

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Romeu Cantusio Neto

**OCORRÊNCIA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. E CISTOS DE
Giardia spp. EM DIFERENTES PONTOS DO PROCESSO DE
TRATAMENTO DE ÁGUA, EM CAMPINAS, SÃO PAULO, BRASIL**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do Título de Mestre em Parasitologia

Orientador: Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco

**Campinas - SP
2004**

Campinas, 26 de Março de 2004.

Banca Examinadora

Profa. Dra.
Regina Maura Bueno Franco

Assinatura

Profa. Dra.
Ana Maria Aparecida Guaraldo

Assinatura

Prof. Dr.
José Euclides Stipp Paterniani

Assinatura

Profa. Dra.
Marlene Tiduko Ueta

Assinatura

Profa. Dra.
Silmara Marques Allegretti

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Biologia/Unicamp, pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco pela orientação, incentivo, apoio, e amizade durante o curso de Pós-Graduação e realização desse trabalho. Também pelos valiosos conhecimentos transmitidos através de nosso trabalho em conjunto nestes últimos anos e exemplo de dedicação ao Estudo, Ciência e ao trabalho que tem demonstrado nestes últimos anos.

À Pré-banca, pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento desse trabalho.

À SANASA, Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A, que autorizou a realização desse curso de Pós-Graduação.

À Biblioteca da SANASA, pelo auxílio na revisão das Referências Bibliográficas e aos funcionários do Laboratório Central pelo auxílio e apoio na realização das análises.

À Profa Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo pelo estímulo e confiança na realização desta Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Isaac (FEC) pelo auxílio na preparação de amostras de água artificial.

À minha esposa e meus filhos pelo apoio, muita compreensão e estímulo nas difíceis etapas cumpridas desse trabalho.

Por fim e na verdade por todas as coisas, a “Esse Grande Deus e Pai” que me supriu, supre e suprirá em todos os meus anseios. Obrigado!

Resumo

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. são protozoários transmitidos por meio de águas contaminadas e podem causar gastroenterite moderada a severa no homem e animais. Por apresentarem grande resistência às condições ambientais e aos desinfetantes químicos empregados para potabilizar a água, assumiram grande relevância para os sistemas de abastecimento público de água. O propósito deste estudo foi investigar a ocorrência destes parasitos em uma estação de tratamento de água (ETA), em Campinas, SP. Para tanto, a presença de cistos, oocistos, parâmetros físico-químicos e bacteriológicos foram determinados em amostras de água bruta do rio Atibaia (captação) e em diferentes pontos do sistema de tratamento de água (após as etapas de decantação e filtração) da ETA 3 (Sanasa/Campinas). Foram realizados dois experimentos: um no período de seis meses (Experimento I), com periodicidade de 20 dias; posteriormente, durante três dias consecutivos, foram colhidas duas amostras diárias dos mesmos pontos, totalizando 18 amostras (Experimento II).

As diversas amostras foram filtradas em membranas de ésteres mistos de celulose (3 µm de porosidade nominal), seguida de eluição mediante extração mecânica. Após concentração por centrifugação (600 x g; 15 minutos), os sedimentos resultantes foram examinados mediante a reação de imunofluorescência direta e teste confirmatório da morfologia empregando-se o corante fluorogênico DAPI ((4',6'-diamidino-2-phenylindole). Os demais parâmetros foram determinados de acordo com os procedimentos descritos no "Standard Methods, 1998".

A presença de cistos de *Giardia* na água bruta captada ocorreu em 90% das amostras do experimento I e em 100% das amostras do experimento II, respectivamente.

Cryptosporidium não foi detectado em ambos os experimentos. Não houve correlação estatisticamente significativa quanto à densidade de cistos, parâmetros físico-químicos e bacteriológicos nem evidências de diferenças estatisticamente significativas entre as contagens médias de cistos ao se analisar as variações climáticas. As análises físico-químicas e bacteriológicas atestaram a qualidade da água nas diversas etapas do tratamento e a degradação da qualidade da água bruta. Os resultados obtidos fornecem uma indicação da eficiência na remoção de cistos de *Giardia* pelo sistema convencional de tratamento, no caso da ETA analisada.

Cabe ressaltar que, recentemente a Portaria 1469/00 do Ministério da Saúde/Brasil recomenda que seja feita a determinação da presença de oocistos e cistos em águas destinadas ao consumo humano. Entretanto, a complexidade dos métodos de análises e os altos custos, são fatores limitantes a imediata implantação do monitoramento.

Descritores: *Cryptosporidium*; *Giardia*; água para consumo humano; Campinas; São Paulo; Brasil.

ABSTRACT

Cryptosporidium spp. and *Giardia* spp. are protozoa transmitted by contaminated water that cause moderate to severe gastroenteritis in man and animals. As they present great resistance to environment conditions and chemical disinfectants applied in water purification, they have reached great relevance for water treatment systems. The aim of this study was to investigate the occurrence of these parasites in a water treatment plant (WTP) in Campinas, SP. Therefore, the presence of cysts and oocysts, as well as physical-chemical and bacteriological parameters were determined in raw water samples from the Atibaia River (water source) and at different point of the water treatment system (after sedimentation and filtration steps) from WTP 3 (Sanasa/Campinas). Two experiments were carried out: the first one in a six month- period (Experiment I), with a 20-day interval; it was followed by collection of two daily samples taken at the same points for three consecutive days, totaling 18 samples (Experiment II).

The several samples were filtered through mixed esters of cellulose membranes (3 μm nominal porosity), followed by elution by mechanical extraction. After concentration by centrifugation (600 x g; 15 minutes), the resulting sediments were examined by means of direct immunofluorescence reaction and confirmatory morphological test using the fluorogenic stain DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole). The other parameters were determined according to procedures described in "Standard Methods, 1998".

The presence of *Giardia* cysts in the raw water collected occurred in 90% of samples collected in Experiment I and in 100% of Experiment II samples, respectively. *Cryptosporidium* was not detected in either experiments. There was no statistically significant correlation regarding cyst density, physical-chemical and bacteriological

parameters nor evidence of statistically significant differences among mean cyst counts when climactic variations were analyzed. The physical-chemical and bacteriological analyses attested the quality of water in the different treatment phases and the degradation of raw water quality. The results obtained offered indication of efficiency in the removal of *Giardia* cysts by the conventional treatment system, in the case of the analyzed WTP.

It should be emphasized that recently Decree 1469/00, from the Ministry of Health, Brazil, recommended that the presence of oocysts and cysts in water meant for human consumption be determined. However, the complexity and high cost of analysis methods are limiting factors regarding the immediate monitoring implementation.

Descriptors: *Cryptosporidium*; *Giardia*; drinking water; Campinas; São Paulo; Brazil.

ÍNDICE

RESUMO	iv, v
ABSTRACT	vi, vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO	8
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Locais das Colheitas	25
4.2. Colheitas e Filtrações das Amostras	29
4.3. Recuperação de Oocistos e Cistos a partir do Material Filtrado	30
4.4. Visualização e Quantificação de Oocistos e Cistos por Imunofluorescência Direta e Teste Confirmatório da Morfologia	30
4.5. Critérios de Positividade para Identificação de Oocistos e Cistos	32
4.6. Quantificação do Número de Oocistos e Cistos	33
4.7. Experimentos-controles	33
4.8. Cálculo da Eficiência de Recuperação (%)	34
4.9. Análises Físico-Químicas e Microbiológicas das Amostras	34
4.10. Análise Estatística	35
5. RESULTADOS	36
Capítulo 1	37
6. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES	59
7. CONCLUSÕES	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa de localização do Rio Atibaia	26
Figuras 2a e 2b Vista Aérea da Captação do Rio Atibaia em Campinas	27
Figuras 3a Vista Aérea das Estações de Tratamento de água – Decantadores e filtros da ETA 4 e 3b - Decantadores e filtros da ETA3	28
Figura 4 Cisto de <i>Giardia</i> spp.- Visualizado pela reação de imunofluorescência direta, com anticorpos monoclonais – aumento de 400x	66
Figura 5 Cisto de <i>Giardia</i> spp. – visualizado pela coloração com corante fluorogênico vital – aumento de 400x	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos, bacteriológicos e n° de cistos de <i>Giardia</i> detectados na Captação de água bruta do Rio Atibaia, Campinas, Brasil, no período de março a setembro de 2002. Experimento I.	50
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos e bacteriológicos, na água decantada e filtrada da ETA 3, Campinas, Brasil, no período de março a setembro de 2002. Experimento I.	51
Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos, bacteriológicos e n° de cistos de <i>Giardia</i> detectados na Captação de água bruta do Rio Atibaia, Campinas, Brasil, em dias consecutivos no mês de outubro de 2002. Experimento II.	52
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos e bacteriológicos, na água decantada e filtrada da ETA 3, Campinas, Brasil em dias consecutivos no mês de outubro de 2002. Experimento II.	53
Tabela 5 - Eficiência de Recuperação obtida e valor médio do n° de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> semeados nos experimentos-controle em diferentes tipos de águas.	54

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o primeiro lugar entre os países com melhor reserva de recursos hídricos de água doce do mundo. A demanda de água pelo homem vem crescendo constantemente pelo aumento da população mundial e em especial, pela concentração populacional nas cidades. A urbanização tem, entre suas conseqüências, o desenvolvimento das indústrias e a expansão agropecuária intensa o que pode representar um grave problema pois, além do enorme volume consumido e desperdiçado nem sempre a restituição da água ao meio natural está isenta de riscos à saúde e ao meio ambiente (WHO, 1999).

A crescente degradação ambiental dos recursos hídricos ocorre devido à constante contaminação pelos efluentes domésticos e industriais (PEDRO E GERMANO, 2001) de modo que podem ser encontrados na água microrganismos provenientes do solo, de fezes, de material orgânico em decomposição e de outros tipos de poluentes (BRUM et al, 1997).

Mais de um bilhão de indivíduos nos países em desenvolvimento não tem água devidamente tratada e cerca de três bilhões de pessoas não podem sequer contar com instalações sanitárias adequadas (KRASZEWSKI, 2001). As doenças de transmissão hídrica (principalmente as diarréicas) constituem uma das mais graves ameaças para a saúde da população infantil, particularmente na América Latina e Caribe. Este grupo de doenças encontra-se entre as cinco causas principais de óbito nos indivíduos de um a quatro anos de idade (GELDREICH, 1996).

De várias maneiras a água pode afetar a saúde do homem: através da ingestão direta (água contaminada por agentes biológicos: bactérias, vírus e parasitos) ou

indiretamente pelo consumo de alimentos ou bebidas preparados com água contaminada; ainda, a contaminação do ser humano também pode ocorrer de forma acidental, durante atividades recreacionais ou profissionais (Manual de Saneamento, FUNASA).

Entre os vários agentes patogênicos causadores de surtos de diarreia e que podem ser veiculados pela água, destacam-se os protozoários parasitos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (STATES et al, 1997).

Cryptosporidium é um protozoário de vertebrados, causador, no homem, de diarreia como constatado em diversas partes do mundo (FAYER et al, 2000). A partir de 1997, com os adventos de técnicas moleculares, aceita-se que *C. parvum* compreende, no mínimo, dois genótipos: 1 ou H – infectante somente para o ser humano (antroponótico); 2 ou C – infectante para bovinos, homens e vários animais o que confirma o potencial zoonótico inicialmente atribuído ao protozoário (KOSEK et al, 2001).

O quadro clínico da criptosporidiose é dependente do estado imunológico do hospedeiro: nos indivíduos portadores de imunodeficiência, é caracterizado por diarreia aquosa, severa e crônica, podendo levar a óbito; porém, é auto-limitado em pessoas imunocompetentes (FAYER et al, 2000).

Durante muitos anos, *C. parvum* foi considerado como o único agente etiológico da infecção humana. Recentemente, o uso de técnicas moleculares possibilitou a comprovação de que outras espécies e outros genótipos também afetam o homem, como *C. felis* (CACCIÓ et al, 2002), *C. muris* (KATSUMATA et al, 2001) ou o genótipo cervino (ONG et al, 2002), *C. meleagridis* (PEDRAZA-DIAS et al, 2000), colocando em evidência que

outras espécies também podem ter impacto em Saúde Pública, especialmente para as pessoas portadoras de alterações do sistema imunológico como os pacientes infectados pelo VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana) ou SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), os transplantados ou em tratamento quimioterápico, os diabéticos, os idosos e crianças na tenra idade (FAYER et al, 2000).

A ingestão de pequena quantidade de oocistos (de 9 até 1042 oocistos) pode causar infecção (TZIPORI E WARD, 2002). A transmissão da criptosporidiose ocorre por meio dos oocistos eliminados já infectantes nas fezes dos seus hospedeiros e pode se dar pelo contato direto (pessoa-a-pessoa), como observado em ambientes com alta densidade populacional tais como creches e hospitais, ou indiretamente, pela ingestão de alimentos e água contaminados.

Assim, uma das principais vias de transmissão do protozoário ocorre através da água, seja pelo uso de água superficial não tratada, por sistemas de distribuição contaminados ou tratamento inadequado, usualmente empregando somente a cloração (SOLO-GABRIELE E NEUMEISTER, 1996).

Giardia spp. é um protozoário flagelado, causador de gastroenterite no ser humano bem como nos animais domésticos, ocasionando um espectro clínico diverso, desde infecção assintomática até quadros severos de diarreia persistente (PICKERING E ENGELKIRK, 1998). Devido ao seu crescente papel em surtos de diarreia, particularmente freqüentes entre crianças atendidas em creches, é hoje considerado um agente infeccioso re-emergente (THOMPSON, 2000). Sua transmissão ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados com cistos; além de promover uma variedade de sintomas e sinais clínicos como perda de peso e cólicas abdominais, o parasito pode provocar má-absorção

intestinal e, conseqüentemente, retardo no desenvolvimento infantil (PICKERING E ENGELKIRK, 1998).

Mundialmente, ambos os protozoários estão amplamente dispersos no ambiente, ocorrendo em diversos tipos de água (LECHEVALLIER E NORTON, 1995; ROSE, 1997). Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* são capazes de sobreviver tanto em água superficial como em água tratada, resistindo ao tratamento com desinfetantes químicos tradicionalmente empregados para potabilizar a água, tais como: cloro, cloraminas ou dióxido de cloro (DYKSEN et al, 1998). Assim, a filtração e a remoção física são procedimentos chave para o controle destes protozoários em estações de tratamento de água (SIMMONS et al, 2001). Cabe ressaltar que o amplo espectro de hospedeiros (cerca de 152 espécies de vertebrados), juntamente com o elevado número de oocistos eliminados durante o curso clínico da parasitose (MEDEMA et al, 2001), asseguram o alto nível de contaminação ambiental favorecendo as chances de que a transmissão hídrica ocorra.

Considerando que a água é uma importante via de transmissão, vários surtos de doenças de veiculação hídrica têm sido relatados, associados ao consumo de água de sistemas públicos de abastecimento. Dentre esses episódios, destaca-se o de Milwaukee, nos Estados Unidos (1993). Estimou-se que 403.000 pessoas contraíram criptosporidiose, das quais 4.400 foram hospitalizadas (ROSE, 1997; FAYER et al, 2000). No período de 1.989 a 1.999, 21 surtos de criptosporidiose foram relatados afetando aproximadamente 481.126 pessoas (FAYER et al, 2000). As águas incriminadas atendiam ao padrão de potabilidade exigidos.

No Brasil, a preocupação quanto à qualidade da água, motivou o Ministério da Saúde a emitir a Portaria nº 1469 de 29/12/2000 que estabelece procedimentos e responsabilidades com relação ao controle da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

A qualidade microbiológica da água pode ser monitorada a partir da análise de bioindicadores (bactérias do grupo coliformes). Estas bactérias estão presentes na flora intestinal do ser humano e de outros animais de sangue quente; são encontradas em grande número nos esgotos e, em geral, não são consideradas patogênicas (CRAUN et al, 1997). Apesar de abundantes no meio, são eliminadas pelos desinfetantes usuais empregados nos sistemas de tratamento de água o que não ocorre com os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*, justificando a recomendação da investigação direta destes organismos em águas destinadas ao consumo humano.

O monitoramento da presença de protozoários patogênicos na água foi espontaneamente conduzido em alguns países como EUA e Reino Unido (CLANCY et al, 1999) até que, em 1996, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) iniciou um programa para identificar, padronizar e validar novas tecnologias para a detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente aquático. Os Métodos 1622 e 1623 (USEPA, 1997; 1999) são resultantes desta iniciativa e permanecem como procedimentos de referência (CLANCY et al, 2003), apesar do fato de ainda apresentarem grande variabilidade quanto à eficiência de recuperação de cistos e oocistos, em condições de experimentos-controle (HSU et al, 2001).

No Brasil, há poucos dados publicados sobre a ocorrência destes protozoários na água. No Estado de São Paulo, estes parasitos já foram detectados em água bruta superficial no rio Atibaia (FRANCO et al, 2001a) e em águas subterrâneas (GAMBA et al, 2000). Recentemente, em algumas marcas de água mineral (galões de 20 litros) comercializadas em Campinas, foi detectada a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* (FRANCO E CANTUSIO NETO, 2002). Por outro lado, foram assinaladas taxas de prevalência de giardiose e criptosporidiose ao redor de 10,09% e 5,53%, respectivamente, entre crianças aparentemente saudáveis, na faixa etária de 2-42 meses que freqüentaram creches no distrito de Barão Geraldo, Campinas (SP) (FRANCO, 1996).

A cidade de Campinas é abastecida pelo rio Atibaia o qual pertence à Bacia do Rio Piracicaba (Figura 1 e Figura 2). O mesmo sofre impactação pelo despejo de efluentes sanitários e descargas industriais de outras cidades, além das águas de chuva que arrastam agroquímicos de cultivos próximos ao curso do rio (KRUSHE et al, 2002).

Do volume total de água captada pela Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento de Campinas (SANASA), empresa responsável pelo tratamento e distribuição de água para o município, aproximadamente 72% é tratado nas Estações de Tratamento de Água (ETAs) 3 e 4 (Figura 3a e 3b), sendo captado um volume médio diário de 296.157 m³.

O processo de tratamento utilizado é o convencional (Anexo 1) e compreende as etapas de clarificação (coagulação-floculação, seguida de decantação), filtração, e desinfecção.

Em condições operacionais ótimas, a remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nos filtros é de 99%, sendo que cerca de 1% dos (oo)cistos podem não serem removidos pela filtração convencional. Dados como a turbidez em diversas etapas do tratamento indicam a quantidade de matéria orgânica e inorgânica em suspensão e podem sinalizar a presença de oocistos e cistos na saída dos filtros (FRICKER E CRABB, 1998). Considerando a sua resistência ao tratamento químico (cloração), podem não ser destruídos na desinfecção, mantendo-se viáveis e potencialmente infectantes, com sérias implicações em Saúde Pública, quando presentes na água final. Tais fatos justificam a realização deste estudo, cuja finalidade foi de investigar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* no ponto de captação da água bruta do rio Atibaia, utilizada pela Sanasa-Campinas e nas principais etapas do tratamento. Outro aspecto relevante é a possível variação do número de organismos presentes, pois, esta variação pode ser temporal (sazonal ou diária) e entre diferentes partes do sistema de tratamento de água (YALE E STANFIELD, 2000).

Desta forma, considerando as variações na densidade destes organismos em função do tempo ou clima, este estudo teve o objetivo de investigar a ocorrência de cistos e oocistos no Rio Atibaia. A pesquisa destes protozoários ocorreu no ponto de captação e nas diversas etapas do processo de tratamento de água da ETA 3, em Campinas, SP, em diferentes períodos do ano e diariamente (Experimento I e Experimento II, respectivamente).

