.22 Seringas hipodérmicas com agulha

4.23 Mangueiras de borracha

Com parede espessa, resistentes à pressão.

4.24 Mangueiras de plástico rígido, de 6,4 mm

4.25 Terminais de mangueira

De aço inoxidável, para a conexão aos vasilhames de pressão.

4.26 Braçadeiras

Tipo rosca sem fim de 25,4 mm e 12,7 mm.

4.27 Chaves de fenda

4.28 Chaves especiais para os porta-filtros

4.29 Conjunto de chaves Allen

Para montagem do dosador de fluido.

4.30 Pinça

Dente de rato, de aço inoxidável.

4.31 Pré-filtro de fibra de vidro

Tipo AP-20, com diâmetro de 293 mm.

4.32 Tubos de centrífuga

Com capacidade de 20 ml, 100 ml e 1.000 ml.

4.33 Pera de sucção ou pipetador de segurança

4.34 Pincel demarcador

Para escrita em vidro.

4.35 Alcoômetro

4.36 Bico de Bunsen

4.37 Grifo

4.38 Frascos de plástico

De polietileno, com capacidade para 5 litros, para levar soluções de coleta ao campo.

4.39 Vasilhames de plástico

Com capacidade para 20 litros, para coletar amostras de água.

4.40 Caixas de madeira

Para acondicionamento dos equipamentos e dos frascos contendo as soluções.

4.41 Caixas térmicas de isopor

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

Para pesquisar a presença de vírus em água é preciso levar em consideração três aspectos básicos:

- a) necessidade de concentrar volumes de água para obterem-se pequenos volumes possíveis de serem analisados;
- b) eficiência na recuperação dos vírus presentes na amostra concentrada;
- c) existência de um sistema hospedeiro susceptível (cultura celular), de modo a tornar possível o isolamento e a identificação dos vírus.

Os vírus são essencialmente nucleoproteínas e as técnicas usadas para a concentração são geralmente modificações dos processos aplicados ao estudo de proteínas macromoleculares e dependem das propriedades físico-químicas das partículas virais. Em suspensão, os vírus se comportam como partículas coloidais hidrofílicas e sua sensibilidade decresce com o aumento da concentração de sais solúveis. São anfóteros, isto é, comportam-se como partículas de carga elétrica positiva ou negativa, dependendo do pH.

A concentração do vírus se deve a forças seletivas que adsorvem as partículas às membranas filtrantes. Essas forças são predominantemente iônicas e podem ser controladas pela manipulação de fatores tais como pH, temperatura, eletrólitos e adsorventes. O ajuste do pH para 3,5 e a adição de sais, especialmente cátions divalentes, aumentam bastante a adsorção pela mudança de carga elétrica do vírus e conseqüente alteração de sua atração eletrostática pela membrana.

Uma vez adsorvidos, o passo seguinte é a eluição dos vírus. Para tal utiliza-se solução protéica (extrato de carne) com pH elevado que propiciará a remoção dos vírus retidos na membrana.

5.2 Reagentes

5.2.1 Para o preparo dos meios de cultura, dá-se preferência à utilização de meios desidratados de procedência idônea, visando maior uniformidade dos mesmos. Pode-se no entanto, prepará-los em laboratório, sendo que os reagentes a serem utilizados devem ser pró-análise ou de alto grau de pureza, procedência idônea, apresentando odor, cor e consistência inalteradas.

5.2.2 Reagentes necessários

- a) ácido clorídrico (HCl), p.a.;
- b) água destilada;
- c) anfotericina B (Fungizona), 250 mg/ml;
- d) álcool etílico absoluto;
- e) Bacto-soytone (peptona de soja);
- f) cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), p.a.;
- g) cloreto de sódio (NaCl), p.a.;
- h) dextrose;
- i) extrato de carne em pasta;
- j) fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), p.a.;
- l) fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), p.a.;
- m) formalina;
- n) hidróxido de sódio (NaOH) em escamas, p.a.;
- o) hipoclorito de sódio;
- p) penicilina G potássica 10.000 000 UI/100 ml;
- q) sulfato de gentamicina 40 mg/ml;
- r) tiosulfato de sódio;
- s) triptona.

5.3 Materiais

5.3.1 Algodão hidrófilo

5.3.2 Fita adesiva

Para controle do material submetido à esterilização, em estufa e autoclave.

