

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

**OCORRÊNCIA DE CISTOS DE *Giardia* spp. E OOCISTOS DE *Cryptosporidium*
spp. NO RIO ATIBAIA, BACIA DO RIO PIRACICABA, CAMPINAS, SÃO
PAULO.**

PAULA VILMA DE OLIVEIRA

Orientadora: Prof^a. Dra. Regina Maura Bueno Franco

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
PAULA VILMA DE OLIVEIRA
Regina Maura Franco
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese de Mestrado apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título
de Mestre em Parasitologia.

CAMPINAS, SP
2005

UNIDADE	IB 22242
Nº CHAMADA	UNICAMP
	0640
V	EX
TOMBO BC	63873
PROC.	16.0008605
C	☐
D	☒
PREÇO	11.00
DATA	13/05/05
Nº CPD	801131225

ii

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

0143

Oliveira, Paula Vilma de

Ocorrência de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* no rio Atibaia, bacia do rio Piracicaba, Campinas, São Paulo. / Paula Vilma de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Regina Maura Bueno Franco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. *Giardia*. 2. *Cryptosporidium*. 3. Rio Atibaia (SP). 4. Rios - Brasil.
5. Águas superficiais. 6. Água – Doenças. I. Regina Maura Bueno Franco. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

Campinas, 15 de fevereiro de 2005.

Banca Examinadora

Profª Dra.

Regina Maura Bueno Franco


Assinatura

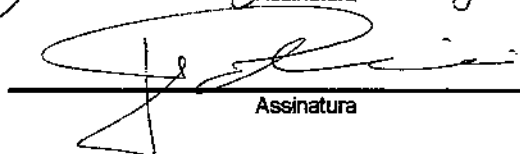
Profª Dra.

Ana Maria Aparecida Guaraldo


Assinatura

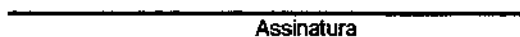
Prof. Dr.

José Euclides Stipp Patemiani


Assinatura

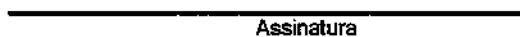
Prof. Dr.

* Nelson da Silva Cordeiro


Assinatura

Prof. Dr.

Ricardo de Lima Isaac


Assinatura

Dedico este trabalho à minha mãe que sempre
me deu apoio, carinho e compreensão durante
a elaboração deste trabalho,
principalmente nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos que colaboraram para a elaboração deste trabalho, especialmente:

Ao Instituto de Biologia da UNICAMP;

A Professora e orientadora Dra. Regina Maura Bueno Franco pela confiança, determinação e paciência;

A SANASA pela colaboração na execução do trabalho;

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo;

Ao meu colega e colaborador Romeu Cantusio Neto;

Ao Sr. José Luis Llanos Carrillo, pelo auxílio na análise estatística;

Aos membros da pré-banca pelas sugestões para aperfeiçoar este trabalho;

A todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Parasitologia que sempre me auxiliaram quando necessário;

Aos meus colegas e amigos do laboratório pelo apoio e companheirismo;

A todos os meus amigos por todo o carinho, alegria, atenção e incentivo;

A Wilma Alves de Oliveira, minha mãe, por acreditar no meu trabalho e me apoiar incondicionalmente em todos os momentos.

E, finalmente, a Deus e Nossa Senhora Aparecida por permitirem mais esta conquista.

“...Às vezes oiço passar o vento,
e acho que só para ouvir o vento passar vale a
pena ter nascido...”

Alberto Caeiro – A Espantosa Realidade das
Cousas

RESUMO

Giardia spp. e *Cryptosporidium* spp. estão amplamente dispersos no ambiente aquático e foram responsáveis por diversos surtos de giardiose e criptosporidiose por veiculação hídrica em vários países. A presença destes patógenos em água utilizada para consumo humano é um fator de risco para aquisição destas parasitoses porque cistos e oocistos são resistentes aos processos de tratamento e às condições ambientais. Deste modo, a preocupação em relação à contaminação das fontes de água para uso humano por estes protozoários é crescente. No Brasil, há registros da ocorrência de ambos organismos em água superficial e subterrânea e em esgoto bruto e tratado. Atualmente, há uma recomendação oficial para a implantação da pesquisa de cistos e oocistos em água tratada. Assim, é necessário ter conhecimento sobre a frequência e a distribuição destes parasitos nos mananciais. Os objetivos do presente estudo foram: i) verificar a ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água bruta superficial do Rio Atibaia (Campinas, São Paulo) utilizando a técnica de filtração em membrana (47 mm diâmetro; 3 µm de porosidade nominal); ii) avaliar a influência do desaguamento do Ribeirão Pinheiros na qualidade da água do Rio Atibaia mediante a comparação e a correlação entre parâmetros microbiológicos, físicos, pluviométricos e concentração de cistos e oocistos em dois pontos: à montante (A1) e à jusante (A2) do desaguamento do Ribeirão Pinheiros; e iii) verificar a ocorrência de variação sazonal destes protozoários na água superficial do Rio Atibaia. De março de 2002 a abril de 2003, 50 amostras de água foram analisadas. No ponto A1, cistos de *Giardia* foram detectados em 52,0% das amostras (concentração = 25,12 cistos/l), enquanto no ponto A2, a positividade foi de 76,0% (64,16 cistos/l). Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados somente no ponto A2, em 0,04% das amostras (0,8 oocistos/l). Houve diferença significativa na concentração de cistos entre os pontos A1 e A2 ($p = 0,011$) e correlação entre a pluviosidade e os parâmetros: concentração de cistos de *Giardia* ($r = 0,611$); coliformes totais ($r = 0,467$) e fecais ($r = 0,467$) no ponto A2. Em ambos os pontos, não foi encontrada correlação entre concentração de cistos de *Giardia* e as variáveis: coliformes totais