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Fatores Ecológicos e Ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* no ambiente aquático.

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* foi documentada em vários tipos de água, tais como superficiais (rios, lagos, represas), águas subterrâneas (poços e nascentes) e águas salinas (mares), comprovando que estes protozoários estão amplamente dispersos no ambiente aquático (WALLIS et al, 1996; STATES et al, 1997; LECHEVALLIER et al, 1997; HO E TAM, 1998).

Smith, 1998, discute a importância da contaminação ambiental na transmissão desses organismos. Fatores que relacionam tanto o parasita como o ambiente desempenhariam um papel potencial para essa contaminação, destacando-se a atividade humana e não humana na transmissão zoonótica, o número de hospedeiros infectados, a capacidade infectante das formas eliminadas pelos indivíduos e fontes de água utilizadas para abastecimento. Ao contrário de outros parasitas, oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* são eliminados já na forma infectante.

Fontes de contaminação tais como a drenagem hídrica das fezes de animais, o uso de fertilizantes orgânicos e o lançamento de esgotos parcialmente tratados ou não tratados favorecem a contaminação dos mananciais (MEINHARDT et al, 1996; FAYER et al, 2000) que muitas vezes são utilizados para a captação nos sistemas públicos de

abastecimento. Vários estudos têm comprovado tal situação (ROSE et al, 1996; STATES et al, 1997).

Em esgoto, o número de oocistos e cistos presentes é bastante variável, em função do tamanho da população ou atividade humana. Por exemplo, Madore et al., 1987 encontraram concentrações de até 13.700 oocistos/L em efluentes de esgoto bruto e 3.960 oocistos /L em efluentes tratados, em área que sofria influência por atividade agropecuária.

Chauret et al, 1995, avaliaram uma estação de tratamento de esgoto, no Canadá, verificando densidades de *Cryptosporidium* e *Giardia* no efluente bruto, com médias de 17,3 oocistos/L e 103 cistos/L. No efluente tratado, as médias encontradas foram de 0,56 oocistos/L e 0,73 cistos/L, respectivamente.

Rose et al, 1996, pesquisaram concentrações de *Cryptosporidium* durante 12 meses, em um efluente bruto que passava por tratamento secundário e filtração em areia. Foram detectadas concentrações médias de 15, 1,4 e 0,04 oocistos/L, respectivamente, nas amostras analisadas.

Bukhari et al, 1997, pesquisaram estes protozoários em 7 estações de tratamento de esgoto na Inglaterra. Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em 0%-63,6% do esgoto bruto analisado, com densidades de 10-170 oocistos/L e em 15,4% a 46,6% dos efluentes, sendo assinaladas densidades de 10-60 oocistos/L. Para *Giardia*, em 70,0%-90,9% dos esgotos brutos analisados foram encontradas densidades de 10-13.600 cistos/L e em 15,4%-91,7% dos efluentes, densidades de 10-720/L.

States et al, 1997, realizaram um monitoramento durante 2 anos no efluente de uma estação de tratamento de esgoto, na Pensilvânia, Estados Unidos, com a finalidade de

verificar a eficiência da remoção dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*. A presença de cistos e oocistos ocorreu em 83,0% e 33,0 % das amostras dos efluentes da ETE.

Payment et al, 2001 avaliaram uma ETE na região de Montreal, Canadá, estudando não somente a ocorrência destes protozoários, como também a presença de vários microrganismos. Concentrações médias de *Giardia* foram de 1.165 cistos/L no esgoto público e 285 cistos/L no efluente tratado, apresentando uma variação muito pequena das concentrações no período estudado. Os valores das médias de *Cryptosporidium* foram de 6 oocistos/L no esgoto bruto e 4 oocistos/L no efluente tratado e várias amostras apresentaram resultados negativos.

No Brasil, as pesquisas sobre a presença destes protozoários são relativamente recentes. Dias Júnior, 1999, analisou a presença dos protozoários em amostras de esgoto na cidade de Araras - São Paulo, tendo observado densidades de cistos de *Giardia* (2.227/L) e oocistos de *Cryptosporidium* (472/L).

Farias, 2000 investigou a ocorrência de *Cryptosporidium* em amostras de esgoto na cidade de São Paulo, sendo encontrada uma positividade de 100,0% nas 24 analisadas. As amostras de esgoto apresentaram concentrações de até 1.200 oocistos/L e 1.400 oocistos/L no córrego receptor.

2.2 - Ocorrência de Protozoários Patogênicos em águas superficiais.

Em águas superficiais brutas, pesquisas tem sido realizadas em vários países, em diferentes ambientes límnicos, investigando a interação dos parasitas com o meio, correlacionando a sazonalidade, temperatura, hidrologia, parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água (CROCKETT E HAAS, 1997; LECHEVALLIER et al, 1997; STATES et al, 1997;), tendo como objetivo o conhecimento das densidades destes

organismos, pois estas águas normalmente são utilizadas por sistemas de abastecimento público para consumo humano.

Wallis et al, 1996, estudaram no Canadá, 1.173 amostras de água bruta durante um ano, observando níveis mais frequentes dos protozoários no final do inverno e começo da primavera.

Ong et al, 1996, avaliaram as origens da contaminação por *Giardia* e *Cryptosporidium*, no Canadá, em diferentes pontos de duas bacias adjacentes, abrangendo alguns locais onde se desenvolviam atividades de criação de gado. Cerca de 100,0% das amostras coletadas foram positivas, variando da não detecção de cistos e oocistos onde não havia tal atividade até níveis significativos, de acordo com o acesso destes animais.

A relação entre as densidades de *Giardia* e *Cryptosporidium* com parâmetros de qualidade da água, bem como condições meteorológicas, foi avaliada no ano de 1996, nos Estados Unidos, no rio Delaware. Concentrações médias de 2,5 cistos/5L de *Giardia* e 0,5 oocistos/5L de *Cryptosporidium* foram detectadas e foi verificado o aumento do número de formas de resistência de ambos os protozoários em épocas de chuvas. Houve correlação positiva com os parâmetros analisados (ATHERHOLT et al, 1998).

Solo-Gabriele et al, 1998, estudaram a ocorrência dos protozoários em suprimentos de água da cidade de São Pedro, Honduras, onde foram analisadas amostras de águas superficiais e subterrâneas. As densidades de organismos foram variáveis de acordo com o tipo de água analisada: para águas superficiais, foram detectadas concentrações de *Cryptosporidium* entre 58 e 260 oocistos/100L e para *Giardia*, entre 380 a 2.100 cistos/100L. Para águas subterrâneas, as concentrações foram de 26 oocistos/100L e 6 cistos/100L. De acordo com os autores, esses números observados de *Cryptosporidium*

são similares aos da América do Norte. Os valores da densidade de cistos de *Giardia* foram considerados elevados. Os autores concluíram que esforços são necessários para a proteção das águas brutas das fontes de contaminação.

Hsu et al, 1999, estudaram a ocorrência dos protozoários no rio Kau-Ping, fonte de captação de água em Taiwan. Das 13 amostras colhidas em diferentes pontos do rio, 92,0% (1.956 cistos/L) foram positivas para *Giardia* e 61,0% (4.776 oocistos/L) para *Cryptosporidium*.

A ocorrência destes protozoários foi estudada nas bacias dos rios Sena e Marne, na região de Paris, França. Concentrações médias de *Giardia* foram altas (928 cistos/100L) em comparação às médias de *Cryptosporidium* (218 oocistos/100L) (ROUQUET et al, 2001).

Alguns estudos têm sido realizados no Brasil. Dias Júnior, 1999, analisou a ocorrência de *Giardia* e *Cryptosporidium* em 12 amostras colhidas no manancial que abastece a cidade de Araras, São Paulo, incluindo o ponto de captação de água para tratamento. Ambos os protozoários foram detectados: 66,7% das amostras positivas para *Giardia* e 64,4% positivas para *Cryptosporidium*. Este manancial possui pontos impactados pela ação de efluentes domésticos.

Franco et al, 2001, investigaram a ocorrência desses protozoários no ponto de captação do rio Atibaia, na cidade de Campinas, São Paulo. Todas as amostras colhidas foram positivas para a presença de ambos os protozoários, em concentrações máximas de 95,0 cistos/0,5L e 60,8 oocistos/0,5L e mínimas de 33,0 cistos/0,5L e 44,5 oocistos/0,5L, respectivamente.

2.3 - Ocorrência nas Estações de Tratamento de Água.

Considerando a importância dos protozoários em relação às doenças de veiculação hídrica, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de verificar a possível presença de cistos e oocistos nas principais etapas de tratamento dos sistemas produtores de água (sistema convencional) para consumo humano e também em estações piloto. A otimização do funcionamento das principais etapas no tratamento convencional é fundamental para se obter uma eficiência da remoção destes protozoários (DUGAN et al, 2001).

Al-Ani et al, 1986, demonstraram a importância da coagulação e dosagem ótima do coagulante químico no tratamento convencional. A efetiva coagulação reduziu a turbidez de 0,5 para 0,1 NTU o que implicou em uma capacidade de remoção de 95,0% para 99,9%, em relação aos cistos de *Giardia*. Quando não foi usado o coagulante químico ideal ou foram empregadas dosagens inadequadas, a remoção foi muito baixa, de 0% a 50,0%.

Nas 72 plantas de tratamento de água estudadas na América do Norte, *Cryptosporidium* estava presente em 51,0% das amostras de água bruta e em 13,4% da água final. Têm sido constatadas diferenças entre os níveis de oocistos encontrados, tanto na água bruta como na água final. Tal fato tem sido atribuído às variações na qualidade da água bruta e à performance do tratamento (LECHEVALLIER et al, 1991).

Bellamy et al, 1993, avaliaram a performance da filtração e os fatores que afetaram a remoção de cistos. Destacaram-se: adequação da velocidade da mistura do coagulante no processo de coagulação; tempo de floculação e sedimentação suficientes; adequação da profundidade dos filtros e uso de areia e antracito. Os autores sugerem que a manutenção e lavagens periódicas dos filtros permitem alcançar uma boa remoção do protozoário.

Nieminski e Ongerth, 1995, avaliaram a remoção de cistos de *Giardia* em plantas de tratamento em escala piloto. A turbidez da água empregada durante os experimentos era de aproximadamente 4 NTU e os autores obtiveram uma boa média de remoção de 3,3 log₁₀ quando os níveis de turbidez estavam entre 0,1-0,2 NTU.

Patania et al, 1995, conduziram estudos em escala piloto de filtração convencional com águas de turbidez entre 0,2 e 13 NTU e concentrações de cistos de *Giardia* de 10 a 200 cistos/L. Com o tratamento otimizado para remoção de turbidez, houve variação na remoção média de cistos de 3,4 a 5,1 log₁₀. No efluente do filtro ocorreu a mais efetiva remoção da turbidez (0,1 NTU ou menor) e de cistos de *Giardia*.

Wallis et al, 1996, no Canadá, analisaram 423 amostras de água tratada. A maioria delas era tratada apenas por cloração. *Giardia* e *Cryptosporidium* foram detectados em 18,2% e 3,5% das amostras, respectivamente.

LeChevallier et al, 1997, avaliaram a presença dos protozoários em questão em amostras de 6 reservatórios de água tratada na cidade de New Jersey, Estados Unidos, pelo período de 12 meses. Foram colhidas 10 amostras na entrada de cada reservatório e 10 amostras na saída, respectivamente. Densidades mais elevadas dos protozoários foram observadas nas amostras das saídas (9 amostras positivas e média de 6,1 cistos/100L e 7 amostras positivas e média de 8,1 oocistos/100L) que nas entradas (8 amostras positivas e média de 1,9 cistos/L e 3 amostras positivas e média de 1,2 oocistos/L). Outros parâmetros de qualidade da água também foram analisados e de acordo com os testes estatísticos não-paramétricos, essas diferenças foram significativas para as concentrações de *Cryptosporidium* e não para as de *Giardia*.

Karanis et al, 1998, detectaram *Giardia* em 14,9% das amostras de água de consumo humano, na Alemanha, com densidades máximas de 16,8 cistos/L e *Cryptosporidium* em 29,8% , com densidades máximas de 20,8 oocistos/100L. Os autores concluíram que a otimização dos processos de tratamento são necessários para a eliminação de protozoários.

Dugan et al, 2001, elaboraram um estudo em sistemas pilotos, com adição de oocistos aos afluentes, em concentrações altas (10^6 oocistos/L). A remoção de *Cryptosporidium* foi positivamente correlacionada à redução de turbidez, com resultados de remoção total entre 1,4 a 2,5 \log_{10} . Os autores sugerem que o pré-tratamento por coagulação aumenta a remoção, no sistema de tratamento convencional.

States et al, 2002, avaliaram plantas piloto de tratamento usando diversos coagulantes (cloreto férrico, cloreto de polialumínio, e alúme) com variações de pH. Foi observada a efetiva remoção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de água bruta, pela eficiência da coagulação na faixa de pH entre 7,2 e 9,2 e a otimização do processo de tratamento convencional da água.

No Brasil, Muller, 1999, estudou a ocorrência de *Cryptosporidium* em 48 amostras de água tratada e colhidas em duas estações de tratamento na cidade de São Paulo, mensalmente, por um ano. Foram utilizadas duas técnicas de concentração (floculação e membrana filtrante), ocorrendo variação no número de oocistos encontrados (de 0 a 1,2/L), dependendo da técnica utilizada.

Ré, 1999, avaliou a ocorrência dos protozoários *Cryptosporidium* sp. e *Giardia lamblia* , na cidade de Araras, São Paulo. Foram analisadas 5 amostras de águas tratadas da

rede pública de abastecimento, tendo sido detectada a presença de cistos de *Giardia lamblia* em 2 amostras (16,6%). Não foi observada a ocorrência de *Cryptosporidium* sp. nas amostras analisadas. É importante salientar que as águas examinadas obedeciam aos padrões de potabilidade vigentes pela legislação específica brasileira.

2.4 - Surtos de criptosporidiose e giardiose relacionados ao consumo de água de sistemas públicos de tratamento.

Vários microrganismos de origem fecal são considerados agentes causadores de gastroenterites de veiculação hídrica (CRAUN et al, 1997). Apesar da diminuição da ocorrência de surtos de transmissão hídrica como os de cólera ou febre tifóide, no período de 1984 a 1996, permaneceram os relatos de surtos causados por organismos resistentes à desinfecção, entre eles os protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* (ROSE et al, 2002).

O grande número de surtos de criptosporidiose e de giardiose ocorridos em diversos países como EUA, Canadá, Reino Unido, entre outros, foi devido ao consumo de águas tratadas inadequadamente e comprovam a ineficiência dos processos de tratamento de água, principalmente quando utilizada somente a cloração. Por se tratar de doenças autóctones, com baixas doses infectantes, a magnitude da contaminação ambiental com oocistos e cistos é significativa no meio aquático. As reduzidas dimensões dos oocistos e cistos bem como a resistência destes aos desinfetantes, dificultam sua remoção pelos processos de tratamento da água (SMITH, 1998).

Nos Estados Unidos, nos últimos 25 anos, 95 surtos de giardiose foram relatados e associados ao consumo de águas produzidas por sistemas públicos de tratamento (uso de

águas superficiais brutas), nos quais a filtração ou cloração foram inadequadas (KENT et al, 1988; Rose et al, 1991).

Relatos do CDC (*Center for Disease Control and Prevention*), entre 1986 e 1988, destacam *Giardia* como responsável por 9 (18,0%) dos 50 surtos de gastroenterite ocorridos neste período. Estes foram veiculados por água tratada somente por cloração e mal funcionamento do equipamento utilizado para essa finalidade. Em um surto ocorrido na Geórgia em 1987, 13.000 pessoas contraíram criptosporidiose após o consumo de água filtrada e clorada de sistema público de abastecimento. Observe-se que a água atendia aos padrões de potabilidade estabelecidos pelas leis do governo Norte Americano (LEVINE et al, 1990).

Herwaldt et al, 1992, relataram que no período compreendido entre 1989 e 1990, dos 26 surtos de gastroenterite ocorridos, *Giardia lamblia* causou 7 deles afetando cerca de 697 pessoas, ocorridos em Nova Iorque, Colorado, Vermont e Alaska, veiculados por água tratada distribuída.

Moore et al, 1994 relataram a ocorrência de 34 surtos de veiculação hídrica nos Estados Unidos, entre 1991 e 1992; 7 deles foram causados por *Giardia* ou *Cryptosporidium*. Ressalte-se que em alguns locais, a água não era submetida à etapa de filtração; entretanto, coliformes não foram encontrados nas amostras analisadas. Em um dos surtos, a baixa vazão provocada pela seca e descargas de efluentes sanitários eutrofizaram mais ainda o manancial. Desta forma, a investigação da água filtrada foi prejudicada, pois continha “... grande quantidade de partículas semelhantes a oocistos (algas)”.

Kramer et al, 1996, relataram a ocorrência de 30 surtos de veiculação hídrica, entre 1993 e 1994, sendo 10 (33,3%) causados pelos protozoários *Giardia lamblia* ou *Cryptosporidium*. Destes, cinco surtos atingiram 403.271 pessoas.

O maior surto que se tem documentado até os dias de hoje ocorreu neste período e foi o de Milwaukee, onde se estima que 403.000 pessoas contraíram criptosporidiose das quais 4.400 foram hospitalizadas, sendo a parasitose confirmada por meio de análises laboratoriais em mais de 600 pessoas e não tendo sido encontrado nenhum outro organismo patogênico ao qual pudesse ser atribuído o surto. A água, proveniente do lago Michigan que abastecia a cidade, era filtrada e clorada. Fatos como o degelo, chuvas (contaminação de origem agropastoril/pecuária) e problemas no processo de tratamento (coagulação e filtração) podem ter permitido a permanência e passagem de oocistos na água final. O aumento da turbidez (parâmetro utilizado para avaliação da eficiência do processo de filtração) foi registrado, porém dentro dos limites permitidos por lei e coliformes não foram encontrados. Somente 2 semanas depois foi associado o agente com a água de consumo, sendo emitida a recomendação pelo governo, de ferver a mesma (SOLO-GABRIELE E NEUMEISTER, 1996).

No de Clark County, Nevada, a duração do surto foi de cerca de 7 semanas e acredita-se que este episódio tenha se iniciado entre os portadores de VIH (ressalte-se que a criptosporidiose é uma doença de notificação obrigatória neste estado). A água, proveniente do lago Mead obedecia aos padrões de potabilidade e oocistos não foram detectados nas amostras de água durante o surto. Posteriormente, oocistos foram encontrados nessas amostras de água tratada e também na água de lavagem dos filtros (KRAMER et al, 1996).

Entre 1995 e 1996, dos 22 surtos de gastroenterite relatados, dois foram causados por *Giardia*, no Alaska e Nova Iorque, cidades abastecidas por água tratada. Foi observada a elevação da turbidez nas amostras de água analisadas (LEVY et al, 1998).

Barwick et al, 2000, entre 1997 e 1998, relataram a ocorrência de 17 surtos de gastroenterite, sendo 4 deles causados por *Giardia* e 2 por *Cryptosporidium*, com cistos e oocistos provenientes de águas tratadas mas não filtradas.

Entre 1998 e 2000, relatos do CDC destacam a ocorrência de 1 surto de criptosporidiose, afetando 5 pessoas, pela presença de oocistos de *Cryptosporidium* provenientes de água de poço comunitário (CDC, 2002).

2.5 - Métodos para detecção dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* em água.

O primeiro surto de transmissão hídrica de giardiose ocorreu em Aspen (Co) em 1964 e incentivou o desenvolvimento de métodos de detecção dos protozoários em água. Os métodos mais comuns para detectar e quantificar *Cryptosporidium* no ambiente foram adaptados daqueles originalmente delineados para *Giardia* (ONGERTH E STIBBS, 1987; MUSIAL et al, 1987; ROSE et al, 1988). Hoje, os dois protozoários podem ser analisados nas mesmas amostras simultaneamente.