5.3.3 Fita crepe

5.3.4 Fita de teflon

Para vedar juntas.

5.3.5 Gaze estéril

5.3.6 Gelo

5.3.7 Membranas filtrantes estéreis

De éster de celulose, com porosidade de 0,45 μm , de diâmetro de 293 mm.

5.3.8 Papel alumínio

5.3.9 Papel kraft

5.3.10 Rolhas de borracha resistentes a ácidos nº 2 e 3

5.4 Meios de cultura

5.4.1 Caldo Triptona-Soja (Tryptic Soy Broth)

Fórmula:

Triptona	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
Dextrose	2,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico	2,5 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 ml
pH final após esterilização: 7,3 \pm 0,1	

Preparo:

Pesar 30 g do meio desidratado caldo triptona-soja e acrescentar 1 000 ml de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente

até a completa dissolução do meio e tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH para 7,3 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH - 1N). Distribuir volumes de 12 ml em tubos de 15 mm x 160 mm, com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos (ver 5.6.2).

5.4.2 Extrato de carne a 3%

Fórmula:

Extrato de carne 9,0 g
Água destilada q.s.p..... 300 ml
pH final: 9,0

Preparo:

Pesar 9 g de extrato de carne em um erlenmeyer de 500 ml e acrescentar 300 ml de água destilada fria, agitando até completa dissolução. Acertar o pH com hidróxido de sódio (NaOH-6N). Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos (ver 5.6.2). Estocar em geladeira (2 a 8°C).

5.5 Soluções

5.5.1 Álcool a 70%

Fórmula:

Álcool etílico absoluto 700 ml
Água destilada 300 ml

Preparo:

Juntar os componentes e determinar o teor de álcool através de um alcoômetro.

5.5.2 Solução de ácido clorídrico (HCl - 1N)

Fórmula:

Ácido clorídrico 83,5 ml
Água destilada 916,5 ml

Preparo:

Em um balão volumétrico com 916,5 ml de água destilada, adicionar 83,5 ml de ácido clorídrico fumegante.

5.5.3 Solução de ácido clorídrico (HCl - 6N)Fórmula:

Ácido clorídrico	501,0 ml
Água destilada	499,0 ml

Preparo:

Em um balão volumétrico com 499,0 ml de água destilada, adicionar 501,0 ml de ácido clorídrico fumegante.

5.5.4 Solução de ácido clorídrico (HCl - 0,12N)Fórmula:

Ácido clorídrico	10,02 ml
Água destilada	989,98 ml

Preparo:

Em um balão volumétrico com 989,98 ml de água destilada, adicionar 10,02 ml de ácido clorídrico fumegante.

5.5.5 Solução de hidróxido de sódio (NaOH - 1N)Fórmula:

Hidróxido de sódio	40,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 ml

Preparo:

Pesar 40 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000 ml com água destilada.

5.5.6 Solução de hidróxido de sódio (NaOH - 6N)Fórmula:

Hidróxido de sódio	240,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 ml

Preparo:

Pesar 240,0 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000 ml de água destilada.

5.5.7 Solução de cloreto de alumínio (AlCl₃ - 2M)

Fórmula:

$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	482,86 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 ml

Preparo:

Pesar 482,86 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e acrescentar 1 000 ml de água destilada fria com agitação constante até completa dissolução. Distribuir em volumes de 125 ml em frascos de diluição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos (ver 5.6.2).

5.5.8 Solução de cloreto de alumínio (AlCl_3 - 0,1M)Fórmula:

$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	24,14 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 ml

Preparo:

Pesar 24,14 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e acrescentar 1 000 ml de água destilada fria com agitação constante até completa dissolução. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos (ver 5.6.2).

5.5.9 Solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a 0,5%Fórmula:

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	25,0 g
Água destilada q.s.p.....	5 000 ml

Preparo:

Pesar 25 g de tiosulfato de sódio e dissolver em 5 000 ml de água destilada fria. Agitar até completa dissolução. Dividir o volume de 2 500 ml em frascos de vidro âmbar para esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos (ver 5.6.2).