(A1: $r = -0,276$; A2: $r = -0,201$), fecais (A1: $r = -0,187$; A2: $r = -0,201$) e turbidez (A1: $r = -0,252$; A2: $r = -0,055$). Dentre estes parâmetros, apenas a turbidez teve variação entre verão/inverno e verão/outono ($p = 0,06$). A técnica de filtração em membrana apresentou uma eficiência de recuperação de 72,2% para cistos de *Giardia* e de 65,1% para oocistos de *Cryptosporidium*. Os resultados obtidos neste estudo são relevantes porque o Rio Atibaia é o manancial que abastece a cidade de Campinas e outros municípios da região e o conhecimento da epidemiologia ambiental destes protozoários é importante do ponto de vista da Saúde Pública e também das companhias de tratamento de água.

Palavras—chave: *Giardia*, *Cryptosporidium*, Rio Atibaia, Brasil, águas superficiais, doenças de veiculação hídrica.

ABSTRACT

Giardia spp. and *Cryptosporidium* spp. are widely dispersed in the aquatic environment and are responsible for several waterborne outbreaks of giardiasis and cryptosporidiosis in many countries. The occurrence of these pathogens in drinking water is a risk factor for human infection because of the resistance of cyst and oocyst to water treatment processes and to the environment. Nowadays, there is an increasing concern about drinking water contamination by these protozoans. In Brazil, the presence of both organisms was registered in groundwater and superficial water and in raw and treated sewage. Currently, there is an official recommendation for monitoring the presence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water samples; thus a federal decree aims to establish researches for (oo)cysts detection in treated water. The knowledge about the frequency and distribution of these protozoan parasites in water sources is necessary to establish policies on public health. The aims of the present study are: *i)* to verify the occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Atibaia River's (Campinas City, São Paulo State) superficial raw water samples using a membrane filtration method (47 mm diameter; 3 µm of nominal porosity; *ii)* to evaluate the influence of the discharge of Pinheiros Stream on the water quality of the Atibaia River by the relationship among microbiological and physical parameters, rainfall and oocysts levels in two points: upstream (A1) and downstream (A2) of Pinheiros Stream; and *iii)* to verify the seasonal variation of these protozoa occurrence in the superficial water of Atibaia River. From March 2002 to April 2003, 50 water samples were collected. In point A1, *Giardia* cysts

were detected in 52,0% of the samples (concentration = 25,12 cysts/l) while in point A2 the positivity for this parasite was 76,0% (concentration = 64,16 cysts/l). *Cryptosporidium* oocysts were detected only in A2 point, in 0,04% of the samples (concentration = 0,8 oocysts/l). There was a significant difference for cysts concentration between A1 and A2 points ($p = 0,011$) and among rainfall and the parameters: cyst concentration ($r = 0,611$); total ($r = 0,467$) and fecal coliforms ($r = 0,467$) in A2 point. In both points, it was not found a correlation among cyst concentration and the following parameters: total coliforms (A1: $r = -0,276$; A2: $r = -0,201$), fecal coliforms (A1: $r = -0,187$; A2: $r = -0,201$) and turbidity (A1: $r = -0,252$; A2: $r = -0,055$). The turbidity showed a variation between summer and winter periods as well as summer and fall periods ($p = 0,06$). The membrane filtration technique attained recovery efficiency rates of 72,2% for *Giardia* cysts and 65,1% for *Cryptosporidium* oocysts. The data obtained in this study are relevant because the Atibaia River is the major water source found in Campinas and other cities in the region. Thus, the knowledge about the environmental epidemiology of these protozoa is of very important to policies on to the Public Health and to the drinking water industry.