O ensaio de imunofluorescência (IFA) para detecção de *Giardia* foi desenvolvido em 1985, apresentando inúmeras vantagens com relação ao método anteriormente utilizado, o qual empregava a flutuação com solução sulfato de zinco e coloração com lugol. Estas duas técnicas foram comparadas para detecção de ambos os protozoários em amostras ambientais artificialmente contaminadas com esses organismos; conclui-se que o ensaio de imunofluorescência foi 12 vezes mais sensível para a detecção de *Giardia* em relação a

flutuação em sulfato de zinco e *Cryptosporidium* foi detectado em várias amostras. IFA foi definitivamente incorporada ao método (LECHEVALLIER et al, 1990). O método completo para detecção dos cistos de *Giardia* com sulfato de zinco e lugol foi publicado na 16^a edição do “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” e o método com o ensaio de imunofluorescência para determinação de ambos os protozoários consta na 19^a edição desse manual (*American Public Health Association*, 1986 e 1995). Atualmente, a 20^a Edição (1998) não inclui nenhum método para detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium*, devido à rápida evolução analítica que envolve essas metodologias.

Na última década, o monitoramento da presença de protozoários na água foi espontaneamente introduzido em países como USA, Inglaterra e Austrália e foram utilizados dados gerados pelo ICR (*Information Collection Rule*). Esse método, denominado “*ICR Protozoan Method for detecting Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in water by fluorescent antibody procedure*”(USEPA 1995) apresentava muitas desvantagens, tais como: complexidade técnica, baixas taxas de recuperação, resultados falso-negativos e falso-positivos (CLANCY et al, 1999; ALLEN et al, 2000).

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 1997; 1999) foram desenvolvidos em resposta a essa iniciativa. 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 3 passos muito importantes: filtração da amostra de água com a finalidade de recuperar ou capturar os parasitas (cistos e oocistos); eluição e concentração; e visualização por microscopia de imunofluorescência (JAKUBOWSKI et al, 1996).

Inicialmente, para filtração, foram usados filtros de cartucho de polipropileno de porosidade de 1µm. Eram utilizados grandes volumes de água (1000 L para água da saída dos filtros e 100 L para água bruta). 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 uso de sacarose ou Percol ou solução de cloreto de sódio e visualização mediante a IFA. Tal metodologia apresentava limitações, como: 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).

A técnica de filtração em membranas (MF), proposta por Aldom e Chagla, 1995, foi desenvolvida para detecção de oocistos e cistos em água tratada e, atualmente, este método também é considerado para determinação destas formas em água bruta (ONGERTH e STIBBS, 1987). Consiste na captura dos oocistos em membranas de acetato de celulose, seguida de eluição por dissolução da mesma em acetona e etanol ou raspagem e lavagem da superfície da membrana filtrante alternadamente, considerando os diferentes protocolos. A turbidez da água é o maior fator limitante, pois pode ocorrer rápida obstrução da malha

filtrante, com conseqüente redução do volume efetivamente filtrado. A influência do método de eluição diminui a infectividade a cada etapa na dissolução em acetona (CARRENO et al, 2001); e, dependendo do método empregado para eluição, perdas são consideradas. A média de recuperação é de cerca de 70,5% (ALDOM e CHAGLA, 1995).

A técnica de floculação foi proposta como método de concentração de volumes de 10L 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 4 horas em temperatura ambiente. O precipitado é dissolvido com ácido sulfâmico; a suspensão obtida é centrifugada e analisada por IFA. O sedimento resultante é extremamente rico em material particulado, interferindo na IFA, acarretando dessa forma resultados falso-positivos. A variação nas concentrações dos reagentes e do pH causam uma diminuição do número de organismos floculados. Também não fornece informações sobre a espécie ou viabilidade. A eficiência de recuperação está entre 30,0% a 40,0% (FRICKER e CRABB, 1998).

Cabe ressaltar que apesar das técnicas de biologia molecular, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) (STINEAR et al, 1996) e a detecção através de cultivo de *Cryptosporidium* em monocamadas celulares (SLIFKO et al., 1997) terem sido propostas, o ensaio de microscopia de imunofluorescência continua sendo o mais utilizado. Quanto à Biologia Molecular, ela apresenta a vantagem da determinação da espécie do protozoário e a infectividade pode ser avaliada por meio do cultivo do protozoário em células.

Medema et al, 1998, avaliaram a citometria de fluxo como método alternativo para detecção destes protozoários em grandes volumes de água e análise de imunofluorescência em até 2 horas. Porém, o seu uso é limitado pela necessidade de equipamentos caros.

Devido à complexidade dos métodos de análises para esses protozoários, considerando o grande número de etapas necessárias para sua realização, as dificuldades e a subjetividade na identificação microscópica, um programa de qualidade analítica torna-se fundamental para os laboratórios. Quanto às porcentagens de recuperação obtidas, a maioria das pesquisas praticamente não fornece dados sobre a qualidade da água utilizada, tempo de armazenamento, qualidade dos oocistos e o período de tempo no qual os mesmos mantiveram contato com a água. Desta forma, uma avaliação baseada em critérios técnicos bem definidos, permite alcançar o objetivo de se aperfeiçoar a análise quando comparados estes resultados (FRICKER E CRABB, 1998; LINDQUIST, 1999).

Para os métodos de análise de *Giardia* e *Cryptosporidium*, torna-se fundamental uma avaliação do desempenho do laboratório na execução do ensaio que é realizado através da determinação das porcentagens de recuperação de cistos e oocistos dos parasitas a partir de amostras artificialmente contaminadas e submetidas aos mesmos procedimentos.

Instruções detalhadas para determinação destas análises estão contempladas nos métodos 1622 e 1623 (USEPA 1998b, 1999), incluindo controles positivos e negativos. Quando possível, a realização de amostras interlaboratoriais também são recomendadas.

3 – OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Verificar a ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em volumes variáveis de água, compreendendo diferentes etapas do sistema de tratamento de água da estação de tratamento - ETA 3, SANASA – Campinas – SP, a saber: 1) tomada da água bruta na captação do rio; 2) na saída do decantador 2 e 3) na saída do filtro 5.
- Avaliar a qualidade das amostras de água, mediante a análise dos dados físico-químicos (cor, pH e turbidez) e microbiológicos (coliformes totais e termotolerantes), correlacionando-os com a eventual presença destes protozoários.
- Verificar a possível influência das variações climáticas sobre a ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. mediante a comparação do número de cistos e oocistos nas estações: seca e chuvosa, durante o período de seis meses.
- Verificar a possível variação temporal diária da densidade de cistos/ooocistos, nestes pontos, por três dias consecutivos, com duas colheitas diárias, após o término do período da seca.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Locais das Colheitas

A colheita de amostras de água bruta foi realizada na captação do rio Atibaia localizada na rodovia Dom Pedro I, km 124,5, Campinas, São Paulo (Bacia Hidrográfica dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí) (Figuras 2a e 2b). As demais amostras, foram colhidas na Estação de Tratamento 3 e 4, localizada na Rodovia Heitor Penteado, km 6,5 – estrada para Souzas, no sistema da ETA 3 (decantador e filtro - escolhidos aleatoriamente) (Figura 3b). As ETAs 3 e 4 da SANASA – Campinas produzem a vazão aproximada de 3.000 L/s de água tratada, sendo utilizado o tratamento convencional, incluindo as etapas de coagulação-floculação, seguida de decantação, filtração e desinfecção. É responsável por 72% do abastecimento da cidade sendo captado um volume médio diário de 296.157m³ do rio Atibaia, para atendimento de uma população aproximada de 1 milhão de habitantes.

Foram conduzidos dois experimentos: - *experimento I*, durante seis meses com a finalidade de abranger os períodos de estiagem e chuvas; foram realizadas 10 colheitas, com periodicidade de 20 dias, nos três pontos citados acima, totalizando 30 amostras; - *Experimento II*, considerada a possibilidade de intermitência diária da contaminação, foram colhidas duas amostras diariamente, de cada ponto, durante três dias consecutivos, com um total de 18 amostras.



Figura 1: Mapa de localização do rio Atibaia



Figura 2a: Captação do Rio Atibaia - Campinas (vista aérea).



Figura 2b: Captação do Rio Atibaia – Campinas (vista aérea).



Figura 3a: Decantadores e filtros da ETA 4.



Figura 3b: Decantadores e Filtros da ETA 3.

4.2 – Colheitas e Filtração das Amostras

Foram colhidas amostras com volumes de 2 L para águas brutas do rio e de 10 L nas saídas do decantador e filtro. Para a análise de *Cryptosporidium* e *Giardia* foram utilizados frascos previamente limpos e descontaminados e lavados com solução de eluição contendo Tween 80, a 1%.

No experimento I, as amostras foram colhidas no período compreendido entre março a setembro de 2002, correspondente às estações chuvosas (março, abril e maio) e estiagem (junho, julho, agosto e setembro) considerando o seguinte número de amostras: n=10 para águas brutas, n=10 para a saída do decantador, e n=10 para saída do filtro. As amostras de água bruta foram colhidas sempre às 7 horas da manhã, no ponto onde a água do manancial é captada. As amostras do decantador foram colhidas às 11:30 horas e as dos filtros, às 12 horas. Esse intervalo entre as amostras teve como objetivo permitir o espaço de tempo entre a tomada da água bruta e a chegada dessa mesma água nas etapas seguintes: floculação, decantação e filtração.

O experimento II, foi realizado no início da estação chuvosa (após o inverno). Foram colhidas 2 amostras diárias (para cada ponto amostral) durante três dias consecutivos, portanto: n=6 para águas brutas; n=6 para a saída do decantador; e n=6 para saída do filtro, obedecendo ao mesmo horário citado anteriormente.

Concomitantemente, foram colhidas amostras para as análises físico-químicas (1 litro) e bacteriológicas (250 mL), de acordo com os procedimentos descritos no “Standard Methods, 1998”.

Imediatamente após a colheita, as diversas amostras de água foram transportadas para o laboratório, em condições adequadas de refrigeração e, a seguir, filtradas em membranas de ésteres mistos de celulose (3,0 µm de porosidade nominal, Millipore®; 47 mm de diâmetro, utilizando-se bomba de vácuo com fluxo de 4 L/minuto (FANEM®) para a análise parasitológica.

4.3 – Recuperação de Oocistos e Cistos a Partir do Material Filtrado

Após filtração, os oocistos e cistos eventualmente presentes nas diversas amostras foram eluídos da membrana filtrante por meio de extração mecânica e alternadamente, por lavagem da superfície da mesma com solução de eluição contendo Tween 80, 1%. A seguir, o líquido resultante foi transferido para tubos de centrífuga. Após três centrifugações sucessivas a 600 x g, por 15 minutos, o sobrenadante final foi descartado e o sedimento ressuspenso para um volume de 1 mL; alíquotas deste foram examinadas mediante o emprego da reação de imunofluorescência direta (IFA), num prazo máximo de 24 horas.

4.4 – Visualização e Quantificação de Oocistos e Cistos por Imunofluorescência Direta e Teste Confirmatório da Morfologia

Os sedimentos obtidos após centrifugação foram submetidos à reação de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais específicos, utilizando-se o *Kit*

Merifluor® (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio). Simultaneamente, foram realizadas observações com o propósito de visualização e quantificação do número de oocistos/cistos presentes nas amostras analisadas. Para tanto, uma ou mais alíquotas de 5 µl das diversas amostras foram transferidas e aplicadas de maneira uniforme nos poços da lâmina de imunofluorescência e processadas da seguinte forma: após secagem à temperatura ambiente, foram fixadas com 10 µL de metanol absoluto em cada poço da lâmina por 3 – 5 minutos. Adicionou-se à cada alíquota, 1 gota do reagente de detecção contendo anticorpo monoclonal anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*, marcado com fluoresceína e 1 gota do contra-reagente. As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente em câmara úmida, protegidas da luz.

Posteriormente, o excesso de reagentes foi retirado mediante a lavagem de cada poço da lâmina com solução tampão diluída (2,5 mL do tampão do Kit em 47,5 mL de água destilada).

Em seguida, foram aplicados 25 µL da solução de DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole) diluído na proporção de 1/5000 em PBS em cada poço da lâmina, para a realização dos teste confirmatório da morfologia, simultaneamente a IFA. Passados 10 minutos e aspirado o excesso de corante, procedeu-se às lavagens com PBS e água Milli-Q.

Em seguida, foram aplicados 10 µL do meio de montagem contendo glicerina, em cada poço e a seguir, uma lamínula. As preparações foram examinadas no microscópio Zeiss Axiolab, com filtros apropriados epifluorescência (filtro de excitação: 450-490 nm; filtro de barreira: 520 nm), e DAPI (filtro de excitação: 365-400 nm; filtro de barreira: 395 nm).

As observações foram realizadas empregando-se os aumentos de 250x, 400x e 1000x, tendo-se efetuado a contagem do número de cistos e oocistos presentes nas diversas preparações. Também foram realizadas observações com microscopia de contraste de fase para confirmação de detalhes morfológicos (SMITH et al, 2002).

4.5 – Critérios de Positividade para Identificação de Oocistos e Cistos

Para a identificação de oocistos/cistos foram considerados os seguintes indicadores durante a leitura microscópica das preparações:

a) Imunofluorescência

- Grau de fluorescência definida pela intensidade verde-maçã brilhante (comparável àquela exibida por mais de 50% dos oocistos e cistos presentes nas suspensões controles positivos).
- tamanho e formato compatíveis: 4–6 μm de diâmetro para oocistos e forma esférica; para cistos, 8–12 μm e forma ovalada.

b) Contraste de fase

- estruturas internas analisadas em microscopia de contraste de fase: presença de sutura para oocistos; para cistos, a presença de axonema e visualização dos núcleos (1 a 4).

c) Teste confirmatório utilizando DAPI

- observação dos núcleos (1 a 4) corados em azul-céu bem distintos, visualizados dentro de um único oocisto/cisto, em geral, apresentando coloração azul intensa.

4.6 – Quantificação dos oocistos e cistos

A estimativa do número de oocistos e cistos por litro (X) foi feita com base na seguinte fórmula, onde: n° cistos (cistos visualizados IFA); volume de sedimento (em μL); volume de sedimento total (mL); volume da amostra (mL); Fator de correção(10^6).

$$X = \frac{\text{n}^\circ \text{ cistos} \times 10^6}{\text{vol. sedimento no poço}} \times \frac{\text{vol. sedimento total obtido}}{\text{vol. amostra}}$$

4.7 – Experimentos-controles

Foram realizados experimentos-controle positivos e negativos com a finalidade de avaliar a sensibilidade da metodologia empregada neste estudo. Para o cálculo da dose a ser inoculada nas amostras-controle, três alíquotas de 5 μL da suspensão de oocistos e cistos presentes no *Kit Merifluor* (controle positivo) foram enumeradas diretamente nos poços das lâminas de imunofluorescência, sendo calculada a média do número de oo/cistos encontrados em 5 μL . A partir desta média, efetuou-se diluição em água destilada com a finalidade de se obter uma concentração estimada de 10^2 oo/cistos/L. Esta suspensão foi finalmente inoculada em volumes similares de água Milli-Q (controle positivo) e água bruta artificial gerada pela adição de ácido húmico e celite com a finalidade de se obter condições semelhantes às amostras colhidas durante o estudo. Para os controles negativos, processou-se água Milli-Q.

4.8 – Cálculo da Eficiência de Recuperação (%)

A eficiência de recuperação da metodologia empregada foi estimada com base no número de oocistos e cistos visualizados e enumerados mediante a IFA durante o processamento das diversas amostras contendo água artificialmente contaminada, onde $ER = Y(\%)$, de acordo com a seguinte fórmula:

$$Y = \frac{\text{n}^\circ \text{ (oo)cistos recuperados} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ (oo)cistos semeados}}$$

4.9 – Análises Físico-químicas e Microbiológicas das Amostras de Água

Para as análises microbiológicas, as colheitas foram feitas em frascos de polipropileno de 250 mL, previamente lavados com detergente não tóxico, enxaguados com água comum e água destilada (último enxágüe), esterilizados em autoclave durante 15 minutos, à 121 °C. Para neutralização de eventuais resíduos de cloro e metais pesados foram adicionados, antes da esterilização, 0,1 mL de solução de tiosulfato de sódio a 1,8% e 0,3 mL de EDTA (etileno-diamino-tetra acetato de sódio) a 5%, para cada 100 mL de amostra colhida, tendo sido empregadas as técnicas de tubos múltiplos e de substrato cromogênico (American Public Health Association, 1998; Cetesb, 1992) .

Para as análises físico-químicas, as colheitas foram feitas em frascos de polipropileno de 1 L, previamente lavados, sem preservantes; as amostras foram analisadas com os seguintes aparelhos: Turbidímetro (HACH) para turbidez, DR 2500 (HACH) para cor e pHmetro (DIGIMED) para pH.

4.10. – Análise Estatística

Os dados foram, inicialmente, analisados por meio de estatística descritiva; a seguir, foram empregados: - o teste de correlação Produto-Momento de Pearson para avaliar a possível correlação entre a densidade de organismos (número de cistos/oocistos presentes em 1L), parâmetros físico-químicos e bacteriológicos e, - análise de variância de uma via, para o estudo da relação entre a concentração de organismos detectados na água bruta e a época do ano (período de estiagem e de chuvas). Em ambas as análises, utilizou-se o programa “Statística” versão 5.5/2000 – Statsoft Inc. Copyright 84/2000 – Kernel release 5.5 A.

5- Resultados

Os resultados são apresentados na forma de trabalho científico (Capítulo 1), enviado para publicação na revista Higiene Alimentar – ISSN 0101-9171, indexada nas seguintes bases de dados: CAB ABSTRACTS (Inglaterra); LILACS-BIREME (Brasil); PERI-ESALQ (Brasil).

Capítulo 1

OCORRÊNCIA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. E CISTOS DE *Giardia* spp. EM DIFERENTES PONTOS DO PROCESSO DE TRATAMENTO DE ÁGUA, EM CAMPINAS, SÃO PAULO, BRASIL.

***Romeu Cantusio Neto - SANASA - Campinas (SOCIEDADE DE
ABASTECIMENTO DE ÁGUA E SANEAMENTO S/A) / INSTITUTO DE
BIOLOGIA – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Regina Maura Bueno Franco – Laboratório de Protozoologia, Departamento de
Parasitologia, INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS**

***Mestrado em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de
Campinas – UNICAMP, Campinas, SP.**

***ENDEREÇO:** Laboratório de Microbiologia/SANASA-Campinas

Rua: Abolição, nº2375 – Bairro: Swift – Cep:13045-610 **Campinas – São Paulo – Brasil**

Fone/Fax: 55 0XX19 – 3276-8480 – E-mail: microbiologia@sanasa.com.br

RESUMO

Os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são parasitos intestinais que podem ser transmitidos pela água. São responsáveis pela ocorrência de vários surtos de diarreia, em diversos países, sendo que oocistos e cistos exibem acentuada resistência às condições ambientais e aos processos de tratamento da água, apresentando grande relevância em Saúde Pública. Considerando que estes protozoários já foram detectados em amostras de água bruta do rio Atibaia, o presente estudo investigou a ocorrência de oocistos e cistos, parâmetros físico-químicos e bacteriológicos, nas principais etapas do sistema da estação de tratamento de água 3 e 4 de Campinas. Foram realizados dois experimentos: um no período de seis meses, e outro, em dias consecutivos, respectivamente. No processamento das amostras foi utilizada a técnica de filtração em membrana, seguida por eluição, centrifugo-concentração, imunofluorescência direta e teste confirmatório empregando corante fluorogênico (DAPI). Os demais parâmetros foram determinados de acordo com os procedimentos do “Standard Methods, 1998”. A positividade de *Giardia* na água bruta captada no experimento I e II foi de 90% e 100%, respectivamente; *Cryptosporidium* não foi detectado. Cistos e oocistos não foram detectados em todas as amostras colhidas após as etapas de filtração e decantação. As análises físico-químicas e bacteriológicas atestaram a qualidade da água nas diversas etapas e a degradação da qualidade da água bruta. Os resultados obtidos fornecem uma indicação da eficiência na remoção deste organismo pelo sistema convencional da estação de tratamento de água analisada.