5.5.10 Solução salina (NaCl)-0,14M)Fórmula:

Cloreto de sódio (NaCl)	32,72 g
Água destilada q.s.p.....	4 000 ml
pH final: 3,5	

Preparo:

Pesar 32,72 g de cloreto de sódio e dissolver em 4 000 ml de água

destilada fria. Agitar até completa dissolução. Acertar o pH com ácido clorídrico (HCl - 6N). Dividir o volume de 2 000 ml em frascos de vidro âmbar para esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos (ver 5.6.2).

5.5.11 Solução de fosfato de sódio (Na₂HPO₄.7H₂O) a 0,15M

Fórmula:

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	4,02 g
Água destilada q.s.p.....	100 ml
pH final: 9,0	

Preparo:

Pesar 4,02 g de Na₂HPO₄.7H₂O e acrescentar 100 ml de água destilada fria. Agitar até completa dissolução. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos (ver 5.6.2).

5.5.12 Solução-estoque de penicilina G-potássica cristalina

Fórmula:

Penicilina G-potássica cristalina ...	10 000 000 UI
Solução balanceada de Hanks 1X concentrada...	100 ml

Preparo:

Dissolver o conteúdo de um frasco de penicilina G-potássica cristalina (100 milhões UI) em 100 ml de solução balanceada de Hanks 1X concentrada. Acertar o pH para 7,0-7,2 com bicarbonato de sódio a 7,5%. Distribuir a solução em volumes de 50 ml. Armazenar em congelador a - 20°C:

5.5.13 Solução de sulfato de gentamicina

Fórmula:

Sulfato de gentamicina (cada 1 ml contém 40 mg de gentamicina-base)	1 ml
Solução balanceada de Hanks 1X concentrada	3 ml

Preparo:

Dissolver o conteúdo de uma ampola de sulfato de gentamicina (40 mg) em 3 ml de solução balanceada de Hanks 1X concentrada. Acertar o pH para 7,0-7,2 com bicarbonato de sódio a 7,5%. Armazenar em congelador a - 20°C.

5.6 Esterilização das soluções e meios de cultura

5.6.1 Filtração

A filtração de soluções ou de meios de cultura que contêm substâncias termolábeis é feita com pressão positiva ou vácuo, usando-se membrana de éster de celulose acopladas, com as seguintes porosidades: 0,45 μm e 0,22 μm . Membranas clarificantes de fibra de vidro podem também ser incluídas (as de tipo AP-20 são as mais indicadas). A montagem das membranas deve ser feita obedecendo a uma ordem decrescente de porosidade.

Todos os materiais e equipamentos utilizados para a filtração devem ser esterilizados previamente por autoclavação a 121°C, durante 15 minutos.

5.6.2 Autoclavação

Esterilização de soluções ou de meios de cultura em autoclave deve ser feita em temperatura de 121°C durante 15 minutos. Durante a autoclavação de meios de cultura, não deve haver excesso de aquecimento para evitar uma sobrecarga térmica que possa produzir hidrólise, peptonação, caramelização ou outro tipo de destruição das substâncias que constituem os meios de cultura.

5.7 Controle de esterilidade das soluções e meios de cultura

Após terem sido preparados e antes de serem usados, quaisquer soluções ou meios de cultura devem ser testados, quanto à presença de fungos ou de bactérias contaminantes.

5.8 Estocagem das soluções

As soluções são estocadas em geladeira (2 a 8°C) ou em congelador (-20°C). São mantidas em frascos bem fechados, com rolhas de borraça ou tampa com rosca, pois os tampões de algodão podem permitir a entrada e a conseqüente absorção de substâncias, tais como a formalina e a amônia. Soluções alcalinas não devem ser estocadas em frascos de vidro por muito tempo, pois esses frascos são lentamente dissolvidos e íons de metais pesados são, posteriormente, encontrados nessas soluções.

5.9 Procedimento

As quantidades mínimas de água tratada e de manancial submetidos à filtração são, respectivamente, de 400 e 40 litros. O ponto de coleta de água tratada deve estar situado logo após o tratamento comple

to da água e, nesse local, a pressão deve ser de aproximadamente 245,2 kPa. A água bruta deve ser coletada no ponto de captação do manancial ou na entrada da ETA, antes do início de qualquer processo de tratamento ou da aplicação de qualquer reagente, em vasilhames de plástico estéreis; em seguida, prepara-se para o processo de concentração "in loco" ou envia-se ao laboratório o mais rápido possível.