Key words: *Giardia*, *Cryptosporidium*, Atibaia River, Brazil, surface water, waterborne diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Área de Estudo, Rio Atibaia, Ribeirão Pinheiros e os pontos de coleta: A1 e A2. FONTE: A cidade de Campinas e seus recursos hídricos (Folheto informativo: SANASA, 2005).	39
Figura 2: Junção das águas do Ribeirão Pinheiros (a) com o Rio Atibaia (b).	40
Figura 3: Rio Atibaia, Campinas. Ponte do Padre Abel: ponto A1.	40
Figura 4: Rio Atibaia, Campinas. Ponto da Captação da Estação de Tratamento de Água da SANASA: ponto A2.	41
Figura 5: Gráfico da concentração de cistos de <i>Giardia</i> spp. na água bruta superficial do Rio Atibaia, Campinas, Brasil (Março de 2002 a abril de 2003).	52
Figura 6: Cistos de <i>Giardia</i> spp. em amostra da água bruta do Rio Atibaia, ponto A2. IFA. Aumento 400x.	58
Figura 7: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostra da água bruta do Rio Atibaia, ponto A2. IFA. Aumento 400x.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Eficiência de recuperação do método de filtração em membrana.	47
Tabela 2: Concentração de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. na água bruta superficial do rio Atibaia – Pontos A1 e A2, Campinas, SP, Brasil (Março de 2002 a Abril de 2003).	48
Tabela 3: Parâmetros físicos, químicos e microbiológicos e volume do sedimento da água bruta superficial do rio Atibaia no ponto A1, Campinas, SP, Brasil (Março de 2002 a Abril de 2003).	49
Tabela 4: Parâmetros físicos, químicos e microbiológicos e volume do sedimento da água bruta superficial do rio Atibaia no ponto A2, Campinas, SP, Brasil (Março de 2002 a Abril de 2003).	50
Tabela 5: Correlação entre a concentração de cistos de <i>Giardia</i> spp., turbidez, coliformes fecais, coliformes totais e pluviosidade nos pontos A1 e A2 do Rio Atibaia nos pontos A1 e A2, Campinas, SP, Brasil (Março de 2002 a abril de 2003).	53

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1. As características de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp.....	06
2.2. Doenças de Veiculação Hídrica: Os Surtos de Giardiose e de Criptosporidiose....	09
2.2.1. Giardiose.....	11
2.2.2. Criptosporidiose.....	12
2.2.3. Considerações gerais.....	16
2.3. A vigilância de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. em águas destinadas ao consumo humano.....	17
2.4. Os métodos para avaliação da presença de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras ambientais.....	18
2.5. Fatores determinantes da ocorrência de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. em água bruta superficial.....	28
2.6. Ocorrência de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. em água bruta superficial.....	31
2.7. Ocorrência de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. em água bruta superficial no Brasil.....	34
3. OBJETIVOS.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. Área de Amostragem.....	38
4.2. Preparo do Material.....	41
4.3. Obtenção das amostras.....	41
4.4. Exame Parasitológico da Água Bruta Superficial.....	42
4.4.1. Filtração.....	42
4.4.2. Procedimentos de Eluição e Concentração.....	42
4.4.3. Reação de Imunofluorescência Direta – IFA.....	42
4.4.4. Visualização.....	43
4.5. Critérios de Positividade.....	44

4.6. Equação da Concentração de Cistos e Oocistos.....	44
4.7. Experimentos Controle.....	45
4.8. Equação da Eficiência de Recuperação do Método.....	45
4.9. Exame Microbiológico das Amostras de Água Bruta.....	46
4.10. Dados Climáticos.....	46
4.11. Análise Estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Experimentos-controle.....	47
5.2. Amostras de Água Bruta do Rio Atibaia.....	47
5.3. Análise Estatística.....	51
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO.....	61
8. REFERÊNCIAS.....	63
9. ANEXOS.....	77
9.1. Anexo A.....	78
9.2. Anexo B.....	83
9.3. Anexo C.....	87

1. INTRODUÇÃO GERAL

A água é a substância mais abundante na Terra, cobrindo 77,0% da superfície do planeta sendo que a maior parte da água existente é salgada o que equivale a 97,5% do total; o restante (2,5%) é de água doce que está distribuída da seguinte maneira: 68,9% correspondem às calotas polares e às geleiras; 29,9% às águas subterrâneas; 0,3% aos rios e lagos e 0,9% a outros reservatórios (REBOUÇAS, 2002).

As águas interiores (rios, lagos, represas, aquíferos subterrâneos, açudes) não estão localizadas eqüitativamente ao redor do globo e a situação da disponibilidade dos recursos hídricos pode ser definida em: estresse hídrico (menos de 1.000 m³/hab/ano), regular (entre 1.000 e 2.000 m³/hab/ano), suficiente (entre 2.000 e 10.000 m³/hab/ano), rica (entre 10.000 e 100.000 m³/hab/ano) e muito rica (maior que 100.000m³/hab/ano). A estimativa para 2025 é a de que aumente o número de países que exibirão uma situação hídrica de estresse ainda que, atualmente, esta seja confortável (REBOUÇAS, 2002).

Os problemas de escassez de água são atribuídos ao crescimento elevado das demandas que incluem intensificação do consumo nas indústrias, na agricultura e na urbanização desordenada que concorrem com os usos básicos: higiene, preparo de alimentos e dessedentação (CARMO, 2002; REBOUÇAS, 2002).

Historicamente, o desenvolvimento das atividades antrópicas esteve estreitamente ligado à disponibilidade hídrica e hoje este recurso ainda impõe limites tanto pela quantidade como pela qualidade. A oferta de água é um fator fundamental para a manutenção de ecossistemas naturais e produtores (alimentos); no entanto, a remoção da cobertura vegetal e, conseqüentemente, a erosão provocada pela agricultura intensiva, somada às atividades industriais e à urbanização, degrada a qualidade dos recursos hídricos afetando a quantidade efetiva de água disponível para usos múltiplos (SALATI et al., 2002).