Palavras-chave: *Giardia* - *Cryptosporidium* - Sistema de Tratamento - Campinas - São Paulo -Brasil

SUMMARY

The protozoa *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. are intestinal parasites that may be waterborne. They are responsible for the occurrence of several outbreaks of diarrhea in many countries, mainly due to oocyst and cyst resistance to the water treatment processes and in the environment; the presence of these parasites has great Public Health significance. Considering that these protozoa have already been detected in raw water samples from the Atibaia River, the present study investigated the occurrence of oocysts and cysts, bacteriological, physical and chemical parameters in the main steps of the water treatment system 3 e 4 in the city of Campinas, state of São Paulo, Brazil. Two experiments were carried out: one in a period of six months and another on consecutive days, respectively. The sample processing utilized the membrane filtration technique followed by elution, centrifugation for concentration, direct immunofluorescence and confirmatory test using fluorogenic vital dye (DAPI). The further parameters were determined according to the Standard Methods, 1998 procedure. *Giardia* was present in 90% of the raw water samples in test I and in 100% in test II, while *Cryptosporidium* was not detected. Cysts and oocysts were not detected in any of the samples collected after the filtration and decantation steps. Physical, chemical and bacteriological analysis showed the water quality in all steps and the degradation of the raw water. The results obtained are an indication of efficiency in removal of this organism through the conventional system at the analyzed water treatment plant.

Key words: *Giardia* - *Cryptosporidium* – Water Treatment System - Campinas - São Paulo - Brazil

INTRODUÇÃO

Mais de um bilhão de indivíduos não têm água adequadamente tratada nos países em desenvolvimento (Kraszewski, 2001) o que pode afetar a saúde do homem. As doenças de transmissão hídrica, principalmente as diarréicas, podem ser causadas por vários agentes patogênicos; dentre eles, destacam-se *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (CDC/MMWR, 1996; Fayer et al, 2000). Durante os últimos 25 anos, estes protozoários foram responsáveis por 20% dos surtos epidêmicos de gastroenterite ocorridos nos Estados Unidos devido à ingestão de água contaminada (Craun et al., 1998).

Membros do gênero *Cryptosporidium* provocam infecção no homem e em várias espécies animais, sendo a criptosporidiose principalmente severa em crianças, diabéticos, idosos e em indivíduos imunocomprometidos como os portadores de infecção pelo VIH, os transplantados e os que fazem uso de terapia com corticosteróides (Fayer et al, 2000). A introdução da terapia antiretroviral combinada ocasionou uma diminuição drástica de diarréias causadas pelos parasitos oportunistas, porém, o número de portadores de imunodeficiências por outras razões que não a SIDA continua a crescer (Powderly, 2000).

Giardia é um protozoário flagelado considerado atualmente como um agente infeccioso re-emergente devido à ocorrência aumentada deste parasito entre crianças que freqüentam creches (Thompson, 2000). A giardiose ocasiona espectro clínico variável, desde infecção assintomática até quadros severos de diarréia persistente. Em crianças, a presença do protozoário foi associada às seqüelas como má absorção intestinal e, conseqüentemente, retardo no desenvolvimento infantil (Pickering & Engelkirk, 1998).

Ambos os protozoários são transmitidos por meio de oocistos e cistos eliminados nas fezes dos hospedeiros e a infecção ocorre pelo contato direto interpessoal ou

indiretamente pela ingestão de água e alimentos contaminados (Griffiths, 1998). A dose infectante para ambos os parasitos é baixa, ao redor de 10-130 oo/cistos (Thompson, 2000; Tzipori & Ward, 2002).

Cistos e oocistos podem permanecer por longo tempo no ambiente (LeChevallier et al, 1991), sobrevivendo por semanas em águas superficiais (Rodgers et al, 1995) e também são capazes de resistir ao tratamento com desinfetantes químicos, tradicionalmente empregados para potabilizar a água (Dyksen et al, 1998).

Várias causas foram responsáveis pelos numerosos surtos de criptosporidiose e giardiose, documentados em diferentes países (Howe et al. 2002; Kramer et al., 2001; Rose et al., 2002) como o uso e consumo de água superficial não tratada, a contaminação dos sistemas de distribuição ou tratamento inadequado (Gasser & O'Donoghue, 1999; Fayer et al., 2000) e, na maioria deles, as águas incriminadas atendiam aos padrões de potabilidade exigidos pela legislação específica (Solo-Gabriele & Neumeister, 1996).

O controle da qualidade microbiológica (potabilidade) nos sistemas de tratamento de água é monitorado pela investigação da presença/ausência de bactérias, bioindicadores coliformes totais e termotolerantes na água (Cantusio Neto, 2001; Fiksdal et al., 1997). No Brasil, a investigação destes protozoários foi recomendada pela Portaria nº1469 de 29/12/2000 - Ministério da Saúde, porém a mesma ainda não foi implantada. Apesar de relevantes em Saúde Pública, os sistemas de tratamento de água, no país, ainda não monitoram esses patógenos na água final distribuída e nos pontos das captações (mananciais), devido à complexidade da metodologia e ao alto custo das análises (Chauret et al., 1995).

A ETA (Estação de Tratamento de Água) 3 e 4 da SANASA - Campinas (Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A), é responsável por 72% do abastecimento

da cidade sendo captado um volume médio diário de 296.157 m³ do rio Atibaia.

Cryptosporidium e *Giardia* já foram detectados em amostras pontuais deste manancial (Franco et al, 2001; Relatórios Ambientais/Cetesb, 2000). Considerando-se que possam ocorrer variações na densidade destes organismos em função do tempo ou clima (LeChevallier & Norton, 1995; Craun et al., 1998), este estudo teve o objetivo de investigar a ocorrência de cistos e oocistos no Rio Atibaia, no ponto da captação e possível presença destes nas diversas etapas do processo de tratamento de água da ETA 3, em Campinas, SP, abrangendo diferentes períodos do ano e/ou dia.

MATERIAL E MÉTODOS

O conjunto das ETAs 3 e 4 produz uma vazão aproximada de 3.000L/s, sendo utilizado o tratamento convencional, incluindo as etapas de: coagulação-floculação (cloreto férrico), seguida de decantação, filtração e desinfecção (cloraminas). As diversas amostras de água foram colhidas nos seguintes pontos: 1) captação do rio Atibaia; 2) saída do decantador e 3) saída do filtro, sendo que os volumes colhidos foram de 2 L (água bruta captada) e 10 L (após decantação e filtração, respectivamente). Foram conduzidos dois experimentos, como segue:

Experimento I: durante seis meses e, com a finalidade de abranger os períodos de estiagem e de chuvas, foram realizadas 10 coletas, com periodicidade de 20 dias, nos três pontos citados acima, totalizando 30 amostras.

Experimento II: considerando a possibilidade de intermitência da contaminação, foram colhidas duas amostras diárias, de cada ponto, durante três dias consecutivos, com um total de 18 amostras.

Para todas as amostras colhidas, observou-se o tempo necessário para a chegada da água no decantador e posteriormente no filtro, em ambos experimentos.

Procedimentos laboratoriais: todas as amostras foram colhidas em frascos limpos e descontaminados, previamente enxaguados com solução de eluição contendo Tween 80, 1%. Após o transporte em condições adequadas ao laboratório, foram processadas conforme procedimentos descritos em Franco & Cantusio Neto (2002). Após centrifugo-concentração a 600 x g (15 minutos) das diversas amostras, as alíquotas resultantes foram submetidas à reação de imunofluorescência direta - RID, empregando-se o *Kit Merifluor* (Meridian BioScience, Cincinnati, Ohio) e simultaneamente, foram realizadas observações com microscopia de contraste de fase e teste confirmatório da morfologia com corante fluorogênico DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, Sigma Chemicals). Para a leitura das preparações, foi utilizado o microscópio Zeiss Axiolab, com filtros apropriados para epifluorescência (filtro de excitação: 450-490 nm; filtro de barreira: 520 nm) e DAPI (filtro de excitação: 365-400 nm; filtro de barreira: 395 nm), respectivamente.

Critérios de positividade para a identificação de cistos e oocistos: Para a identificação de cistos/oocistos foram considerados os seguintes quesitos: intensidade da fluorescência verde-maçã brilhante, tamanho e formatos compatíveis. As estruturas internas foram identificáveis à microscopia de contraste de fase, realizada simultaneamente à RID. A confirmação pelo DAPI incluiu a observação dos núcleos, visualizados dentro de um único cisto ou oocisto e apresentando coloração azul-intensa em geral (Smith et al, 2002).

O cálculo do número de oocistos e cistos/L (X) foi feito pela fórmula:

$$X = \frac{\text{n}^\circ \text{ cistos} \times 10^6}{\text{vol. sedimento} (\mu\text{L}) \text{ no poço}} \times \frac{\text{vol. sedimento (mL) obtido}}{\text{vol. amostra (mL)}}$$

Parâmetros bacteriológicos (coliformes totais e termotolerantes), físicos e químicos (cor, pH e turbidez) foram determinados de acordo com os procedimentos descritos no Standard Methods (1998), com a finalidade de atestar a qualidade das amostras de água examinadas.

Experimentos-controle: para o cálculo da dose de cistos e oocistos a ser inoculada em água Milli-Q e em água bruta artificial gerada pela adição de ácido húmico e celite (experimentos-controle positivo), três alíquotas de 5 µL da suspensão de oocistos e cistos presentes no *Kit Merifluor* foram enumeradas diretamente nos poços das lâminas de imunofluorescência, sendo calculada a média do número de (oo)cistos encontrados em cada 5µL analisados. A partir desta, efetuou-se diluição em água destilada com a finalidade de obter uma concentração estimada de 10² (oo)cistos/L. Esta suspensão final foi inoculada em volumes similares aos colhidos durante o estudo. Após terem sido submetidas aos mesmos procedimentos laboratoriais descritos acima, a eficiência de recuperação (*Y*) foi estimada com base no número de oocistos e cistos recuperados nos experimentos-controle, de acordo com a seguinte fórmula:

$$Y = \frac{\text{n}^\circ \text{ (oo)cistos recuperados} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ (oo)cistos semeados}}$$

Para o experimento-controle negativo, utilizou-se como amostra água Milli-Q e aplicaram-se os mesmos procedimentos laboratoriais anteriormente descritos.

Análise Estatística: foram realizados testes de correlação entre a densidade de organismos, parâmetros físico-químicos e bacteriológicos, empregando-se o teste de correlação Produto-Momento de Pearson e, análise de variância de uma via, para estudo da relação entre a concentração de organismos detectados na água bruta e época do ano

(períodos de estiagem e de chuvas). Em ambas as análises, foi utilizado o programa “Statística” versão 5.5/2000 - Statsoft Inc. Copyright 84/2000 - Kernel release 5.5A.

RESULTADOS

Experimento I: No período de março a setembro de 2002, excetuando-se as amostras de água bruta que foram positivas para a presença de cistos de *Giardia* (90% das amostras; concentração média de 32,8 cistos/L e DP = 29,1), ambos os protozoários foram ausentes nas diferentes etapas de tratamento, após decantação e filtração (tabela 1).

Experimento II: As amostras de água bruta apresentaram positividade para cistos de *Giardia* (100% das amostras; concentração média de 35,8 cistos/L e DP = 23,3); cistos e oocistos não foram detectados nos efluentes das etapas de decantação e filtração (tabela 3).

Em ambos os experimentos, os parâmetros físico-químicos e bacteriológicos indicaram variações na qualidade da água bruta captada ao longo dos 6 meses de estudo e ao redor do período de um dia (tabelas 1 e 3), além da ocorrência de remoção da cor, turbidez e coliformes após o tratamento (tabelas 2 e 4).

No experimento-controle para água bruta artificial, os parâmetros físico-químicos obtidos (pH = 6,7; cor = 253 mg Pt-Co/L e turbidez = 43,6 NTU) foram semelhantes aos da água bruta examinada. As taxas de eficiência de recuperação nos experimentos controle foram de 25,3% (água bruta artificial) e 41,6% (água Milli-Q) para *Cryptosporidium* e 46,5% (água bruta artificial) e 65,1% (água Milli-Q) para *Giardia* (tabela 5).

Não foram detectados cistos de *Giardia* ou oocistos de *Cryptosporidium* nos controles negativos.

Análise Estatística: Não houve correlação estatística ($p < 0.05$), entre a concentração de *Giardia* e os parâmetros analisados (Tabela 1): pH ($p = 0,248$ e $r = - 0,403$); cor

($p=0,362$ e $r = 0,323$); turbidez ($p = 0,554$ e $r = 0,213$); coliformes totais ($p = 0,348$ e $r = -0,333$); coliformes termotolerantes ($p = 0,400$ e $r = -0,300$).

Ao analisar as variações climáticas, não houve evidências de diferenças estatisticamente significativas entre as contagens médias de cistos durante os períodos de chuva e seca ($p<0.05$), embora o número de cistos tenha variado durante o período estudado (tabela 1).

Discussão

A pesquisa da presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* em amostras de águas superficiais de rios e na saída dos sistemas de tratamento foi realizado extensivamente nos Estados Unidos, Canadá e Reino Unido. Os dados obtidos comprovam a ubiquidade destes protozoários no ambiente aquático (LeChevallier et al, 1991; LeChevallier & Norton, 1995; Hsu et al, 2001a) e, em menor escala, em águas tratadas.

No Brasil, a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* foi documentada em águas superficiais de 28 mananciais do Estado de São Paulo, em levantamento realizado pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo), com positividade de 5% para oocistos e 31,5% para cistos, sendo a captação do Rio Atibaia considerada um dos pontos críticos no Estado, com densidade de 521 cistos/L (Hachich et al, 1999). No presente estudo, a análise quantitativa revelou uma concentração média de 32 cistos/l na água bruta; diferenças entre estes dados podem ser justificadas pela definição dos critérios de positividade adotada nesta pesquisa, envolvendo observações simultâneas de epifluorescência, contraste de fase e do corante vital DAPI, além do método de concentração e eluição empregados.

O perfil não definido das estações climáticas em Campinas e região no ano de 2002, de acordo com dados fornecidos pelo CEPAGRI (Centro de Pesquisa Agrícola/Unicamp), pode ter contribuído para não ter ocorrido diferença significativa entre a densidade de cistos nos períodos de seca e de chuva.

Considerando-se uma possível intermitência da contaminação no período analisado, as amostras diárias (Experimento II) mantiveram o mesmo perfil quanto à densidade de cistos, mesmo com parâmetros de cor e turbidez alterados (Tabela 3) após um episódio de chuva forte.

Embora a presença de *Cryptosporidium* tenha sido anteriormente registrada no Rio Atibaia, com taxa de 54,1 oocistos/0,5L (Franco et al, 2001) estes não foram detectados nas amostras examinadas. Esse manancial, apesar de ser um sistema lótico, possui pontos de represamento a montante e está sujeito a um complexo conjunto de características inerentes à bacia hidrográfica na qual está inserido, tais como: declividade, manejo, controle da quantidade, volume de água da bacia, tipo de sedimento e de solo, vegetação, densidade populacional ao redor, atividades recreativas, variações pluviométricas e ressuspensão de sedimento, descargas de efluentes industriais e domésticos e diferenças de temperaturas que podem afetar a variação da densidade dos protozoários.

É pouco provável que a ausência de *Cryptosporidium* seja devida à metodologia empregada, neste estudo, considerando-se as taxas de recuperação obtidas nos experimentos controle positivos (Tabela 5), onde a baixa concentração de oocistos e a alta turbidez da água bruta artificial simularam as condições naturalmente presentes na água captada.

Os altos índices de indicadores bacteriológicos confirmaram a contaminação da água bruta e o impacto do despejo de efluentes sanitários e descargas industriais de outras

idades (Krushe et al, 2002). Entretanto, tais bioindicadores não são preditivos para a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* (Craun et al, 1997) como comprovado pela ausência de correlação entre os parâmetros físico-químicos e bacteriológicos e a densidade de cistos, observada neste estudo. Rose et al. (1988) obtiveram resultados similares.

A não detecção de cistos nos efluentes do decantador e do filtro revelou a boa performance do sistema convencional de tratamento, apesar da presença dos mesmos na água bruta captada. Com os valores de pH mantidos dentro de uma faixa ótima (pH= 8,9 a pH= 9,8; Tabelas 2 e 4) e procedimentos operacionais apropriados para coagulação (dosagem ideal do coagulante) e sedimentação, pode-se atingir níveis de remoção de até 99,9% da matéria orgânica e inorgânica suspensa. A etapa de filtração resultou na efetiva redução da turbidez (0,08 a 0,43 NTU; Tabelas 2 e 4), onde valores de 0,1 e 0,5 NTU caracterizaram a eficiência na remoção de cistos pelo sistema de tratamento da ETA 3, (Nieminski & Ongerth, 1995; Portaria nº1469/00). Ressalte-se que os pontos escolhidos para análise nesse estudo (decantação e filtração) constituem etapas críticas no processo convencional de tratamento de água (Dugan et al, 2001). Ao estudarem a performance entre remoção de *Giardia* e *Cryptosporidium* realizada em escala-piloto, Nieminski & Ongerth, 1995 observaram a correlação entre a remoção de partículas de tamanho similares a esses protozoários e a remoção da turbidez. As medidas foram obtidas através do contador de partículas e pelo monitoramento da turbidez.

Condições de ineficiência na operacionalização dos sistemas de tratamento e distribuição foram associadas a surtos de criptosporidiose em vários estados, nos Estados Unidos (Kramer et al, 1996), destacando-se o de Milwaukee, (WIS), que atingiu mais de 400.000 pessoas e resultou em 100 mortes (Fox & Lytle, 1996).

A técnica de filtração em membrana (Aldom & Chagla, 1995; Jakubowski et al, 1996), tem sido extensivamente empregada para avaliação da eficiência em plantas piloto (Dugan et al, 2001, Hsu & Yeh, 2003), sendo que a eluição de cistos e oocistos constitui uma etapa crítica (Hsu et al, 2001b).

No protocolo adotado neste estudo, eliminou-se a etapa de purificação e restringiu-se o número de lavagens com a finalidade de evitar perdas de cistos e oocistos. Outras modificações foram introduzidas, tais como a eluição por extração mecânica e alteração da solução de eluição preparada com água destilada (Hsu et al, 2001b), contribuindo para a melhor performance deste procedimento, evidenciada pela eficiência de recuperação dos experimentos-controle (Tabela 5).

A ocorrência de *Giardia* spp. no manancial estudado indica a necessidade da otimização e manutenção operacional constante do sistema produtor de água com a finalidade de proteger a saúde do consumidor. Porém, antes da implantação de programas de monitoramento serão necessários mais estudos para o conhecimento das características do comportamento desses protozoários no ambiente aquático.

TABELA 1

Parâmetros físico-químicos, bacteriológicos e número de cistos de *Giardia* detectados na Captação de água bruta do Rio Atibaia, Campinas, Brasil, no período de março a setembro de 2002. Experimento I.