5.9.1. Concentração de amostras de água tratada por filtração "in loco" (Anexo B-1)

5.9.1.1 No laboratório, montar o sistema de porta-filtro de 293 mm de diâmetro, colocando assepticamente a membrana de éster de celulose de 0,45 μ m de porosidade e o pré-filtro de fibra de vidro AP-20, previamente esterilizado.

5.9.1.2 No campo, montar o sistema de propulsão (dosador) do seguinte modo:

- a) abrir a torneira do ponto de coleta e deixar a água escorrer por 10 minutos;
- b) medir o pH inicial e o cloro residual livre da água (ver Norma CETESB L5.114);
- c) preparar a mistura a ser utilizada no sistema de propulsão da seguinte forma:
 - colher, num erlenmeyer, 1 litro da água a ser concentrada, acrescentar 0,25 ml de $AlCl_3$ 2M e, em seguida, ajustar o pH para 3,5 com HCl 0,12N. Anotar a quantidade de ácido consumida.
 - calcular o volume de ácido necessário para ajustar o pH de 500 litros de amostra. Ex: se forem necessários, 10 ml de HCl 0,12N para acertar o pH de 1 litro da amostra, serão necessários 50 ml de HCl 12N para acertar o pH de 500 litros da mesma, pois o valor encontrado do HCl 0,12N para 1 litro deve ser multiplicado por 5, determinando-se assim a quantidade de HCl 12N a ser utilizado em 500 litros de amostra;
 - preparar a mistura, retirando de um galão de 5 litros de água destilada o mesmo volume dos reagentes a serem utilizados ($AlCl_3$ 2M e HCl 12N). A seguir, acrescentar 125 ml de $AlCl_3$ 2M (volume constante) e o volume adequado de HCl 12N, previamente calculado.

Nota: Deve ser preparada uma quantidade maior da mistura para os testes iniciais de pH e cloro livre e para encher totalmente a mangueira.

- d) conectar a mangueira de entrada da bomba dosadora à torneira;
- e) regular os pistões dosadores da mistura e do tiosulfato de sódio para 1,28 o que dará um fator de diluição de 1:100. Então, para cada porção de água contida na câmara de mistura cheia, o cloreto de alumínio 2M apresentará uma concentração final de 0,000 5 M (5 ml de $AlCl_3$ 2M para 1 litro de água), o pH 3,5 e o cloro residual livre igual a zero (1 ml de tiosulfato de sódio 0,5% por litro de água).
- f) após os testes iniciais para determinação de pH e cloro livre, conectar a mangueira de saída da bomba dosadora ao conjunto do porta-filtro e, na saída do mesmo, conectar um hidrômetro para registrar a quantidade de água filtrada.

5.9.1.3 Proceder à filtração da amostra, em campo, com uma pressão de 245,2 kPa, registrada por um manômetro colocado em um ponto próximo à entrada de água no dosador.

5.9.1.4 Verificar periodicamente o filtrado para assegurar-se de que o pH esteja a 3,5 e não haja cloro residual.

5.9.1.5 Após filtrar os 400 litros, desconectar o porta-filtro do sistema dosador e conectar a um vasilhame de pressão de 5 litros com solução salina pH 3,5 para lavagem da membrana e, em seguida, proceder à eluição.

5.9.2 Eluição da amostra filtrada

5.9.2.1 Remover a água residual do porta-filtro, aplicando pressão positiva, e desprezá-la.

5.9.2.2 Colocar diretamente na entrada do porta-filtro 300 ml de extrato de carne a 3% pH 9,0.

5.9.2.3 Deixar 30 minutos em tempo de contato.

5.9.2.4 Aplicar pressão positiva ao porta-filtro e colher o eluído em erlenmeyer de 500 ml.

5.9.2.5 Acertar para pH 7,0 o eluído com solução de ácido clorídrico 6N e transportar ao laboratório sob refrigeração.

5.9.2.6 No laboratório dar prosseguimento à análise, adicionando ao eluído solução de ácido clorídrico 6N, gota a gota e com agitação constante, até atingir pH 3,5. Caso não seja possível dar prosseguimento à análise no mesmo dia congelar a amostra a -70°C .

5.9.2.7 Deixar em agitação lenta por 30 minutos.

5.9.2.8 Centrifugar a 4 000 rpm por 30 minutos em centrífuga refrigerada.

5.9.2.9 Desprezar o sobrenadante e eluir o sedimento com 15 ml de fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 0,15M, pH 9,0 e deixar agitando por 15 minutos.