Em regiões densamente povoadas, o reuso da água pode ser uma alternativa interessante para viabilizar a demanda por usos secundários como refrigeração industrial, recarga de aquíferos subterrâneos, irrigação de praças,

parques, jardins e alguns tipos de agricultura. Esta prática já ocorre em alguns países como Israel que utiliza 70,0% dos efluentes tratados para irrigar lavouras, Estados Unidos e Japão (SALATI et al., 2002).

O Brasil destaca-se pela grande disponibilidade de água doce que representa 53,0% dos recursos hídricos da América do Sul e 12,0% do total mundial, além de possuir reservas subterrâneas como a do Aquífero Guarani, considerado o maior reservatório natural e subterrâneo da Terra, com 1,2 milhão de quilômetros quadrados de extensão e 48.000 m³ de água armazenada estimada. Entretanto, a distribuição da água em território nacional não é equitativa, existindo diferenças entre as unidades hidrográficas e a sua densidade populacional. As Bacias do Amazonas e do Tocantins abrigam uma baixa densidade de população, na faixa de 2 a 5 habitantes/km² e equivalem a 78,0% da produção hídrica nacional; por outro lado, a Bacia do Rio Paraná produz 6,0% deste montante e abriga, em média, 53 habitantes/km² (REBOUÇAS, 2002).

No entanto, o país não está livre de problemas relacionados à escassez e à qualidade das águas devido à degradação ambiental e à expansão urbana e industrial não planejada que tiveram início na década de 50 e que persistem até os dias atuais prejudicando a oferta e a distribuição de água (REBOUÇAS, 2002; VASCONCELOS, 2002).

As limitações impostas pela baixa qualidade da água atingem as cidades de médio e grande porte como as regiões metropolitanas de São Paulo (RMSP), de Campinas, do Rio de Janeiro e outras capitais nas quais a quantidade de recursos hídricos disponíveis para uso urbano e industrial está diminuindo por causa da poluição, tendo reflexos negativos na economia e na saúde da população (SALATI et al., 2002).

O déficit hídrico da RMSP é suprido pela importação de água da Bacia do Rio Piracicaba, Capivari e Jundiá que por sua vez, apresenta uma demanda crescente em virtude do aumento populacional e do desenvolvimento econômico que são incompatíveis com o volume disponível destes recursos, principalmente porque a qualidade de vários mananciais está comprometida (CARMO, 2002). A região desta bacia é a segunda maior do estado em concentração populacional e

tem como características a ocupação urbana e industrial intensas, além da produção agrícola bastante expressiva (CARMO, 2002).

A maior demanda de água é representada pelo uso doméstico (13,3 m³/s), seguido pelo industrial (12,5 m³/s) e pela irrigação (7,6 m³/s), além da utilização dos corpos d'água para carrear o esgoto produzido por essas atividades; esta situação tende a se agravar devido ao processo de expansão demográfica e econômica (CARMO, 2002).

De modo geral, em todo o Brasil, a poluição hídrica tem aumentado devido ao manejo não planejado das áreas de manancial; este fator associado à distribuição anual das chuvas e ao clima de cada região contribui significativamente para a contaminação orgânica e química da água (BRASIL, 1998).

O desaguamento de esgotos domésticos não tratados nos mananciais utilizados para abastecimento representa uma ameaça à saúde pública uma vez que a água torna-se um meio eficiente de transmissão de doenças, pois apresenta grande capacidade de dispersão, uso abrangente e consumo obrigatório (BRANCO, 2002).

Dados globais da Organização Mundial de Saúde estimam que 3,4 milhões de pessoas, principalmente crianças, morrem anualmente de enfermidades relacionadas à água, principalmente a diarreia; 2,4 bilhões não têm acesso ao saneamento básico e 1,1 bilhão não conta nem mesmo com melhoria das fontes de água. As doenças diarreicas associadas à falta de saneamento, à higiene precária e aos suprimentos inadequados de água matam 2,2 milhões de pessoas por ano; porém, a melhora destas condições poderia reduzir a incidência de diarreia em 26,0% e a mortalidade, em 65,0% (BRUNDTLAND, 2002).

No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, realizada em 2000 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 97,9% dos municípios brasileiros contavam com serviço de abastecimento de água que, no entanto, só cobria 63,9% dos domicílios e apresentava um desequilíbrio regional, sendo que no Sudeste as residências atendidas chegavam a 70,5% e no Norte e Nordeste, a 44,3% e 52,9%, respectivamente (IBGE, 2002).

Essas questões de saúde pública não são preocupações exclusivas de países pobres ou em desenvolvimento com graves problemas sanitários; as nações desenvolvidas também enfrentam problemas relacionados à ocorrência de surtos de doenças transmitidas pela água, apesar de possuírem bom padrão de abastecimento de água e tratamento de esgotos (CRAUN et al., 1998).