Data	<u>Parâmetros Físico-químicos</u>			<u>Parâmetros bacteriológicos</u>		Número de cistos/L
	pH	Cor (mg Pt-Co/L)	Turbidez (NTU)	Colif.Totais (NMP/100MI)	*Colif.Fecais (NMP/100MI)	
27/03/02	7,1	104	37	1,1 x 10 ⁵	2,0x10 ⁴	18
15/04/02	5,9	137	25	1,1 x 10 ⁶	2,1x10 ³	46,7
06/05/02	6,4	118	20	1,7 x 10 ⁶	9,0x10 ⁴	13,8
27/05/02	6,2	129	24	1,3x10 ⁶	1,2x10 ⁵	54,5
17/06/02	7	44	9,6	1,7x10 ⁷	1,4x10 ⁶	12,9
03/07/02	7	70	14	1,1x10 ⁶	7,0x10 ⁴	13,3
30/07/02	6,6	167	30	3,0x10 ⁵	1,1x10 ⁵	14,5
19/08/02	6,8	100	18	6,0x10 ⁶	2,1x10 ⁶	0
09/09/02	6,9	160	31	1,4x10 ⁶	1,5x10 ⁶	60
30/09/02	6,5	107	21	3,0x10 ⁵	1,1x10 ⁵	94,5

* termotolerantes

TABELA 2

Parâmetros físico-químicos e bacteriológicos, na água decantada e filtrada da ETA 3 , Campinas, Brasil, no período de março a setembro de 2002 . Experimento I.

<i>Data</i>	<i>Origem da Amostra</i>	<i>Parâmetros Físico-químicos</i>			<i>Parâmetros bacteriológicos</i>	
		<i>pH</i>	<i>Cor (mg Pt-Co/L)</i>	<i>Turbidez (NTU)</i>	<i>Colif.Totais (NMP/100mL)</i>	<i>*Colif.Fecais (NMP/100mL)</i>
27/03/02	D	9,0	9	1,74	16	9,2
	F	7,1	3	0,35	A	A
15/04/02	D	9,2	9	0,86	16	16
	F	7,5	3	0,13	A	A
06/05/02	D	9,1	9	0,70	16	5,1
	F	7,0	2	0,10	A	A
27/05/02	D	9,3	24	1,89	16	16
	F	7,0	3	0,43	A	A
17/06/02	D	9,1	33	1,29	16	16
	F	6,7	5	0,13	A	A
03/07/02	D	9,1	19	1,36	16	9,2
	F	6,9	1	0,08	A	A
30/07/02	D	9,6	11	1,76	16	9,2
	F	7,4	2	0,25	A	A
19/08/02	D	9,8	27	2,6	16	16
	F	7,3	2	0,26	A	A
09/09/02	D	9,4	21	1,14	16	5,1
	F	7,3	2	0,18	A	A
30/09/02	D	8,9	25	1,08	16	5,1
	F	6,9	4	0,23	A	A

* Termotolerantes; D = Decantada; F = Filtrada; A = Ausente

TABELA 3

Parâmetros físico-químicos, bacteriológicos e número de cistos de *Giardia* detectados na captação de água bruta do Rio Atibaia, Campinas, Brasil, em dias consecutivos no mês de outubro de 2002. Experimento II.

<i>Data/Hora</i>	<i>Parâmetros Físico-químicos</i>			<i>Parâmetros bacteriológicos</i>		
	<i>pH</i>	<i>Cor</i> (mg Pt-Co/L)	<i>Turbidez</i> (NTU)	<i>Colif.Totais</i> (NMP/100mL)	<i>**Colif.Fecais</i> (NMP/100mL)	<i>Número de cistos/L</i>
07/10/02 (7h) *	7	379	70	1,7x10 ⁶	3,0x10 ⁵	75
07/10/02 (12hs)	6,7	200	38	1,1x10 ⁷	3,0x10 ⁴	20
08/10/02 (7hs)	7	93	11,2	2,5x10 ⁷	9,0x10 ⁴	30
08/10/02 (12hs)	6,7	133	24	1,1x10 ⁶	2,1x10 ⁵	50
09/10/02 (7hs)	7,1	141	26	1,7x10 ⁶	1,4x10 ⁶	30
09/10/02 (12hs)	7,2	130	25	1,1x10 ⁶	7,0x10 ⁴	10

*Ocorrência de chuva forte ; **Termotolerantes

TABELA 4

Parâmetros físico-químicos e bacteriológicos, na água decantada e filtrada da ETA 3, Campinas, Brasil, em dias consecutivos no mês de outubro de 2002.

Experimento II.

<i>Data</i>	<i>Origem da Amostra</i>	<i>Parâmetros Físico-químicos</i>			<i>Parâmetros bacteriológicos</i>	
		<i>pH</i>	<i>Cor (mg Pt-Co/L)</i>	<i>Turbidez (NTU)</i>	<i>Colif.Totais (NMP/100mL)</i>	<i>*Colif.Fecais (NMP/100mL)</i>
07/10/02	D	9,6	11	1,67	16	16
	F	7,0	6	0,3	A	A
07/10/02	D	9,4	18	1,5	16	16
	F	7,5	2	0,18	A	A
08/10/02	D	9,1	21	0,79	16	9,2
	F	7,0	3	0,18	A	A
08/10/02	D	9,3	20	0,74	16	16
	F	7,3	3	0,15	A	A
09/10/02	D	9,6	10	0,74	16	16
	F	7,2	2	0,21	A	A
09/10/02	D	9,7	17	0,58	16	9,2
	F	7,6	2	0,12	A	A

D = Decantada; F = Filtrada; A = Ausente; * Termotolerantes

TABELA 5

**Eficiência de recuperação obtida e valor médio do n° de cistos/oocistos
semeados nos experimentos-controle em diferentes tipos de águas.**

<i>Amostra</i>	<u><i>Cryptosporidium</i></u>			<u><i>Giardia</i></u>		
	<i>N°.Oocistos semeados</i>	<i>N°.Oocistos recuperados</i>	<i>Taxa de Recuperação (%)</i>	<i>N°.cistos semeados</i>	<i>N°.Cistos recuperados</i>	<i>Taxa de Recuperação (%)</i>
Milli-Q	113	47	41,6	43	28	65,1
Água Bruta Artificial	79	20	25,3	43	20	46,5

Referências Bibliográficas

- ALDOM, J.E. & CHAGLA, A.H. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by membrane filter dissolution method. **Letters Applied Microbiology**, 20:186-187, 1995.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological Examination. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th ed.** APHA, AWWA, WEF, Washington, 1998.
- CANTUSIO NETO, R. Comparação entre os Métodos de Tubos Múltiplos e o de Substrato Cromogênico Enzimático (ONPGMUG), para detecção de Coliformes na água tratada, Campinas, Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, 15: 64-67, 2001.
- CDC- MMWR. **Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks - United States, 1993-1994.** April 12, 1996/45(SS-1); 1-33, 1996.
- CEPAGRI /UNICAMP - Centro de Ensino e Pesquisa em Agricultura. Posto Meteorológico - **FEAGRI/UNICAMP - Precipitação (mm) - 2002.**
- CHAURET, C.; ARMSTRONG, N.; FISHER, J.; SHARMA, R.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. **Journal of the American Water Works Association**, 87 : 76-84, 1995.
- CRAUN, F.G.; BERGER, P.S.; CALDERON, R. Coliform bacteria and waterborne diseases outbreak. **Journal of the American Water Works Association**, 89: 96-104, 1997.
- CRAUN, F.G.; HUBBS, S.A.; FROST, F.; CALDERON, R.L.; VIA, S. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. **Journal of the American Water Works Association**, 90:81 – 91, 1998.
- DYKSEN, J.E.; MARSHALL, M.M.; GERA, A.; CLANCY J.L. Cost of advanced UV for inactivating *Crypto*. **Journal of the American Water Works Association**, 90: 103-111, 1998.
- DUGAN, N.R.; FOX, K.R.; OWENS, J.H.; MILTNER, R.J. Controlling *Cryptosporidium* oocysts using conventional treatment. **Journal of the American Water Works Association**, 93: 64-76, 2001.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; AND UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. **International Journal for Parasitology**, 30:1305-1322, 2000.

- FIKSDAL, L.; TRYLAND, I.; AND NELIS, H. Rapid detection of coliform bacteria and influence of non-target bacteria. *Water Science Technology*, 35: 415-418, 1997.
- FOX, K. & LYTLE, D. Milwaukee's Crypto outbreak: investigation and recommendations. *Journal of the American Water Works Association*, 88:87-94, 1996.
- FRANCO, R.M.B. & CANTUSIO NETO, R. Occurrence of Cryptosporidial oocysts and Giardia cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 205 – 207, 2002.
- FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts in raw water from Atibaia River, Campinas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 43:109-111, 2001.
- GASSER, R.B.; O'DONOGUE, P. Isolation, Propagation and characterisation of Cryptosporidium. *International Journal for Parasitology*, 29:1379-1413, 1999.
- GRIFFITHS, J.K. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Advances in Parasitology*, 40:37-84, 1998.
- HACHICH, E.M.; GALVANI, A.T.; PADULA, J.A.; MENEGOM, N.; SATO, M.I.Z. Detecção de oocistos de Cryptosporidium e cistos de Giardia em águas superficiais captadas para consumo humano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador/BA, *Anais*, p.17.
- HOWE, A.D.; FORSTER S.; MORTON, S.; MARSHALL, R.; OSBORN, K. S.; WRIGHT, P.; HUNTER, P. R. Cryptosporidium Oocysts in a Water Supply Associated with a Cryptosporidiosis Outbreak. *Emerging Infectious Diseases*, 8:619-624, 2002.
- HSU, B.M.; HUANG, C.; HSU, Y.; JIANG, G.; HSU, CL. Evaluation of two concentration methods for detection Giardia and Cryptosporidium in water. *Water Research*, 35 : 419-424, 2001a.
- HSU, B.M.; HUANG, C.; PAN, JR. Filtration behaviour of Giardia and Cryptosporidium - ionic strength and pH effects. *Water Research*, 35 : 3777 – 3782, 2001b.
- HSU, B.M.; YEH, H.H. Removal of Giardia and Cryptosporidium in drinking water treatment: a pilot -scale study. *Water Research*, 37: 1111-1117, 2003.
- JAKUBOWSKI W.; BOUTROS, S.; FABER, W.; FAVER, R.; GHIORSE, W.; LECHEVALLIER, M.; ROSE, J.; SCHAUB, S.; AND STEWART, M. Environmental methods for Cryptosporidium. *Journal of the American Water Works Association*, 88:107-121, 1996.

- KRASZEWSKI, J. *Water for people supports small systems for impoverished people worldwide. Journal of the American Water Works Association*, 93:36-37, 2001.
- KRAMER, M.H.; HERWALT, B.L.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; JURANEK, D.D. *Waterborne disease: 1993-1994. Journal of the American Water Works Association* 88:, 66-80, 1996.
- KRUSHE, A.V.; MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R.L.; BERNARDES, M.; CAMARGO P.B.; BALLESTER, M.V.; TRUMBORE, S.E. *Composition of particulate and dissolved organic matter in a disturbed watershed of southeast Brazil (Piracicaba river basin). Water Research*, 36: 2743-2752, 2002.
- LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; LEE, R.G. *Ocurrence of Giardia and Cryptosporidium in surface water samples. Applied Environmental Microbiology*, 57: 2610-2616, 1991.
- LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D. *Giardia and Cryptosporidium in raw water and finished water. Journal of the American Water Works Association* , 87: 5 4-68, 1995.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL - **PORTARIA 1469**- publicada em 29/12/2000
- NIEMINSKI, E.C.; ONGERTH, J.E. *Removing Giardia and Cryptosporidium by conventional treatment and direct filtration. Journal of the American Water Works Association* 87 : 96-106, 1995.
- PICKERING, L.K. & ENGELKIRK, P.G. *Giardia lamblia. Pediatric Clinics of North America*, 35:565-577, 1998.
- POWDERLY, W 2000. *Opportunistic Infections 2000. Medscape HIV/AIDS: Annual Update*. 23/03/2002
www.medscape.com/medscape/hiv/annualupdate/2000/mha.update05.14.powd/pnt-mha05.powderly.html.
- RELATÓRIOS AMBIENTAIS - **QUALIDADE DAS ÁGUAS INTERIORES DO ESTADO DE SÃO PAULO**, 2000 - volumes 1 e 2.
- RODGERS, M.R.; FLANIGAN, D.J.; AND JAKUBOWSKI, W. *Identification of Algae which interfere with the detection of Giardia Cysts and Cryptosporidium Oocysts and a Method for alleviating this Interference. Applied Environmental Microbiology*, 61:3759-3763, 1995.
- ROSE, J.B.; DARBIN, H.; AND GERBA, C.P. *Correlations of the protozoa, Cryptosporidium and Giardia, with water quality variables in watershed. Water Science Technology*, 20:271-276, 1988.

ROSE, J.B.; HUFFMAN, D.E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26:113-123, 2002.

SOLO-GABRIELE, H.; NEUMEISTER, S. US outbreaks of cryptosporidiosis. *Journal of the American Water Works Association*, 88: 76-86, 1996.

SMITH, H.V.; CAMPBELL, B.M.; PATON, C.A.; NICHOLS, R.A.B. Significance enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp oocysts in water concentrated determined by using 4',6' - diamidino - 2 - phenylindole and IMS microscopy. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 5198 – 5201, 2002.

THOMPSON, R.C.A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology*, 30:1259-1267, 2000.

TZIPORI, S. & WARD, H. Cryptosporidiosis biology, pathogenesis and diseases. *Microbes and Infection*, 4 : 1047 – 1058, 2002.

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-01-025**, 1999.

* As referências estão de acordo com as normas da Revista Higiene Alimentar

6. Informações Complementares

Desde que a presença de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foi constatada em água bruta superficial do rio Atibaia, principal manancial que abastece a cidade de Campinas (FRANCO et al, 2001), a investigação das fontes de contaminação tornou-se uma importante informação para as questões epidemiológicas e ambientais, no que concerne a captação do sistema de tratamento de água.

No presente estudo, as análises microbiológicas comprovaram a contaminação do rio Atibaia (Tabelas 1 e 3), porém, não foi observada uma correlação significativa entre a presença e concentração de cistos de *Giardia*, parâmetros físico-químicos e bacteriológicos: pH ($r = -0,403$); cor ($r = 0,323$); turbidez ($r = 0,213$); coliformes totais ($r = -0,333$); coliformes fecais ($r = -0,300$). No estudo feito por Rose et al, 1988, nos Estados Unidos, também não foi encontrada correlação entre coliformes totais, fecais, turbidez, oocistos e cistos de *Giardia* presentes em 39 amostras de água superficial analisadas de um rio situado na região oeste dos Estados Unidos: turbidez ($r = 0,242$); coliformes totais ($r = 0,154$); coliformes fecais ($r = 0,291$) para *Cryptosporidium* e, turbidez ($r = 0,284$); coliformes totais ($r = 0,018$); coliformes fecais ($r = 0,102$) para *Giardia*, com $p (<0,05)$.

Contrariamente, Atherholt et al., 1998 estudaram a relação entre concentrações de *Giardia* e *Cryptosporidium* com os parâmetros físicos químicos e microbiológicos: pH, turbidez, coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, em 72 amostras de um manancial em New Jersey, Estados Unidos e observaram uma correlação significativa entre as concentrações de *Giardia* e os parâmetros: pH ($r =$

0,337); turbidez ($r = 0,428$); coliformes totais ($r = 0,239$); coliformes fecais ($r = 0,233$); *Clostridium perfringens* ($r = 0,421$) com ($p < 0,05$); e *Cryptosporidium* e os parâmetros: pH ($r = 0,450$); turbidez ($r = 0,534$); coliformes totais ($r = 0,442$); coliformes fecais ($r = 0,428$); *Clostridium perfringens* $r = 0,524$, com ($p < 0,01$).

No Brasil, Muller, 1999, utilizando o teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$), não obteve correlações significativas entre as concentrações de *Cryptosporidium* e coliformes totais e *E. coli* em 12 amostras de água bruta na cidade de São Paulo, onde r (coeficiente de correlação) variou de 0,100 a 0,360.

Dias Júnior, 1999, obteve resultados significativos ($p < 0,05$) entre as concentrações de *Giardia* e estreptococcus fecais ($r = 0,617$) para 12 amostras de águas superficiais, no Município de Araras (SP).

É interessante ressaltar que o uso do grupo “coliformes” como indicadores da qualidade da água para consumo humano, no que tange a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia*, tem sido muito questionado devido ao fato de que as bactérias são organismos menos resistentes do que os protozoários em questão. Ressalte-se que vários surtos de criptosporidiose ocorreram nos Estados Unidos e foram associados à água de consumo humano, apesar de a mesma atender aos padrões bacteriológicos vigentes naquele país (KRAMER et al, 1996).

Craun et al, 1997, avaliaram nos Estados Unidos, episódios de surtos de veiculação hídrica, envolvendo vários patógenos, no período entre 1983 e 1992 e ressaltaram que os coliformes são indicadores para bactérias e vírus, porém, não para os protozoários.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo e em outros, confirmam a inadequação dos padrões microbiológicos como organismos preditores da presença de protozoários patogênicos em água destinada ao consumo humano.

Devido às limitações destes indicadores, a alteração das metodologias e mesmo outros organismos têm sido indicados como alternativas para avaliação da qualidade da água, tais como o *Clostridium perfringens*. No Brasil, Junqueira et al, 2002, estudaram a ocorrência de esporos em 50 amostras de água bruta na captação do rio Atibaia e 80 amostras de águas tratadas (na mesma ETA deste estudo), abrangendo períodos de chuvas e estiagem, no ano de 2001/02. A prevalência foi de 100% para as amostras de águas brutas, com valores máximos de 54 NMP/mL (Número Mais Provável/ mL) no período de estiagem; esporos não foram detectados na amostras de água, após o tratamento, colhidas em pontos da rede de distribuição. A presença de *Clostridium perfringens* indica a contaminação fecal remota, onde outros indicadores de menor resistência (*E. coli*) não seriam encontrados. O monitoramento deste indicador fornece subsídios para avaliar a eficiência na remoção de organismos patogênicos resistentes, como os protozoários.

A ubiquidade desses protozoários em diferentes ambientes aquáticos, tais como: rios, lagos, reservatórios, águas residuárias, marinhas e subterrâneas (CHAURET et al, 1995; STATES et al, 1997; ATHERHOLT et al, 1998; SOLO-GABRIELE et al, 1998; DIAS JÚNIOR, 1999; FRANCO et al, 2001; HO E TAM, 1998), ressalta a importância dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* como patógenos de veiculação hídrica, representando um risco para a saúde humana.

No Brasil, embora as pesquisas estejam em expansão, vários estudos têm comprovado a ampla dispersão de cistos e oocistos em diferentes ambientes aquáticos, tais

como: águas brutas (MULLER, 1999; FRANCO et al, 2001), efluentes domésticos (DIAS JÚNIOR, 1999; SANTOS et al, 2003), águas minerais comercializadas (FRANCO E CANTUSIO NETO, 2002), águas de consumo (MULLER, 1999) e águas subterrâneas (GAMBA et al, 2000).

Vários estudos têm comprovado a variação da densidade de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em função de fatores como: características da bacia hidrográfica, variações pluviométricas, descargas de efluentes industriais e domésticos, temperatura, distribuição não homogênea, metodologia empregada para análise e atividade humana ao redor do manancial (LECHEVALLIER et al, 1991; LECHEVALLIER E NORTON, 1995; HSU et al, 2001a).