5.9.2.10 Após os 15 minutos, acertar o pH para 7,0 - 7,2 e proceder à descontaminação.

5.9.3 Concentração de amostras de água bruta por filtração em laboratório (Anexo B-2).

5.9.3.1 Colher 40 litros de água em vasilhames de plástico com capacidade para 20 litros cada.

5.9.3.2 Colocar 20 litros da água a ser filtrada em 2 vasilhames de pressão desta capacidade.

5.9.3.3 Homogeneizar a água, utilizando agitador e barra magnética.

5.9.3.4 Medir com potenciômetro o pH inicial da água.

5.9.3.5 Montar o sistema de porta-filtro de 293 mm de diâmetro, colocando assepticamente a membrana de éster de celulose com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ e o pré-filtro de fibra de vidro AP-20, previamente esterilizados (Anexo A). Conectar as mangueiras de saída de água do vasilhame de pressão ao porta-filtro.

5.9.3.6 Juntar à água, lentamente e com agitação contínua, 100 ml da solução de $AlCl_3$ 0,1M para cada 20 litros de água para obter uma concentração final de 0,000 5M.

5.9.3.7 Adicionar à água solução de ácido clorídrico 6N, gota a gota com agitação constante, até atingir pH 3,5.

5.9.3.8 Medir novamente o pH da água, que deverá ser igual a 3,5.

5.9.3.9 Fechar o vasilhame de pressão e proceder à filtração de 40 litros de água, no mínimo, a uma pressão máxima de 147,1 kPa.

5.9.3.10 Após a filtração, conectar ao porta-filtro um vasilhame de pressão de 5 litros com solução salina pH 3,5 para lavagem da membrana e, em seguida, proceder à eluição, de acordo com 5.9.2.

5.9.4 Descontaminação da amostra

Antes de ser inoculada em culturas de células, a amostra deve ser submetida a teste de esterilidade quanto à presença de bactérias e fungos contaminantes. Este teste deve ser realizado em câmara de fluxo laminar vertical, observando-se todas as medidas de assepsia.

5.9.4.1 Em flaconete estéril, previamente rotulado com os dados da amostra, adicionar 0,4 ml de penicilina para cada volume de 15 ml de amostra, 0,3 ml de gentamicina e 0,3 ml de fungizona líquida. Agitar bem a amostra.

5.9.4.2 Deixar em contato, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Após o período de contato, a amostra deve ser testada quanto à esterilidade em caldo triptona-soja ("tryptic soy broth").

5.9.4.3 Incubar na estufa a 35°C, durante 14 dias.

Nota: Caso as amostras continuem a apresentar contaminação, submetê-las a centrifugação a 4 000 rpm por 15 minutos e depois proceder conforme descrito em 5.9.4.1, 5.9.4.2 e 5.9.4.3.

ANEXO A - PRESCRIÇÕES GERAIS

A-1 Ensaio de controle

A-1.1 Teste de esterilidade

Este teste consiste na inoculação de 0,5 ml do volume da amostra em dois tubos contendo caldo triptona-soja, que são incubados a 35°C. Efetuar leituras diárias durante 14 dias. Constitui evidência da presença de microrganismos qualquer turvação do meio.

A-1.2 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos Bacillus stearothermophilus em meio de cultura, colocando-as entre os frascos ou materiais a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria, a 55°C durante 24-48 horas.

Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

A-2 Lavagem, esterilização do equipamento de filtração (Vasilhame de pressão e porta-filtro) (Ver Norma CETESB M1.002)

A-3 Desinfecção do equipamento de filtração: dosador de fluido, da câmara de mistura e das mangueiras

Após a concentração da amostra, fazer passar pelo sistema de filtração 5 l de uma solução de hipoclorito de sódio a 2% de cloro livre por litro e deixar esta solução em contato durante 1 hora. Esgotar então a solução de hipoclorito de sódio e fazer passar 5 l de uma solução de tiosulfato de sódio (ver 5.5.9) para neutralizar o cloro residual. A verificação desta neutralização é feita colocando, em um volume de 9,5 ml da água que sai do sistema, 0,5 ml de solução de ortotoluidina (Ver Norma CETESB L5.114). A ausência de coloração na água indica que o cloro residual foi neutralizado. Esgotar então a solução de tiosulfato de sódio e fazer passar cerca de 5 litros de água destilada. Esgotar a água do sistema e vedar a entrada e saída das mangueiras com folha de alumínio.