Os protozoários patogênicos de importância mais expressiva na transmissão hídrica são *Giardia duodenalis* (sinonímia *Giardia lamblia* e *Giardia intestinalis*) e *Cryptosporidium* spp. os quais apresentam distribuição mundial e causam distúrbios gastrointestinais no homem e nos animais (THOMPSON et al., 2000; FAYER et al., 2000).

Tanto *Giardia* spp. como *Cryptosporidium* spp. estão amplamente dispersos no ambiente aquático, presentes em rios, lagos, reservatórios, águas subterrâneas e marinhas; nas duas últimas décadas, estes patógenos causaram dezenas de surtos de gastroenterite relacionados à ingestão de água contaminada destinada ao consumo e à recreação, em vários países (CRAUN et al., 1998; FAYER et al., 2000; ORTEGA e ADAM, 1997; SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996).

No Brasil, as pesquisas sobre a ocorrência destes protozoários em águas superficiais começam a ser desenvolvidas; dados iniciais indicaram a presença de oocistos e cistos em águas superficiais, subterrâneas e em esgotos, especialmente em áreas metropolitanas e de alta concentração populacional (CANTUSIO NETO e FRANCO, 2004; FARIAS et al., 2002; FRANCO et al., 2001a; GAMBA et al., 2000; MULLER, 2000; DIAS JÚNIOR, 1999; NEWMAN et al., 1993).

O estudo conduzido por Franco et al. (2001a) demonstrou a presença de ambos os parasitos na água bruta superficial do rio Atibaia que pertence à Bacia do Rio Piracicaba e é responsável pelo abastecimento da Região Metropolitana de Campinas, além de fornecer água para o sistema Cantareira, sustentando parte do abastecimento da capital. A cidade de Campinas capta um volume de 4.500l/s, sendo que 92,0% deste destina-se ao consumo humano (CARMO, 2002; SANASA, 2004; SEMAE, 2002). Entretanto, estudos recentes indicam que o rio Atibaia está sujeito a um crescente número de impactos: recebimento de esgotos

domésticos e industriais diretos e indiretos por meio de seus afluentes como o Ribeirão Pinheiros; contaminação por insumos agrícolas e erosão (KRUSCHE et al., 2002; KRUSCHE et al., 1997; CHB-PCJ, 2000; SIVIERO, 2003).

A ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em águas brutas superficiais é, reconhecidamente, um fator de risco de contaminação dos suprimentos de água tratada antes da distribuição à população, sendo de extrema importância o monitoramento destes protozoários nos mananciais (ROEFER et al., 1996; ROSE, 1997).

Assim, a implantação de análises sobre a presença de cistos e oocistos em águas superficiais é uma tendência em vários países do mundo (GASSER e O'DONOGHUE, 1999; QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002). No Brasil, o Ministério da Saúde (órgão que regulamenta os parâmetros de qualidade da água para abastecimento público) publicou a Portaria 1.469/00 (modificada atualmente pela Portaria 518/04) que recomenda a inclusão da pesquisa para verificar a presença de *Giardia* spp. e de *Cryptosporidium* spp. em água tratada destinada ao consumo humano com o objetivo de atingir um padrão de ausência destes organismos (BRASIL, 2000; BRASIL, 2004).

Como os dados sobre a ocorrência destes protozoários em amostras de água proveniente do Rio Atibaia são pontuais, a análise periódica, em pontos significativos, poderá fornecer informações relevantes sobre a frequência e distribuição de tais patógenos no manancial em questão (ROSE et al., 2002; FRANCO et al., 2001a). O conhecimento sobre a presença de cistos e oocistos ao longo do tempo fornecerá elementos para o entendimento da epidemiologia ambiental de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. na região.

Considerando os fatos acima expostos, torna-se importante investigar a ocorrência destes protozoários na água bruta superficial desse rio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As características de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

Giardia spp. pertence ao Filo Sarcomastigophora, à classe Zoomastigophorea, à ordem Diplomonadida e à família Hexamitidae e é considerada um dos mais antigos organismos eucarióticos existentes. A reprodução deste parasito acontece por divisão binária e o ciclo de vida apresenta a alternância de dois estágios: o trofozoíto que é a forma vegetativa e o cisto que é a forma infectante e resistente às condições ambientais sendo eliminado nas fezes dos hospedeiros (ORTEGA e ADAM, 1997).

A taxonomia deste parasito ainda é controversa e por compartilharem características morfológicas comuns é difícil a distinção entre as espécies. Hoje são reconhecidas seis espécies de *Giardia*: *G. duodenalis* (principais hospedeiros: mamíferos e humanos), *G. muris* (roedores), *G. microti* (roedores silvestres), *G. psittaci* (psitacídeos), *G. ardeae* (aves silvestres) e *G. agilis* (anfíbios anuros) (MONIS e THOMPSON, 2003).