O rio Atibaia, apesar de ser um sistema lótico, tem seu volume de água controlado pelo reservatório Cantareira e essa porcentagem tem sido muito variada entre o período de 2001 a 2003, com uma diminuição significativa de água (Anexo 2 e Anexo 3). Tal situação tem sido atribuída ao alto impacto ambiental que a bacia tem sofrido (KRUSCHE et al, 2002), além da própria condição geográfica desta. Cabe ressaltar que o ponto de captação, objeto deste estudo, sofre ação do despejo do Ribeirão Pinheiros, altamente contaminado por efluentes sanitários o qual deságua a montante, influenciando a qualidade parasitológica da água do rio Atibaia (OLIVEIRA et al, 2003).

Quanto às variações pluviométricas, elas têm sido indicadas como um dos principais fatores a influenciar a densidade e ocorrência desses parasitos (ROSE et al, 2002); o fenômeno da ressuspensão de sólidos e de material fecal pelo efeito das chuvas fortes nos mananciais, bem como outros fatores não identificados (ATHERHOLT et al, 1998), têm sido considerados. Neste estudo, não houve evidências de diferenças estatisticamente

significativas entre as concentrações de cistos de *Giardia/L* nos períodos de seca e chuva ($p < 0.05$). O perfil não definido das estações climáticas em Campinas e região no ano de 2002, conforme constatados pelos valores médios de precipitação (Anexo 4) pode ter contribuído para este fato.

A influência da temperatura tem sido considerada como um fator para a sobrevivência de protozoários, bem como de microrganismos autóctones em águas de rio (MEDEMA et al, 1997). Na região da bacia do rio Atibaia, em Campinas, houve pouca variação das temperaturas nos meses estudados (Anexo 5), porém, estão dentro das faixas que influenciam o período de sobrevivência e viabilidade de protozoários (MEDEMA et al, 1997).

Cabe ressaltar que, de acordo com Meinhardt et al, 1996, as amostras ambientais representam uma fatia de uma curva de distribuição dos oocistos no corpo d'água e sua dispersão no mesmo não é homogênea. Vários autores também atribuem a origem desses protozoários à contaminação animal predominante na região do estudo, bem como atividades humanas (ROSE et al, 1988; SMITH 1998).

Como não foi encontrada uma diferença significativa da presença dos protozoários, entre as estações seca e chuvosa, considerou-se no experimento II uma provável intermitência da contaminação, em termos de uma variação diária no período analisado; amostras colhidas diariamente mantiveram o mesmo perfil quanto à densidade de cistos, mesmo em episódio de chuva forte. Apesar da não diferença estatística, é importante ressaltar que o número de cistos aumentou logo após esse episódio (Tabela 3).

É pouco provável que a não detecção de *Cryptosporidium*, neste estudo, tenha ocorrido devido à metodologia empregada. A técnica de membrana filtrante foi o método

utilizado nesse trabalho. Proposto em 1995 por Aldom e Chagla, foi desenvolvido para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em amostras de água tratada e, atualmente, este método é considerado particularmente útil para a determinação destas formas em águas brutas (ALDOM e CHAGLA, 1995). Este protocolo foi a opção metodológica deste estudo devido não só ao seu menor custo quando comparado ao Método 1623, bem como à taxa de recuperação média ao redor de 70,5% (ALDOM e CHAGLA, 1995). Franco et al, 2001a, analisaram amostras de água bruta, utilizando a filtração em membrana e relataram taxas de recuperação para oocistos e cistos de 41,6% a 91,8%. Franco e Cantusio Neto, 2002, investigaram amostras de águas minerais e obtiveram taxas de recuperação para oocistos e cistos de 20 a 91,8%. Testes de reprodutibilidade do método evidenciaram que a eficiência de recuperação de oocistos variou entre 35,9% e 96,8% (FRANCO et al, 2001b). Cabe ressaltar que do conjunto de filtros da ETA 3, o filtro 5 foi escolhido pela variação apresentada da turbidez da água filtrada.

Quanto à detecção através da microscopia por imunofluorescência, importa ressaltar o fato de que não são disponíveis até o momento anticorpos fluorescentes espécie - específicos para *Giardia* e *Cryptosporidium*. Outro ponto relevante reside na dificuldade do reconhecimento destes parasitas, dificuldades estas devido aos fatores ambientais adversos que podem alterar a morfologia dos cistos e oocistos (ONGERTH e STIBBS, 1987).

A experiência técnica tornou-se um pré-requisito, sendo uma etapa crítica, pois além de ser uma análise demorada, é complexa e trabalhosa. Segundo RODGERS et al, 1995, a presença concomitante de algas, nas amostras de água analisadas, pode contribuir para que ocorram resultados falso-positivos uma vez que algumas espécies de algas reagem positivamente com anticorpos fluorescentes presentes nos kits comerciais utilizados. No

período deste estudo, ocorreram algumas florações algais, com concentrações significativas de fitoflagelados e cianobactérias (CANTUSIO NETO, 2003). Nessa etapa, é necessário utilizar outros elementos para possibilitar a confirmação das características morfológicas internas. No caso deste estudo, incluiu-se o uso do corante vital DAPI (teste confirmatório da morfologia dos cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*) e simultaneamente a visualização em contraste de fase (Figuras 4 e 5).

Ressalte-se que os altos custos do Método 1623 constituem um fator limitante para a implantação do monitoramento ambiental de oo(cistos) pelas estações de tratamento, pois prevê o uso de separação imunomagnética para promover a separação dos (oo)cistos e partículas não-alvos, utilizando para isto, partículas magneticamente reagentes cobertas com anticorpos específicos, direcionados contra a parede dos (oo)cistos. Porém, alguns autores têm obtido baixa eficiência de recuperação por vários fatores e, dentre eles, pode-se citar: pH da água, turbidez, tempo de reação, volume do sedimento final submetido a IMS (o qual não deve ultrapassar 500 µL), estabilidade das soluções tampões dos kits de IMS, marcas comerciais dos kits e tempo de dissociação ácida (FRICKER e CRABB, 1998; MCCUIN E CLANCY, 2003).

Por outro lado, a técnica de filtração em membranas tem sido empregada (nos EUA) para a avaliação da eficiência de remoção nas estações de tratamento dos protozoários, em plantas-piloto (DUGAN et al, 2002; JAKUBOWSKI et al, 1996) e por este motivo, foi adotada neste estudo.

Neste caso, o maior fator limitante foi a turbidez da água: quanto maior a turbidez, conseqüentemente ocorre de maneira mais rápida a obstrução dos filtros. Caso mantenha-se

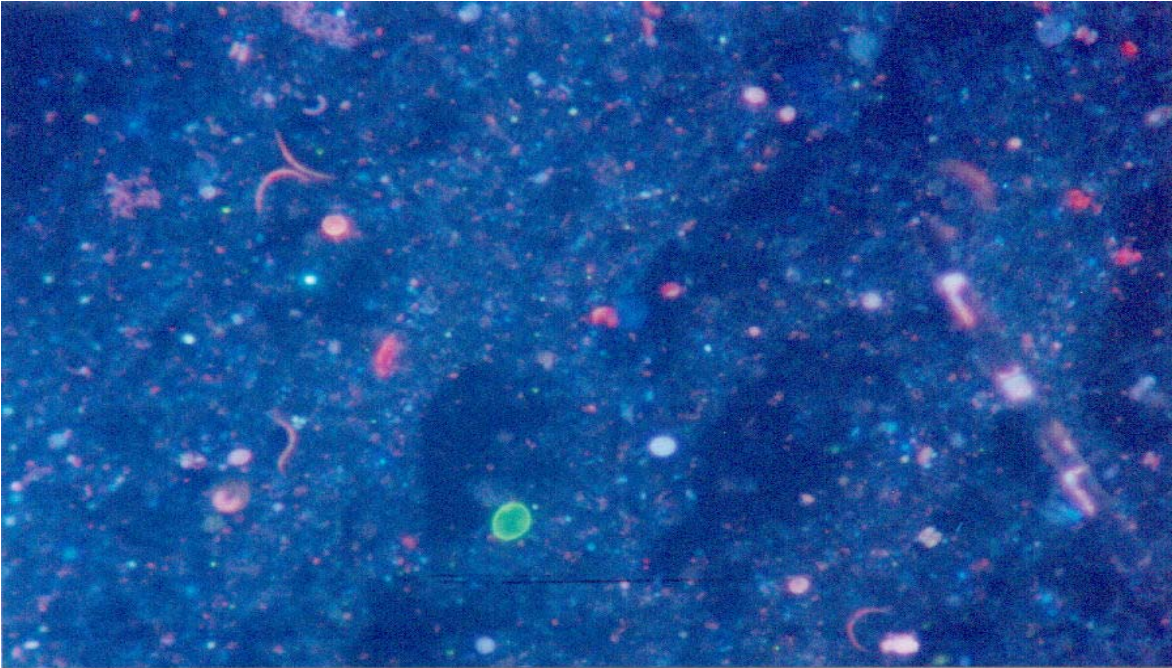


Figura 4 – Cisto de *Giardia* spp, visualizado pela reação de imunofluorescência direta, com anticorpos monoclonais – aumento de 400 x

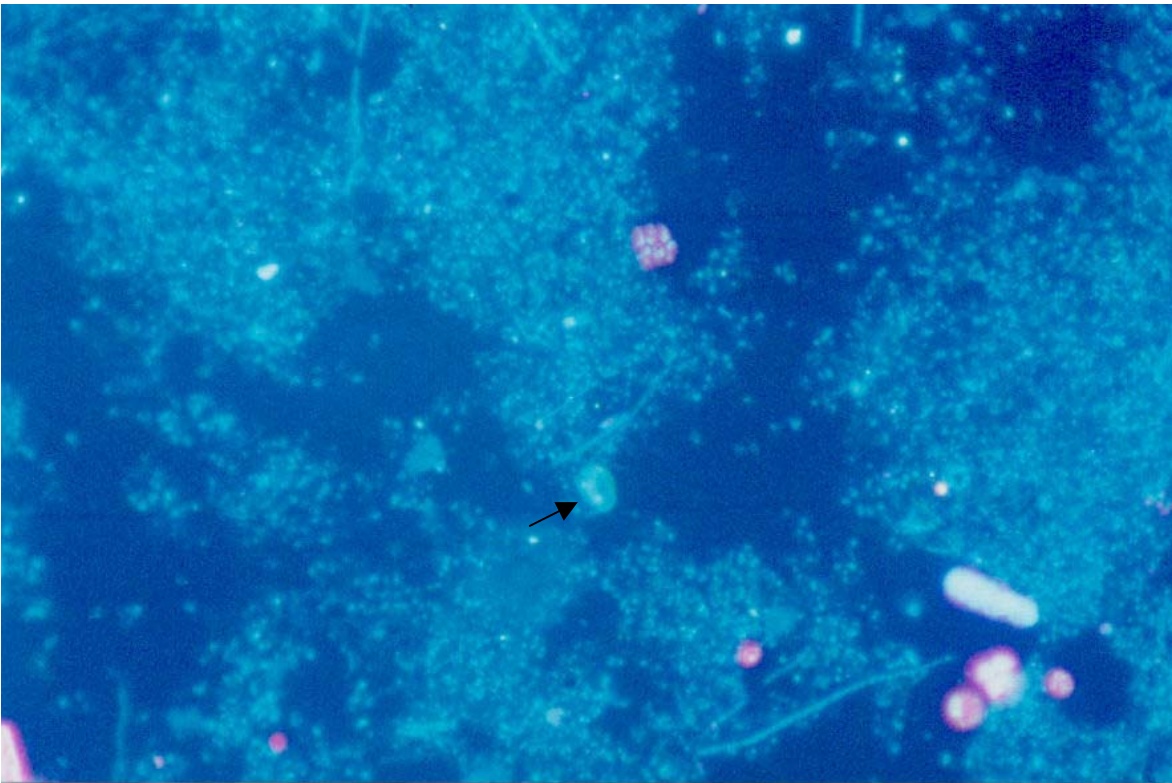


Figura 5 – Cisto de *Giardia* spp pela coloração com corante fluorogênico vital (DAPI) aumento de 400 x

a filtração nestas condições por muito tempo, ocorre a retenção irreversível dos organismos (ONGERTH e STIBBS, 1987).

Algumas modificações foram introduzidas com a finalidade de reduzir perdas no procedimento, tais como: a redução das etapas laboratoriais e a não inclusão dos procedimentos de purificação, evitando dessa forma a excessiva manipulação no processo laboratorial; opção por eluição mediante extração mecânica, pois a dissolução da membrana resultou em menor taxa de recuperação (FRANCO et al, 2001a); a modificação da solução de eluição em virtude de suas propriedades iônicas, substituindo a solução tampão fosfato por água destilada (HSU et al, 2001b). Quanto ao experimento-controle foi utilizada água com características artificialmente produzidas, assumindo condições similares da água bruta e contaminada com reduzidos inóculos (10^2 de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*), os resultados obtidos também foram satisfatórios como comprovado pela eficiência de recuperação alcançada nesses ensaios (Tabela 5).

Cabe ressaltar a dificuldade de comparar os dados dos experimentos controle-positivos com dados da literatura, pois as informações documentadas nos diversos trabalhos são parciais (KLONICKI et al, 1997). A fonte, tempo de armazenamento, forma de conservação e técnicas de contagem das suspensões de oocistos (hemocitômetro, contagem direta em poços das lâminas de IFA) são utilizadas para esse objetivo; atualmente, a recomendação é utilizar dosagens menores que 100 oocistos/L (MCCUIN e CLANCY, 2003). Dados das porcentagens de recuperação são normalmente apresentados nos trabalhos, porém, poucas são as informações sobre a qualidade da água utilizada (FRICKER e CRABB 1998).

No sistema convencional de tratamento, os procedimentos operacionais para uma eficiente coagulação e sedimentação podem remover até 99.9% da matéria orgânica e inorgânica suspensa no processo; por isso são consideradas etapas críticas do processo de tratamento da água (DUGAN et al, 2001). As faixas de pH (Tabelas 2 e 4) se mantiveram dentro da faixa ótima (pH=8,9 a pH=9,8) no caso desse estudo. Mesmo em condições de alterações significativas de cor e turbidez na água bruta, ocasionada por fortes chuvas (Tabela 3), o controle operacional permitiu a manutenção do mesmo perfil dos parâmetros das saídas do decantador e filtro (Tabela 4), mantendo a qualidade da água final. Cabe ressaltar que, o uso de um coagulante adequado, como o cloreto férrico, usado no processo de tratamento, permite uma efetiva remoção de cistos e oocistos (STATES et al, 2002). Desta forma, os procedimentos operacionais, a otimização do sistema convencional de tratamento e os valores dos parâmetros (físico-químicos, bacteriológicos e parasitológicos) analisados, mostraram a boa performance desta Estação de Tratamento.

Craun et al, 1997, expõem que, além do monitoramento microbiológico, as adequações do sistema de tratamento de água são medidas necessárias numa ETA para garantir a qualidade da água final.

Smith e Rose, 1998 relatam que o controle da presença de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* depende de um eficiente controle operacional de uma ETA. As águas brutas devem ser monitoradas sempre que ocorram alterações significativas na sua qualidade ou quando a ETA não estiver operando em condições normais.

Em 29/12/2000, o Ministério da Saúde publicou a revisão da portaria 1469 (Ministério da Saúde, 2000) sobre a qualidade da água para consumo humano. Nela encontra-se a recomendação para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de

Giardia, e também, Enterovírus. Em águas de abastecimento, a meta é a ausência destes organismos. Esta portaria objetiva a garantia da qualidade físico-química e microbiológica da água, exigindo, desta forma, além dos indicadores microbiológicos, padrões de turbidez de acordo com o tratamento utilizado. Dentre os valores estabelecidos, esta portaria recomenda que, para a adequada eficiência de remoção cistos de *Giardia*, oocistos de *Cryptosporidium* e enterovírus, se estabeleça como meta, para a filtração rápida, a obtenção de efluente filtrado com valores inferiores a 0,5 NTU (unidades nefelométricas de turbidez) em 95% da amostragem mensal.

Considerando a importância dos protozoários de veiculação hídrica, procedimentos têm sido adotados para evitar a presença desses contaminantes na água. A agência de Proteção Ambiental (USEPA), nos Estados Unidos, propõe padrões sanitários para a qualidade da água de consumo humano - *Interim Enhanced Surface Water Treatment Rule* (IESWTR, 1998) que estipula como zero o nível máximo de contaminação por protozoários na água: *Maximum Contaminant Level Goal* (MCLG) = 0 para *Cryptosporidium*. Não são limites obrigatórios e, sim, níveis máximos ideais para contaminantes potenciais que oferecem riscos à saúde. Por isso, simultaneamente, foi também estabelecido um nível máximo permitido – MCL (*Maximum Contaminant Level*). Muitas vezes, o MCL torna-se inviável do ponto de vista técnico ou econômico, por isso, pode-se empregar uma técnica de tratamento de água que seja efetiva para a remoção ou redução do contaminante (USEPA, 1999). Desta forma, essa lei estabelece que os sistemas que utilizam águas superficiais para abastecimento de uma população maior que 10.000 pessoas devem usar processos de filtração capazes de remover 2 logs (99%) de *Cryptosporidium*, bem como requisitos relativos a turbidez e outros parâmetros relevantes para sistemas públicos.

No Reino Unido, regulamentações foram delineadas pela *Water Supply (Quality Water) Regulations 1999*, a qual estabelece que nos sistemas produtores, a água tratada seja monitorada diariamente para *Cryptosporidium*, com um limite máximo de 10 oocistos/100L. Se forem detectadas concentrações superiores, a empresa estará sujeita a penalidades. Países como Austrália e Canadá não recomendam limites para os protozoários devido a não confiabilidade dos métodos disponíveis. (FAIRLEY et al, 1999).

Smith e Rose, 1998, discutem a atual legislação europeia (*Drinking Water Directive*), que requer ausência de organismos patogênicos, de formas parasitárias e algas na água para consumo humano, reconhecendo a impossibilidade de estabelecer-se um padrão zero.

7. Conclusões

As conclusões deste estudo foram:

- 1 - Cistos de *Giardia* spp. estiveram presentes em 90% (Experimento I) e 100% (Experimento II) das amostras de água bruta captada do rio Atibaia – bacia do rio Piracicaba.
- 2 - *Cryptosporidium* spp. não foi detectado nas amostras de água bruta do rio Atibaia, em ambos os experimentos.
- 3 - A ocorrência de cistos de *Giardia* na água bruta do rio Atibaia (ponto de captação) atingiu valores máximos de 94,5 cistos/L.
- 4 - Os protozoários patogênicos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foram ausentes nas amostras colhidas após as etapas de filtração e decantação da ETA 3.
- 5 - Os valores obtidos em relação aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos comprovaram a contaminação da água bruta.
- 6 - Não houve correlação estatística ($p < 0,05$) significativa entre a concentração de *Giardia* (número de cistos/L) e os parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados.
- 7 - Não houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens médias de cistos/L quando comparados os períodos de chuva (março, abril e maio) e seca (junho, julho, agosto e setembro) ($p < 0,05$).
- 8 - As taxas de eficiência de recuperação nos experimentos controle da metodologia empregada neste estudo (Filtração em Membrana) foram de 25,3% (água bruta

artificial) e 41,6% (água Milli-Q) para *Cryptosporidium* e 46,5% (água bruta artificial) e 65,1% (água Milli-Q) para *Giardia*.

- 9 - A ausência de cistos de *Giardia* nos efluentes do decantador e do filtro, juntamente com os valores obtidos nas análises físico-químicas e microbiológicas, atestou a eficiência do sistema de tratamento nesta ETA, na remoção deste protozoário patogênico.