A-4 Desinfecção dos vasilhames de plástico usados para coleta de água bruta

Colocar solução de hipoclorito de sódio a 2% nos vasilhames, deixando esta solução em contato durante uma hora.

Esgotar a solução de hipoclorito de sódio e colocar solução de tiosulfato de sódio (ver 5.5.9) para neutralizar o cloro residual. Verificar a neutralização deste, conforme Norma CETESB L5.114. Enxaguar os vasilhames com água destilada. Fechar os vasilhames com as respectivas tampas.

A-5 Ao preparar soluções com ácidos, nunca adicionar a água sobre o ácido (pois isto poderá provocar sérios danos ao operador), mas sim ácido à água.

A-6 Local de trabalho

A-6.1 As câmaras de fluxo laminar vertical devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido e livres de poeiras.

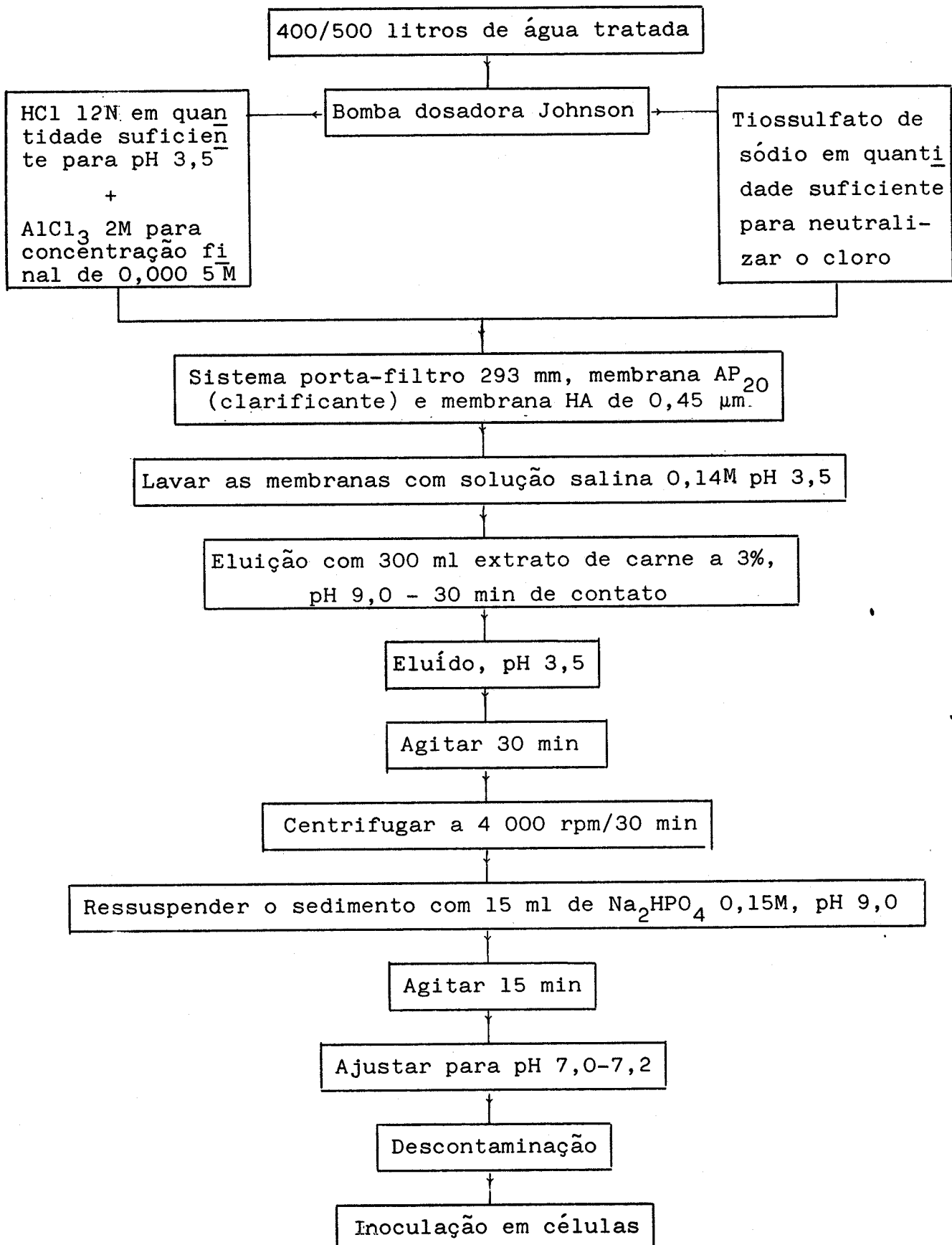
A-6.2 Se a câmara estiver instalada em local com ar condicionado, a entrada do ar não deverá ser dirigida diretamente sobre o campo de trabalho, a não ser que o condicionador tenha um filtro de ar especial.