O emprego de técnicas moleculares ajudou a definir a estrutura genética da população de *Giardia duodenalis* que, até o momento, exibe pelo menos sete genótipos hospedeiro-específicos ("assemblages"), dentre os quais somente os grupos A e B foram encontrados em humanos. No entanto, o grupo A ainda pode ser subdividido em tipos I e II, sendo que o primeiro foi encontrado em humanos e animais e o segundo somente em humanos; o grupo B parece ser específico do homem, embora alguns subtipos tenham sido relatados em animais. Deste modo, há questionamentos sobre o potencial zoonótico de *Giardia duodenalis* o qual dependeria da especificidade associada ao grupo ("assemblages") e das subdivisões I e II do mesmo. A diversidade genética e a quantidade de linhagens existentes favorecem a grande variabilidade nos resultados dos estudos moleculares envolvendo *Giardia*; assim, investigações rigorosas sobre a epidemiologia molecular desta espécie são necessárias para esclarecer o seu papel como zoonose (MONIS e THOMPSON, 2003).

Apesar das dificuldades para determinar exatamente o(s) grupo(s) envolvido(s) na infecção humana, a giardiose é uma parasitose intestinal

extremamente comum que atinge países desenvolvidos e em desenvolvimento no mundo inteiro, afetando milhares de pessoas anualmente (THOMPSON, 2000).

A giardiose exibe sintomas variáveis como: diarreia aguda, acompanhada por dores abdominais, náuseas, flatulência, anorexia e mal-estar. Geralmente, a resolução da infecção é espontânea, mas alguns indivíduos a desenvolvem de maneira crônica, apresentando perda de peso e má absorção de nutrientes (carboidratos, lipídios, açúcares e vitaminas) quadro que também ocorre em portadores assintomáticos. As crianças são as principais afetadas, pois a infecção crônica interfere no desenvolvimento das mesmas (GUIMARÃES e SOGAYAR, 2002; ORTEGA e ADAM, 1997).

O tratamento para a giardiose é feito usualmente com metronidazol e costuma ser eficaz na maioria dos casos, mas, em geral, somente os indivíduos que exibem um quadro clínico sintomático são submetidos ao tratamento de modo que os portadores assintomáticos apresentam grande significado para a saúde pública por atuarem como fonte de cistos (THOMPSON, 2000; ORTEGA e ADAM, 1997).

Além de *Giardia* spp., outro protozoário patogênico que tem recebido atenção devido à potencialidade de transmissão pela água é o *Cryptosporidium* spp. que pertence ao Filo Apicomplexa, à classe Sporozoasida (sub-classe Coccidiasina), à ordem Eucoccidiorida e à família Cryptosporidiidae e tem como principais características um ciclo de vida monoxênico, reprodução envolvendo fases assexuada e sexuada (esporogonia, merogonia e gametogonia) e formação de oocistos contendo quatro esporozoítos, mas sem esporocistos. O oocisto é a forma infectante que difere dos demais coccídios por exibir fenda na membrana externa (através da qual os esporozoítos saem para o exterior) e dispensar período de maturação no ambiente porque já são liberados esporulados. São formados dois tipos de oocistos: os de parede delgada (cerca de 20,0% do total, relacionados à auto-infecção interna) ou espessa (equivalente a 80,0% de oocistos, eliminados com as fezes dos hospedeiros infectados) (SODRÉ e FRANCO, 2001).

Atualmente são aceitas 14 espécies de *Cryptosporidium*: *C. parvum* (hospedeiros principais: bovinos, humanos), *C. muris* (roedores), *C. hominis* (homem, primatas não humanos), *C. andersoni* (bovinos), *C. wrairi* (roedores), *C. felis* (felinos), *C. canis* (canídeos), *C. meleagridis* (aves e humanos), *C. baileyi* (aves), *C. galli* (galináceos), *C. serpentis* (répteis), *C. saurophilum* (répteis), *C. molnari* (peixes) e *C. suis* (suínos) (XIAO et al., 2004; RYAN et al., 2004).

Evidências moleculares têm demonstrado que o *C. parvum* não é uma espécie única, contendo vários genótipos distintos ou um complexo de espécies que exibem diferenças em especificidade de hospedeiro (FAYER et al., 2000). São conhecidos pelo menos dois distintos ciclos de transmissão, na natureza, relacionados a *C. parvum*: o genótipo H ("human") ou genótipo 1, infectante apenas para seres humanos e macacos *Rhesus*, embora já tenha sido encontrado em peixe-boi marinho (MORGAN et al., 2000) e, por infecção experimental, em ovinos (GILES et al., 2001); recentemente, o genótipo H ou 1 foi considerado uma nova espécie, *C. hominis*, baseado em diferenças biológicas e moleculares (XIAO et al., 2004); o genótipo C ("cattle": bovino) ou 2 que favorece a transmissão zoonótica (WIDMER et al., 1998; XIAO et al., 2001).

Apesar da criptosporidiose ter sido classificada como uma zoonose durante muitos anos, a utilização de técnicas moleculares permitiu esclarecer que além de *C. parvum* e de *C. hominis*, outras espécies também têm importância na infecção humana: *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, e *C. muris* (XIAO, et al., 2004; MONIS e THOMPSON, 2003).