Referências Bibliográficas

- AL-ANI, M.Y.; HENDRICKS, D.W.; LOGSDON, G.S.; and HIBLER, C.P. Removing *Giardia* cysts from low turbidity waters by rapid rate filtration. **Journal of the American Water Works Association**, 78(5):66–73, 1986.
- ALDOM, J.E.; CHAGLA, A.H. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by membrane filter dissolution method. **Letters Applied Microbiology**, 20:186-187, 1995.
- ALLEN, M.J.; CLANCY, J.L.; RICE, E.W. The plain, hard truth about pathogen monitoring. **Journal of the American Water Works Association**, 92(9):64-76, 2000.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological Examination. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th ed.** APHA, AWWA, WEF, Washington, 1998.
- ATHERHOLT, T.B.; LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; ROSEN, J.S. Effect of rainfall on *Giardia* and *Crypto*. **Journal of the American Water Works Association**, 90:66-80, 1998.
- BARWICK, R.S.; LEVY, D.A.; CRAUN, G.F.; BEACH, M.J.; CALDERON, R.L. Surveillance for waterborne disease outbreaks – Unites States, 1997-1998. **MMWR**, 2000.
- BELLAMY, W.D.; CLEASBY, J.L.; LOGSDON, G.S.; ALLE, M.J. Assessing treatment plant performance. **Journal of the American Water Works Association**, 85(12):34-38, 1993.
- BRUM, M.AR.; TERRA, N.N.; PIOVEZANO, A.; HOLSBACACK, M.T. Aspectos microbiológicos da água potável em Santa Maria – RS:1 – Reservatórios particulares. **Revista Centro Ciências Rurais** 7(3): 245-250, 1997.
- BUKHARI, Z.; SMITH H.V.; SKYES, N.; HUMPHREYS S.W.; PATON C.A.; GIRDWOOD R.W.A.; FRICKER C.R. Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* sp cysts in sewage influents and effluents from plants in England. **Water Science Technology**, 35(11-12): 385-390, 1997.

- CACCIÓ, S.; PINTER, E.; FANTINI, R.; MEZZARONA, I.; POZIO, E. Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. **Emerging Infectious Diseases**, 8: 263-268, 2002.
- CANTUSIO NETO, R. Experiência do Prestador de Serviço na Implementação do Monitoramento das Cianobactérias. **22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Mesa 2 – Protozoários, Cianobactérias e Cianotoxinas, 2003.
- 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. **Applied Environmental Microbiology**, 67(7):3309-3313, 2001.
- CDC- **MMWR**. Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks - United States, 1993-1994. April 12, 1996/45(SS-1); 1-33, 1996.
- CDC- **MMWR**. Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks - United States, 1999-2000. November 22, 2002/51(SS08); 1-28.
- CEPAGRI /UNICAMP - Centro de Ensino e Pesquisa em Agricultura. Posto Meteorológico - **FEAGRI/UNICAMP** - Precipitação (mm) - 2002.
- CETESB. **Coliformes Totais e Fecais em amostras de água pela técnica de tubos múltiplos**. São Paulo, (NT L5.202),1992
- CHAURET, C.; ARMSTRONG, N.; FISHER, J.; SHARMA, R.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. **Journal of the American Water Works Association**, 87 : 76-84, 1995.
- CLANCY, J.L.; BUKHARI, Z.; MCCUIN, R.M.; MATHESON, Z.; FRICKER, C.R. USEPA Method 1622. **Journal of the American Water Works Association** 91:60-67, 1999.
- CLANCY, J.L.; CONNELL, K.; MCCUIN, R.M. Implementing PBMS improvements to USEPA'S *Cryptosporidium* and *Giardia* methods. **Journal of the American Water Works Association**, 95(9):80-93, 2003.
- CRAUN, F.G.; BERGER, P.S.; CALDERON, R. Coliform bacteria and waterborne diseases outbreak. **Journal of the American Water Works Association**, 89: 96-104, 1997.
- CROCKETT, C.S. AND HAAS, C.N. Understanding protozoa in your watershed. **Journal of the American Water Works Association**, 89:9:62-73, 1997.
- DIAS JUNIOR, O. Ocorrência de cistos de *Giardia* sp e oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas superficiais e esgoto no município de Araras – SP. São Paulo. **Dissertação de Mestrado – Universidade Mackenzie**, 1999.

- DYKSEN, J.E.; MARSHALL, M.M.; GERA, A.; CLANCY J.L. Cost of advanced UV for inactivating Crypto. **Journal of the American Water Works Association**, 90: 103-111, 1998.
- DUGAN, N.R.; FOX, K.R.; OWENS, J.H.; MILTNER, R.J. Controlling *Cryptosporidium* oocysts using conventional treatment. **Journal of the American Water Works Association**, 93: 64-76, 2001.
- FAIRLEY, C.K.; SINCLAIR, M.I.; RIZAK, S. Monitoring not the answer to *Cryptosporidium* in water. **Lancet**, 354 (September): 967-969, 1999.
- FARIAS, E.V.C. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo. São Paulo. **Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da USP**, 2000.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; AND UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. **International Journal for Parasitology**, 30:1305-1322, 2000.
- FRANCO, R.M.B. Infecções Parasitárias em creches: estudo em uma área urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*. Campinas, São Paulo. **Tese de Doutorado. Unicamp**. 104 pp., 1996.
- FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 43:109-111, 2001a.
- 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. **Jornal Brasileiro de Patologia**, 37(4):205, 2001b.
- FRANCO, R.M.B. E CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidial* oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97: 205 – 207, 2002.
- FRICKER, C.R.; CRABB, J. Water-borne *Cryptosporidiosis*: Detection methods and treatment options. **Advanced Parasitology**, 40:241-278, 1998
- GAMBA, R.C.; CIAPINA, E.M.P.; ESPÍNDOLA, R.S.; PACHECO, A.; PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* sp oocysts in groundwater for human consumption in Itaquacetuba city, São Paulo, Brasil. **Brasilian Journal of Microbiology** 31: 151-153, 2000.

- GELDREICH E.E. La amenaza mundial de los agentes patógenos transmitidos por el agua. Washington, D.C.:OPS/ILSI Press; p. 21-49, 1996.
- HERVALDT, B.L.; CRAUN G.F.; STROKES, S.L.; JURANEK, D.J. Outbreaks of waterborne disease in the United States: 1989-90. **Journal of the American Water Works Association**, 84(4): 129-135, 1992.
- HO, B.S.W.; TAM, T.Y. Occurrences of *Giardia* cysts in beach water. **Water Science Technology**, 38(12):73-76, 1998.
- HSU, B.M.; HUANG, C.; HSU, C.L.L.; HSU, Y.F.; YEH, J.H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in the Kau-Ping river and this watershed in Southern Taiwan. **Water Research**, 33(11): 2701-2707, 1999.
- HSU, B.M.; HUANG, C.; LAI, Y.C.; TAI, H.S.; CHUNG, Y.C. Evaluation of immunomagnetic separation method for detection of *Giardia* for different reaction times and reaction volumes. **Parasitology Research**, 87:472-474, 2001.
- HSU, B.M.; HUANG, C.; HSU, Y.; JIANG, G.; HSU, CL. Evaluation of two concentration methods for detection *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. **Water Research**, 35 : 419-424, 2001a.
- HSU, B.M.; HUANG, C.; PAN, JR. Filtration behaviour of *Giardia* and *Cryptosporidium* - ionic strength and pH effects. **Water Research**, 35 : 3777 – 3782, 2001b.
- JAKUBOWSKI W.; BOUTROS, S.; FABER, W.; FAVER, R.; GHIORSE, W.; LECHEVALLIER, M.; ROSE, J.; SCHAUB, S.; AND STEWART, M. Environmental methods for *Cryptosporidium*. **Journal of the American Water Works Association**, 88:107-121, 1996.
- JUNQUEIRA, V.C.A.; CANTUSIO NETO, R.; SILVA, N.; TERRA, J.H.; SILVA, D.F.Ocorrência de esporos de *Clostridium perfringens* em água bruta e tratada no município de Campinas, SP. II Simpósio de Segurança Alimentar e Saúde do Estado de São Paulo; II Simpósio de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e alimentar; I Mostra Estadual de Experiências bem sucedidas em Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e alimentar e Segurança de alimentos, São Paulo, 2002.
- KARANIS, P.; SCHOENEN, D.; SEITZ, H.M. Distribution and removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies in Germany. **Water Science Technology**, 37(2): 9-18,1998.
- KATSUMATA, T.; HOSEA, D.; RANUH, I.G.; UGA, S.; YANAGI, T.; KHONO, S. Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. **American Journal Tropical Medicine Hygiene** 62: 70-72, 2001.

- KENT, G.P.; GREENSPAN, J.R.; HERNDON, J.L.; MOFENSON, L.M.; HARRIS, J.A.N.; ENG, T.R.; VASKIN, H.A. Epidemic giardiasis caused by a contaminated public water supply. **American Journal Public Health** 78(2): 139-143, 1988.
- KLONICKI, P.T.; HANCOCK, C.M.; STRAUB, T.M.; HARRIS, S.I.; HANCOCK, K.W.; ALYASERI, A.N.; MEYER, C.J.; AND STURBAUM, G.D.1997. *Crypto* research: are fundamental data missing ? **Journal of the American Water Works Association** 89(9): 97-103, 1997.
- KOSEK, M.; ALCANTARA, C.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: na update. **The Lancet Infectious Diseases** 1:262-269, 2001.
- KRAMER, M.H.; HERWALDT, B.L.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; JURANEK, D.D. Surveillance for waterborne-disease outbreaks, United States, 1993-1994. **MMWR** 45(SS-1): 1-33, 1996.
- KRASZEWSKI, J. Water for people supports small systems for impoverished people worldwide. **Journal of the American Water Works Association**, 93:36-37, 2001.
- KRUSHE, A.V.; MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R.L.; BERNARDES, M.; CAMARGO P.B.; BALLESTER, M.V.; TRUMBORE, S.E. Composition of particulate and dissolved organic matter in a disturbed watershed of southeast Brazil (Piracicaba river basin). **Water Research**, 36: 2743-2752, 2002.
- LECHEVALLIER, M.W.; TROK, T.M.; BURNS, M.O.; LEE, R.G. Comparison of the zinc sulphate and immunofluorescent techniques for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Journal of the American Water Works Association**, 82(9):75-82, 1990.
- LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; LEE, R.G. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in surface water samples. **Applied Environmental Microbiology**, 57: 2610-2616, 1991.
- LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D. *Giardia* and *Cryptosporidium* in raw water and finished water. **Journal of the American Water Works Association** , 87: 5 4-68, 1995.
- LECHEVALIER, M.W.; NORTON, W.; ATHERTOLTT.B. Protozoa in open reservoirs. **Journal of the American Water Works Association** 89(9): 84-96, 1997.
- LEVINE, W.C.; STEPHENSON, W.T.; CRAUN, G.F. Waterborne disease outbreaks, 1986-1988. **MMWR** 39(SS-1): 1-9, 1990.
- LEVY, D.A.; BENS, M.S.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; HERWALDT, B.L. Surveillance for waterborne disease outbreaks – United States, 1995-1996. **MMWR**, 47(SS-5): 1-34, 1998.

- LINDQUIST, A.H.D.; DUFOUR A.P.; WYMER, L.J.; SCHAEFER, F.W. Criteria for evaluation of proposed protozoan detection methods. **Journal of Microbiology Methods** 37:33-43, 1999.
- MADORE, M.S.; ROSE, J.B.; GERBA, C.P.; ARROWD, M.J.; STERLING, C.R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. **Journal Parasitology**, 73 (4):702-5, 1987.
- MANUAL DE SANEAMENTO, FUNASA, BRASIL (<http://www.funasa.gov.br>)
- MCCUIN, R.M.; CLANCY, J.L. Modifications to United States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied Environmental Microbiology**, 69:267-274, 2003.
- MEDEMA, G.J.; BAHAR, M.; SCHETS, F.M. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, fecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms; **Water Science Technology** 35(11-12): 249-52, 1997.
- MEDEMA, G.J.; SCHETS, F.M.; KETELAARS, H.; BOSCHMAN, G. Improved detection and vital staining of *Cryptosporidium* and *Giardia* with flow cytometry. **Water Science Technology** 38(12): 61-65, 1998.
- MEDEMA, G.J.; SCHIJVEN, J.F. Modeling the sewage discharge and dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. **Water Research** 35: 4307-4316, 2001.
- MEINHARDT, P.L.; CASEMORE, D.P.; MILLER, K.B. Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. **Epidemiology Rev** 18(2): 118-136, 1996.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL - **PORTARIA 1469**- publicada em 29/12/2000.
- MOORE, A.C.; HERWALDT, B.L.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; HIGHSMITH, A.K.; JURANEK, D.D. Waterborne disease in the United States, 1991 and 1992. **Journal of the American Water Works Association** 86(2): 87-89, 1994.
- MULLER, A.P.B. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo. São Paulo, **Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da USP**, 1999.
- MUSIAL, C.E.; ARROWOOD, M.J.; STERLING, G.R.; GERBA, C.P. Detection of *Cryptosporidium* in water using Polypropylene Cartridge Filters. **Applied Environmental Microbiology** 53: 687, 1987.

- NIEMINSKI, E.C.; ONGERTH, J.E. Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by conventional treatment and direct filtration. **Journal of the American Water Works Association**, 87 : 96-106, 1995.
- OLIVEIRA, P.V.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R.M.B. Avaliação da presença de protozoários patogênicos, *Giardia* spp e *Cryptosporidium* spp, no rio Atibaia, Bacia do Piraciaba, Campinas, São Paulo. **XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia**, P0341 – 268, 2003.
- ONG, C.S.L.; MOOREHEAD, W.; ROSS, A.; ISSAC-RENTON, J. Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. In two adjacent watersheds. **Applied Environmental Microbiology**, 62:2798-2805, 1996.
- ONG, C.S.L.; EISLER, D.L.; ALIKHANI, A.; FUNG, V.W.K.; TOMBLIN, J.; BOWNIE, W.R.; ISSAC-RENTON, J.L. Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infection with a corvine genotype. **Emerging Infectious Diseases**, 8:263-268, 2002.
- ONGERTH, J.E.; STIBBS, H.H. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in River Water. **Applied Environmental Microbiology** 53:672, 676, 1987.
- PATANIA, N.; JACANGELO, J.G.; CUMMINGS, L.; WILCZAK, A. Removal of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and particles by granular media filtration in pilot studies. **AWWA Annual Conference**, Anaheim, CA, Am. Water Works Assoc., Denver, CO, 1995.
- PAYMENT, P.; PLANTE, R.; CEJKA, P. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocyst at a large wastewater primary treatment facility. **Canadian Journal Microbiology**, 47:188-193, 2001.
- PEDRAZA-DIAS, S.; AMAR, C.; MCLAUHLIN, J. The identification and characterization of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. **FEMS Microbiology Letters**, 189:189-194, 2000.
- PEDRO, M.L.G; GERMANO, M.I.S. A água: Um problema de Segurança Nacional. **Revista Higiene Alimentar**, 15: 15-18, 2001.
- PICKERING, L.K. & ENGELKIRK, P.G. *Giardia lamblia*. **Pediatric Clinics of North America**, 35:565-577, 1998.
- RÉ, A.L. Qualidade microbiológica e parasitológica de águas de consumo humano do município de Araras – SP, com ênfase na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia lamblia*. São Paulo, **Dissertação de Mestrado – Universidade Mackenzie**, 1999.
- RELATÓRIOS AMBIENTAIS - **QUALIDADE DAS ÁGUAS INTERIORES DO ESTADO DE SÃO PAULO**, 2000 - volumes 1 e 2.

- RODGERS, M.R.; FLANIGAN, D.J.; AND JAKUBOWSKI, W. Identification of Algae which interfere with the detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts and a Method for alleviating this Interference. **Applied Environmental Microbiology**, 61:3759-3763, 1995.
- ROSE, J.B.; DARBIN, H.; AND GERBA, C.P. Correlations of the protozoa, *Cryptosporidium* and *Giardia*, with water quality variables in watershed. **Water Science Technology**, 20:271-276, 1988.
- ROSE, J.B.; HAAS, C.N.; REGLI, S. Risk assessment and control of waterborne giardiasis. **American Journal of Public Health**, 81(6):709-713, 1991.
- ROSE, J.B.; DICKSON, L.J.; FARRAH, S.; CARNAHAN, R.P. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. **Water Research**, 30:2785-2797, 1996.
- ROSE, J.B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. **Public Health**, 18:135-161, 1997.
- ROSE, J.B.; HUFFMAN, D.E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS Microbiology Reviews**, 26:113-123, 2002.
- ROUQUET, V.; HOMER, F.; BRIGNON, J.M.; BONNE, P.; CAVARD, J. Source and occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Paris rivers. **Water Science Technology**, 41:79-86, 2001.
- SANTOS, L.U.; BONATTI, T.R.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R.M.B. Detection of *Giardia* spp. Cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples from ETE Santa Rosa, Campinas, Brasil by ether clarification technique. Trabalho submetido a: **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2003.
- SIMMONS, O.D.; SOBSEY, M.D.; HEANEY, C.D.; SCHAEFER, F.W.; FRANCY, D.S.; NALLY, R.A. Evaluation of USEPA method 1622 for detection of *Cryptosporidium* oocysts in stream waters. **Journal of the American Water Works Association**, 93:78-87, 2001.
- SLIFKO, T.R.; FRIEDMAN, D.; ROSE, J.B.; JABUKOWSKI, W. An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. **Applied Environmental Microbiology**, 63:3669-3675, 1997.
- SMITH, H.V. Detection of parasites in the environment. **Parasitology Today**, 117:S113-S141, 1998.
- SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Waterborne cryptosporidiosis: current status. **Parasitology Today**, 14:14-22, 1998.

- SMITH, H.V.; CMAPBELL, C.A.; PATON, C.A.; NICHOLS, A.B. Significance of Enhanced Morphological Detection of *Cryptosporidium* sp oocysts in Water Concentrates Determined by using 4',6'-Diamidino-2-Phenylindole and Immunofluorescence Microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, 68:5198-5201, 2002.
- SOLO-GABRIELE, H.; NEUMEISTER, S. US outbreaks of cryptosporidiosis. **Journal of the American Water Works Association**, 88: 76-86, 1996.
- SOLO-GABRIELE, H.; AGER, JR.; LINDO, A.L.; FITZGERALD, J. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water supplies of San Pedro Sula, Honduras. **Revista Panamerica de Salud Publica**, 4:n°6, 1998.
- STATES, S.; STADTERMAN, K.; AMMON, L.; VOGEL, P.; BALDIZAR, J.; WRIGHT, D.; CONLEY, L.; SYKORA, J. Protozoa in river water: sources, occurrence and treatment. **Journal of the American Water Works Association**, 89:74-83, 1997.
- STATES S.; TOMKO, RICHARD.; SCHEURING, M.; CASSON, L. Enhanced coagulation and removal of *Cryptosporidium*. **Journal of the American Water Works Association**, 94:67-77, 2002.
- STINEAR, T.; MATUSAN, A.; HINES, K.; SANDERY, M. Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in environmental water concentrates by reverse transcriptase PCR. **Applied Environmental Microbiology**, 62:3385-3390, 1996.
- THOMPSON, R.C.A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal for Parasitology**, 30:1259-1267, 2000.
- TZÍPORI, S. & WARD, H. Cryptosporidiosis biology, pathogenesis and diseases. **Microbes and Infection**, 4 : 1047 – 1058, 2002.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Ground Water and Drinking Water. **ICR Protozoan Method for Detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Water by Fluorescent Antibody Procedure**. EPA/814-95-003, 1995.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **National Primary Drinking Water Regulations: Monitoring Requirements for Public Drinking Water Supplies; Final Rule**. 40 CFR Part 141. May 14, 1996.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Water. Washington DC. **Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA**. EPA-821-R-98-010, 1998b.