A-6.3 A limpeza da sala é feita após o expediente diário sem varrições exageradas e, de preferência, empregando solução de formalina ou de outro desinfetante. Chão, mesa e balcões são limpos diariamente. Nos fins de semana realiza-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive vidros e paredes. Esporadicamente, após a limpeza o ambiente é impregnado com uma solução alcoólica de formol a 8%, que é colocada em placas de Petri, para evaporar.

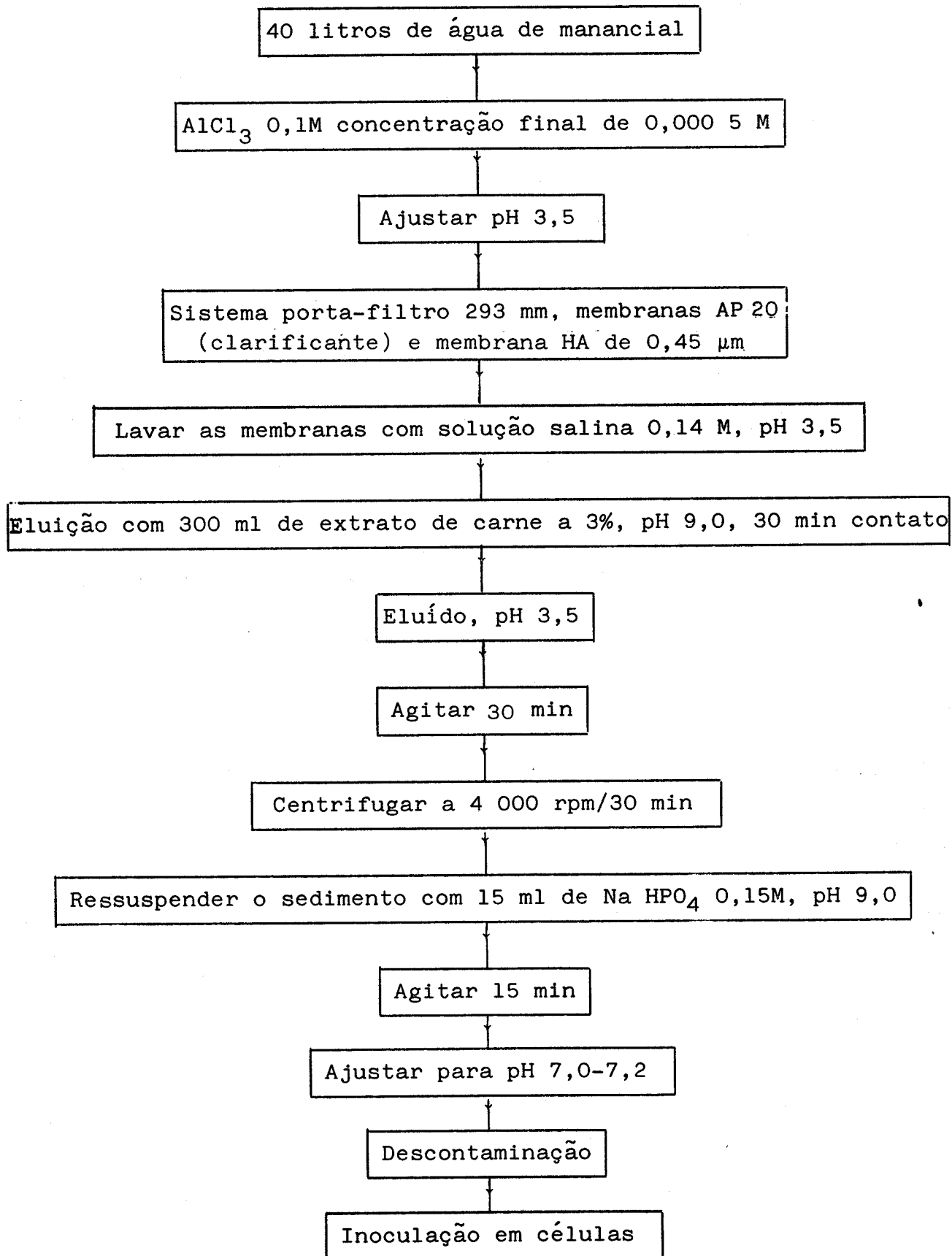
A-7: Precauções

Dentre as pessoas que trabalham no laboratório, aquelas que têm menor tempo de treinamento e as que estão mais diretamente associadas a manobras com material infectado são as que apresentam maiores possibilidades de serem infectadas acidentalmente.

A inalação de aerossóis, a aspiração de soluções contaminadas através de pipetas, acidente de centrifugação, etc., provocam, comprovadamente, grande número de infecções acidentais e devem ser prevenidas pelo uso de máscaras descartáveis de papel, pipetadores e pela obediência às instruções específicas de trabalho e de uso do equipamento.

ANEXO B - ESQUEMAS DE PROCEDIMENTO**B-1 Concentração em amostras de água tratada por filtração "in loco"**

B-2 Concentração em amostras de água bruta por filtração em laboratório



ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 16 ed. Washington, APWA, AWWA, WPCF, 1985, p. 946-959.
- C-2 ANDERSON, N.G. et alii. Isolation of viral particles from large fluid volumes. In: Berg G. Transmission of viruses by the water route, New York, John Wiley & Sons, 75-88, 1965
- C-3 BERG, G. et alii. A sensitive quantitative method for detecting small quantities of virus in large volumes of water. American Journal of Epidemiology, 83 (2): 196-203, 1966.
- C-4 BERG, G. et alii. Recovery of small quantities of viruses from clean waters on cellulose nitrate membrane filters. Applied Microbiology, 22 (4): 608-614, 1971.