A criptosporidiose no homem teve sua importância reconhecida a partir do surgimento dos primeiros casos de diarreia aquosa associados aos pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), no início dos anos 80. Logo, estudos subsequentes comprovaram que a doença é esporádica e de duração limitada em pessoas saudáveis, mas a infecção pode ser particularmente severa entre os indivíduos com comprometimento do seu sistema imunológico como as crianças menores de três anos, os idosos, as pessoas desnutridas, aquelas em terapia com imunossupressores ou quimioterápicos, que podem

apresentar diarreia crônica ou persistente, de longa duração (MARSHAL et al., 1997; SODRÉ e FRANCO, 2001).

Os indivíduos imunodeficientes que apresentam uma contagem de células CD4 menores que 150/ml e que são expostas ao protozoário invariavelmente desenvolvem a doença (TZIPORI e WARD, 2002). Os repetidos episódios de diarreia causados por *Cryptosporidium* nos primeiros anos de vida podem afetar o crescimento e o desenvolvimento cognitivo da criança; além disso, não existe um tratamento efetivo contra a infecção uma vez que os medicamentos geralmente utilizados não apresentam resultados homogêneos para todos os pacientes e não promovem a cura parasitológica (DILLINGHAM et al., 2002).

A transmissão de ambos os protozoários ocorre de modo semelhante: via fecal-oral e pode ser devida ao contato direto ou indireto entre pessoas, à exposição a animais infectados, à ingestão de alimentos e, principalmente de água contaminados (FAYER et al., 2000).

Um dos mais importantes fatores de risco para a aquisição de giardiose e criptosporidiose é a exposição à água contaminada devido a vários fatores: ubiquidade destes organismos no ambiente aquático, longa sobrevivência no ambiente (seis meses em água a 20°C), resistência aos desinfetantes comumente utilizados no tratamento de água para abastecimento público e/ou para recreação e baixa dose infectante que varia, dependendo da cepa, de nove a 1.042 oocistos e cerca de 10 cistos ou menos (FAYER et al., 2000; ORTEGA e ADAM, 1997).

2.2. Doenças de Veiculação Hídrica: Os Surtos de Giardiose e de Criptosporidiose

As doenças de veiculação hídrica (DVHs) surgiram a partir da segunda metade do século XIX quando, na Inglaterra, a reforma sanitária de Chadwick introduziu o uso generalizado da descarga hidráulica nos vasos sanitários, ligando-os à rede de esgotos a fim de diluir os dejetos nos rios e córregos que até então recebiam somente o escoamento das águas pluviais; esse sistema foi rapidamente adotado pela França e outros países da Europa e América (BRANCO, 2002). O pretendido saneamento, baseado no lançamento de esgotos

sem desinfecção prévia nos corpos d'água, resultou em grandes epidemias de cólera, febre tifóide e outras infecções (ROSE, 1997). A associação entre o consumo de água e o desenvolvimento de doenças ocorreu na segunda metade do século XIX quando John Snow relacionou a ingestão de água e a infecção por cólera após estudar uma epidemia de gastroenterite em Londres (1885).

No início do século XX, a qualidade do manancial utilizado para captação e o tipo de tratamento da água para abastecimento (filtração e cloração) foram reconhecidos como componentes importantes para a distribuição de água livre de patógenos entre a população (ROSE, 1997). Hoje se sabe que a água pode estar associada à propagação de várias enfermidades por transportar passivamente organismos patogênicos e por servir como ambiente para fases do ciclo de vida de alguns patógenos (como o *Schistosoma* spp.) ou de seus vetores (BRANCO, 2002; HESPANHOL, 2002).

As doenças de veiculação hídrica (DVH) têm ocorrência mundial e atingem também os países com elevado grau de saneamento básico e oferta de água tratada. Nos Estados Unidos, desde 1971, a Agência de Proteção Ambiental (United States Environmental Protection Agency – USEPA) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Center for Diseases Control and Prevention – CDC) mantêm um sistema de vigilância e cooperação para compilar e relatar periodicamente a ocorrência e a etiologia destas infecções (KRAMER et al., 1996).

Os surtos epidêmicos de doenças transmitidas pela água são definidos por duas características: afetar pelo menos duas ou mais pessoas (as quais devem apresentar sintomas semelhantes após ingerir água para consumo ou após exposição a águas recreacionais) e apresentar relação com a água, comprovada por estudos epidemiológicos (KRAMER et al., 1996).

No período de 1971 a 1994, foram registrados 740 surtos de gastroenterite relacionados à ingestão de água contaminada nos Estados Unidos; destes, 47,0% eram de etiologia desconhecida; dentre os agentes patogênicos identificados destacaram-se os parasitos, presentes em 20,0% das ocorrências. Bactérias, substâncias químicas e vírus foram responsáveis por 15,4%, 9,5% e 7,9% destes surtos, respectivamente. As protozooses também foram apontadas como as

principais causas de hospitalizações (79,8%) e de óbitos (78,7%) quando comparados aos demais organismos (14,8% e 14,6%), e/ou contaminantes químicos (1,0% e 7,0%). Os protozoários mais comumente associados a essas ocorrências foram *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (CRAUN et al., 1998).