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

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-01-025, 1999.

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. **Journal Applied Bacteriological**, 75:82-86, 1993.

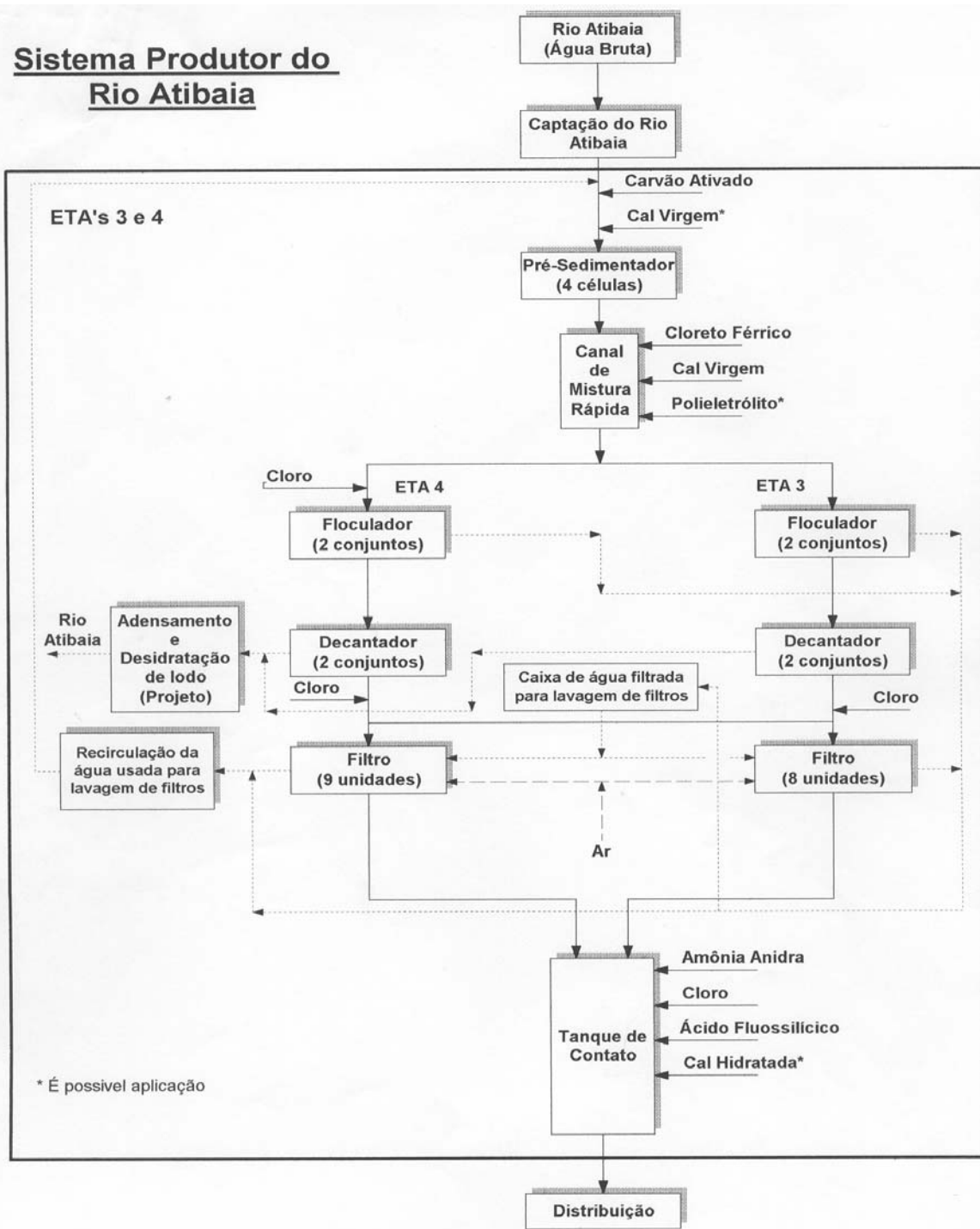
WALLIS, P.M.; ERLANDSEN, S.L.; ISSAC-RENTON, J.L.; OLSON, M.E.; ROBERTSON, W.J.; VAN KEULEN, H. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. Isolated from drinking water in Canada. **Applied Environmental Microbiology**, 62:2789-2797, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization Report on Infectious Diseases. Removing obstacles to healthy development.** 1999. Available from < [URL:http://www.who.int/infectious-disease-report/pages/texonly.html](http://www.who.int/infectious-disease-report/pages/texonly.html)>.

YALE, P. E STANFIELD, G. *Cryptosporidium* during a simulated outbreak. **Journal of the Amercian Water Works Association**, 92:105-116, 2000.

ANEXOS

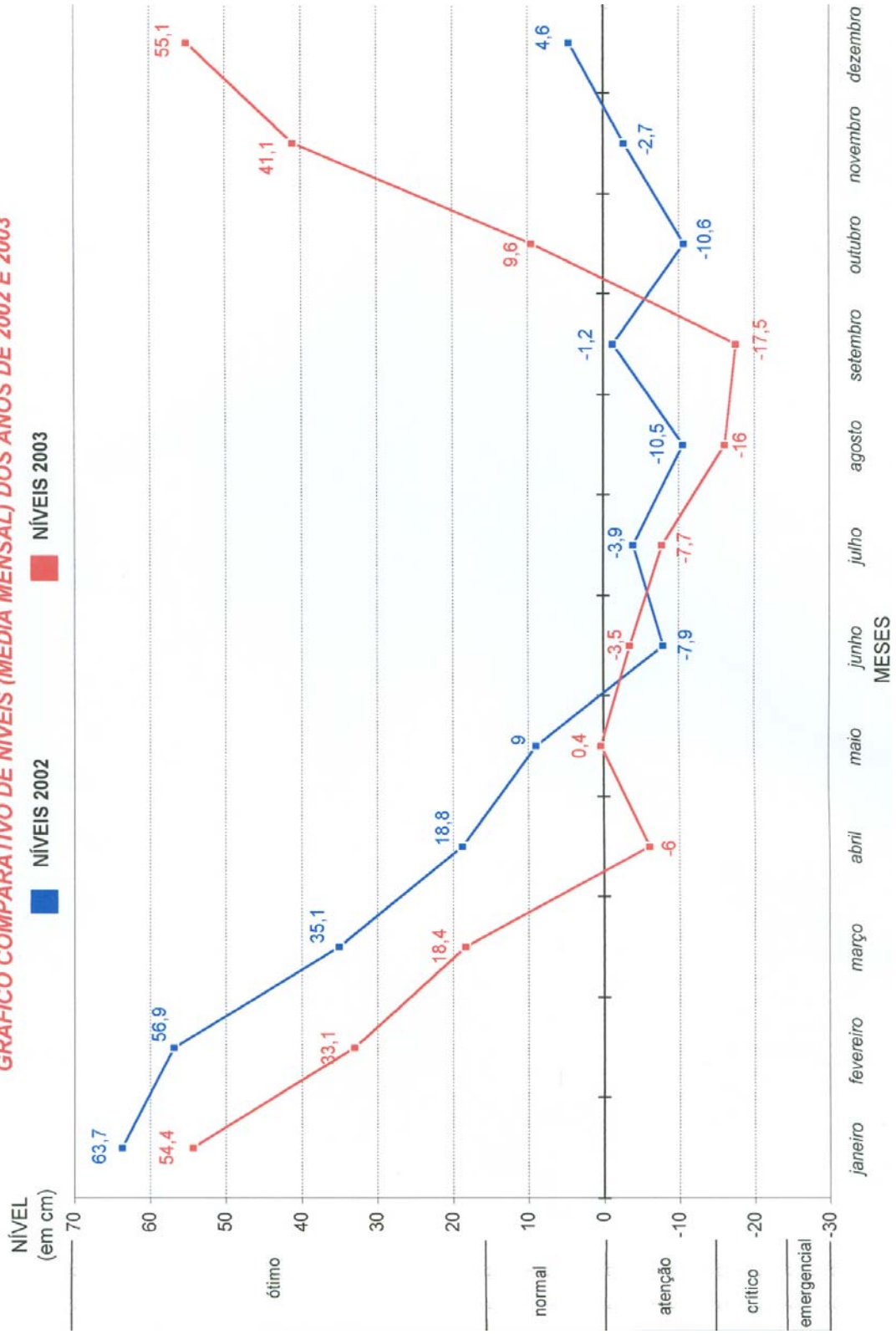
Sistema Produtor do Rio Atibaia



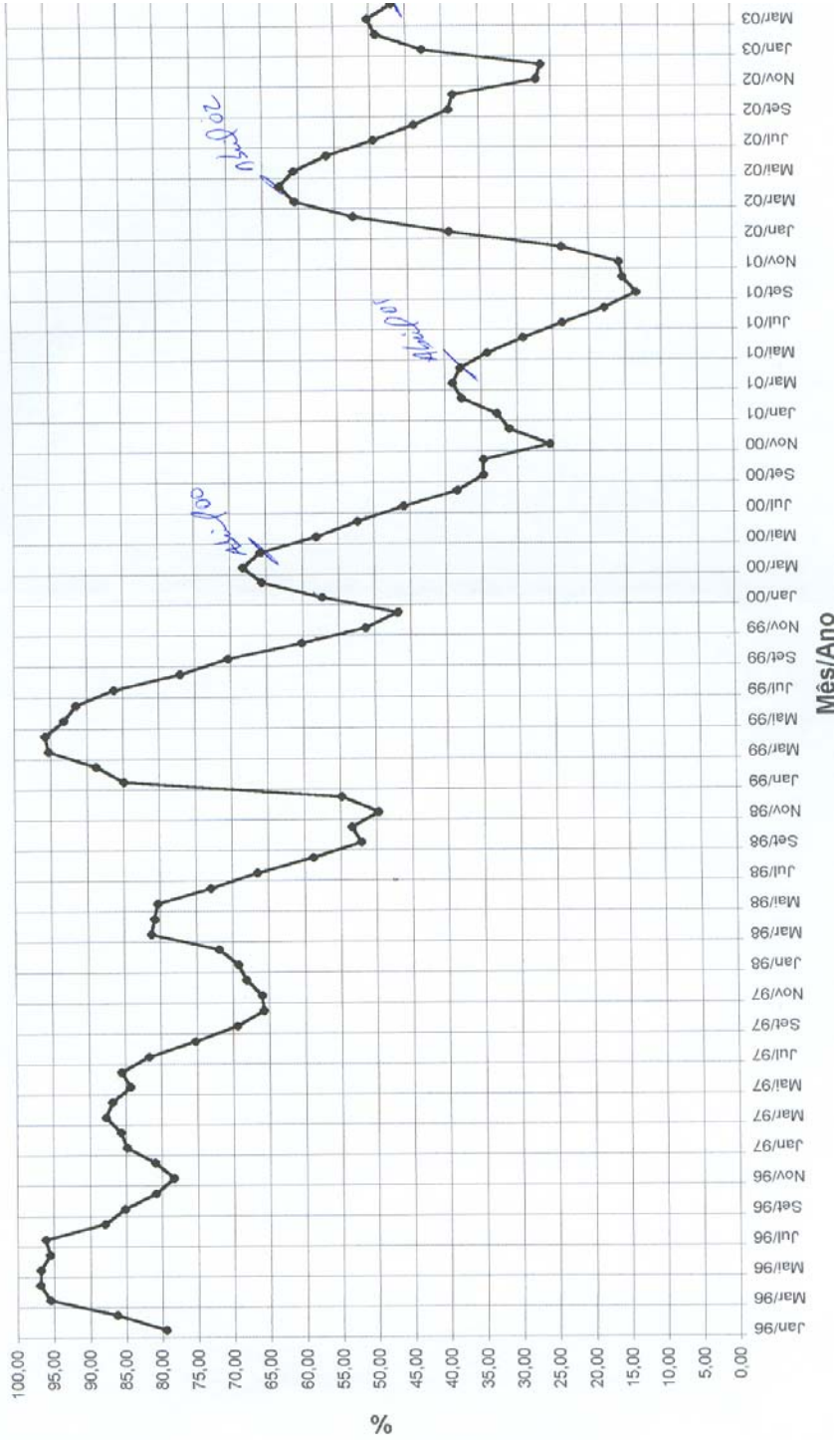


SANASA - CAMPINAS
CAPTAÇÃO E ADUÇÃO DO RIO ATIBAIA - TAC

GRÁFICO COMPARATIVO DE NÍVEIS (MÉDIA MENSAL) DOS ANOS DE 2002 E 2003



VOLUME DO RESERVATÓRIO CANTAREIRA (%) LEITURA DO ÚLTIMO DIA DO MÊS



CENTRO DE ENSINO E PESQUISA EM AGRICULTURA - CEPAGRI/UNICAMP

POSTO METEOROLÓGICO - FEAGRI/UNICAMP
PRECIPITAÇÃO (mm) - 2002

DIA	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0	6,4	4,8	0,4	0,0	0,8
2	3,0	18,4	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0	25,8	0,0	2,5	0,0	5,6
3	0,3	0,0	0,0	0,3	4,8	0,0	0,0	19,6	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	16,2	1,3	12,1	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,0	0,3	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	24,0	35,0
6	5,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6
7	0,0	12,6	0,0	18,8	7,3	0,0	0,0	4,0	8,0	0,0	0,0	0,0
8	4,4	16,0	1,6	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9	31,8	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	7,6	11,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11	0,0	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,0	1,2
12	4,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,4	2,8
13	52,3	30,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,2	0,0
14	19,8	1,7	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,6	19,9
15	2,8	3,0	4,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	7,1	0,0
16	7,4	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,3	18,4
17	0,0	4,6	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	19,3	0,8
18	0,0	0,0	34,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,6	2,4
19	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,6	0,0
20	80,2	0,0	1,0	0,0	14,7	0,0	0,0	0,0	1,0	8,8	0,0	5,0
21	0,0	18,8	6,4	0,0	20,2	0,0	0,0	0,0	29,2	0,0	0,0	1,8
22	0,0	21,0	0,0	0,0	4,8	0,0	0,2	0,0	0,0	6,4	0,0	69,9
23	8,4	4,9	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	9,0	13,5	8,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5
25	41,2	0,0	72,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,4
26	8,4	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,8	12,4	4,8
27	0,3	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	6,6	0,0
28	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
29	21,0	xx	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	26,2	0,0
30	0,0	xx	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,0	0,0	33,0	19,8	0,0
31	0,2	xx	0,0	xx	0,0	XX	0,0	0,0	xx	2,2	xx	0,0
TOTAL	312,4	163,4	152,8	29,0	73,8	0,0	6,8	71,0	49,0	63,1	189,1	181,9
MÁX.	80,2	30,7	72,0	18,8	20,2	0,0	3,6	25,8	29,2	33,0	26,2	69,9
MÍN.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

OBS.: Os dados constantes nesta tabela representam normalmente uma área de no máximo 100 metros de raio, nem sempre, portanto, uma medição direta representa o fenômeno ocorrido em determinada área afastada do Posto.

No verão ocorrem as chuvas locais de final de tarde; o volume de chuvas e a quantidade de dias chuvosos variam conforme a região do Estado.

OBS.: Período de Estiagem Agrícola:

08/04 a 03/05 = 26 dias

23/05 a 31/07 = 70 dias

ANEXO 4

CENTRO DE ENSINO E PESQUISA EM AGRICULTURA - CEPAGRI/UNICAMP

POSTO METEOROLÓGICO -FEAGRI/UNICAMP
TEMPERATURA MÍNIMA DIÁRIA - ANO DE 2002

DIA	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1	18,6	20,8	18,0	17,3	19,8	14,2	13,2	17,2	13,8	20,0	18,8	19,8
2	19,0	17,2	19,8	18,1	16,8	13,2	15,2	15,6	8,4	16,6	17,8	21,4
3	19,6	15,8	20,2	18,9	18,4	13,8	15,4	15,2	5,6	15,0	16,4	21,6
4	19,2	16,0	19,4	17,0	17,2	13,6	14,6	14,2	11,8	20,0	20,0	22,2
5	21,2	17,0	18,0	xx	18,0	13,2	15,0	15,0	12,6	18,0	19,2	21,0
6	20,4	18,8	19,8	16,3	19,2	13,8	14,2	17,6	18,0	19,8	16,2	20,8
7	19,8	19,6	20,4	16,9	17,4	13,0	15,0	15,8	17,2	21,0	13,6	21,6
8	20,5	21,0	20,6	14,7	17,2	12,8	8,2	18,0	12,8	20,4	14,2	20,8
9	18,8	20,2	20,8	16,1	16,4	14,4	7,8	18,4	14,6	21,2	15,0	22,4
10	18,8	17,8	21,0	17,5	17,0	16,4	9,0	16,8	16,4	21,2	20,0	20,4
11	20,0	18,4	21,2	17,1	18,0	17,4	10,2	14,4	17,2	21,4	20,8	20,0
12	20,2	19,8	19,8	16,7	18,2	15,0	14,0	13,8	16,2	22,2	20,0	19,2
13	20,2	20,0	19,8	18,0	18,4	15,2	14,2	15,4	20,0	20,8	18,2	19,2
14	19,8	20,2	20,4	19,2	17,0	14,2	10,2	16,2	18,8	21,0	17,4	19,4
15	20,0	17,2	20,0	19,5	17,0	17,2	9,2	17,8	16,0	21,4	18,8	19,8
16	18,0	20,8	20,8	19,0	15,6	16,8	8,6	16,9	17,4	19,4	18,2	20,0
17	14,0	19,8	21,2	17,8	16,0	15,8	8,2	16,0	15,8	22,0	18,4	19,2
18	16,0	18,0	21,8	17,8	17,0	12,0	9,6	16,6	18,2	20,4	20,4	19,8
19	17,8	18,6	21,4	20,8	16,4	13,0	12,4	16,4	18,6	19,8	19,2	18,0
20	19,8	19,4	21,6	16,7	15,0	15,8	13,8	16,6	20,0	20,0	20,2	21,0
21	20,4	20,6	21,6	19,7	15,8	13,0	15,2	15,4	12,3	21,8	21,8	21,4
22	20,4	21,0	18,4	19,9	14,0	15,6	15,4	16,2	12,1	19,8	21,2	20,8
23	20,6	21,2	19,4	17,9	15,4	14,8	16,2	17,4	14,2	16,4	20,0	22,0
24	20,4	21,0	20,2	16,2	13,6	12,8	14,2	17,8	16,4	17,4	21,6	21,6
25	19,8	19,0	20,4	15,8	13,0	14,4	11,2	17,0	13,0	21,0	22,4	20,2
26	20,2	18,2	18,8	15,6	12,8	14,6	12,2	16,4	13,6	19,8	21,0	19,0
27	20,6	20,8	19,2	14,8	10,6	14,8	12,8	14,8	14,4	18,0	20,8	18,8
28	20,8	21,2	20,0	18,3	12,2	15,2	13,8	15,0	15,8	18,6	21,6	18,2
29	20,0	xx	21,0	17,4	13,2	12,2	9,8	16,0	16,4	19,2	20,6	20,0
30	21,6	xx	19,5	18,3	18,8	12,4	11,6	16,4	17,8	20,6	20,0	20,0
31	22,0	xx	19,2	xx	13,8	XX	15,2	15,2	xx	19,4	xx	19,6
MÉDIA	19,6	19,3	20,1	17,6	16,1	14,4	12,4	16,2	15,2	19,8	19,1	20,3
MÁX.	22,0	21,2	21,8	20,8	19,8	17,4	16,2	18,4	20,0	22,2	22,4	22,4
MÍN	14,0	15,8	18,0	14,7	10,6	12,0	7,8	13,8	5,6	15,0	13,6	18,0

ANEXO 5