- C-5 BERG, G.; HOFF, J.C. & AKIN, E.W. Removal of viruses from raw waters by treatment processes. Viral Pollution of the Environment 53-75, 1983
- C-6 BITTON, G; FARRAH, S.R.; MONTAGUE, C.L.; AKIN, E.W. Viruses in drinking water. Environ. Sci. Technol., 20 (3): 216-222, 1986.
- C-7 BUTLER, M; MEDLEN, A.R. & MORRIS, R. Viruses and disinfection of water and wastewater. University of Surrey Print Unit, September 1982.
- C-8 CETESB, São Paulo. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia, (N.T. M1.001).
- C-9 _____. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1978 (N.T. L5.215).
- C-10 _____. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1979 (N.T. L5.216).
- C-11 _____. Determinação de cloro residual em água, método ortotolidina-arsenito, medida de campo. São Paulo, (N.T. L5.114).

- C-21 OMS, Genebra. Vigilancia de la calidad del agua potable. Genebra, 1977. 145 p.
- C-22 RAO, M.V. & LARZOFFSKY, N.A. A simple method for low concentration of viruses in large volumes of water by the membrane filter technique. Canadian Journal of Microbiology, 15: 399-403, 1969.
- C-23 SOBSEY, M.D. et alii. Concentration of enteroviruses from large volumes of water. Applied Microbiology, 26 (4): 529-534, 1973.
- C-24 SOBSEY, M.D. Enteric viruses and drinking water supplies. Journal American Water Work Association, August, 1975.
- C-25 SOBSEY, M.D. & GLASS, J.S. Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. Applied and Environmental Microbiology, 40 (2) August, 1980.
- C-26 TYLER, J. Occurrence in water of viruses of public health significance. Society for Applied Bacteriology Symposium Series n° 14. Supplement to Journal of Applied Bacteriology, 59: 375-465, 1985.
- C-27 WALLS, C. et alii. Enterovirus concentration on cellulose membranes. Applied Microbiology, 23 (3): 476-480, 1972.
- C-28 WALLIS, C. & MELNICK, J.L. Concentration of viruses on aluminum and calcium salts. American Journal of Epidemiology, 85 (3): 458-468, 1967.
-