2.2.1. Giardiose

O primeiro surto de giardiose devidamente documentado de origem hídrica foi relatado em 1965, em Aspen, Colorado (EUA). A pesquisa foi realizada porque um médico que estivera de férias no local, apresentou sintomas característicos de giardiose e comprovou a infecção depois de encontrar cistos de *Giardia* spp. nas suas amostras de fezes; a partir disso, um estudo foi realizado entre 1.094 esquiadores e freqüentadores da estação de esqui que ali passavam as férias (dezembro de 65 e janeiro de 66) para determinar a ocorrência e a provável fonte de infecção. Este levantamento revelou que 123 deles apresentavam sintomas de gastroenterite (CRAUN, 1990).

A cidade captava água a partir de três poços e de um córrego proveniente das montanhas cujo tratamento incluía a desinfecção com cloro, nem sempre acompanhada pela filtração. A contaminação intermitente por coliformes fecais nos poços foi detectada durante o surto, sugerindo vazamentos na rede de esgotos de onde os cistos foram isolados. Antes deste episódio, outro surto de gastroenterite devido à infecção por *Giardia* spp. foi registrado na cidade de Portland (Oregon, EUA), no período de outubro de 1954 a março de 1955 e atingiu cerca de 50.000 pessoas, mas sua origem nunca foi comprovada apesar da água para consumo ter sido a fonte mais provável da infecção (CRAUN, 1990).

De 1965 a 2002, ocorreram 148 relatos de surtos de giardiose por veiculação hídrica nos Estados Unidos, com 30.009 casos confirmados, incluindo água para consumo e de recreação (CRAUN, 1990; LEVINE, et al., 1990; CRAUN et al., 1998; BARWICK et al., 2000; LEE et al., 2002; BLACKBURN et al., 2004; YODER et al., 2004).

Na maioria dos episódios notificados entre 1991 e 2002, os mananciais subterrâneos (poços e fontes) estiveram envolvidos em 58,3% dos casos porque,

geralmente, a água captada não fora submetida a nenhum tipo de tratamento, prática assinalada em mais da metade das ocorrências. Além disso, deficiências no tratamento como ausência de filtração ou falhas na coagulação e problemas na rede de distribuição também foram apontadas como causas da contaminação da água destinada ao consumo humano; no manancial, a fonte mais comum de cistos de *Giardia* spp. foi o desaguamento de esgotos domésticos que contaminaram a água bruta superficial e a subterrânea (LEVINE et al., 1990; KRAMER et al., 1996; BARWICK et al., 2000; LEE et al., 2002; BLACKBURN et al., 2004).

2.2.2. Criptosporidiose

O primeiro surto documentado de criptosporidiose por veiculação hídrica ocorreu no Texas (EUA) em 1984, tendo 2.006 casos estimados. A água do poço que abastecia a comunidade fora contaminada por esgoto doméstico; na época, pouco se conhecia sobre a criptosporidiose e seu agente etiológico, por isso as análises de água somente incluíram testes para detecção de coliformes o que indicou a contaminação do manancial por fezes humanas e os exames clínicos realizados nos pacientes com diarreia demonstraram, de maneira inequívoca, a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes (D'ANTONIO et al., 1985).

De 1984 a 2002, 69 surtos de criptosporidiose causados pela veiculação hídrica foram relatados nos Estados Unidos afetando cerca de 436.232 pessoas (ANEXO A) (LEVINE, et al., 1990; CDC, 1991; HERWALDT et al., 1992; CDC, 1993; SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996; ROSE, 1997; CRAUN et al., 1998; FAYER et al., 2000; BARWICK et al., 2000; LEE et al., 2002; BLACKBURN et al., 2004; YODER et al., 2004). No mesmo período, países como Reino Unido, Canadá, Japão, Itália, Nova Zelândia e Irlanda do Norte registraram um total de 58 surtos e 38.284 casos da doença (FAYER et al., 2000; GLABERMAN et al., 2002; HOWE et al., 2002; SAID et al., 2003). As águas destinadas ao consumo humano foram responsáveis por 49,6% de todas estas ocorrências e aquelas utilizadas para recreação, 50,4%.

O episódio mais expressivo aconteceu em 1993 na cidade de Milwaukee (Wisconsin – EUA) onde foi registrado um número recorde de casos estimados: 403.000 indivíduos infectados, 4.400 hospitalizações e a morte de 100 pessoas, sendo 69 delas portadoras do HIV (SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996). Os custos médicos e a perda de produtividade, ocasionados por este surto, somaram 96 milhões de dólares considerando despesas com assistência médica, internações, medicamentos, transporte de emergência e faltas ao trabalho (CORSO et al., 2003).

A cidade de Milwaukee era abastecida por água potável produzida por duas companhias de tratamento: uma no norte, outra no sul. As alterações no processo de tratamento da água ocorreram na planta sul que registrou altos valores de turbidez (1,7 NTU), provavelmente devido à dosagem inadequada de coagulantes, reutilização da água de lavagem dos filtros e falha na etapa de filtração, fatores que podem ter contribuído para o aumento do número de oocistos circulantes e diminuído sua remoção durante sua passagem pelos filtros (MACKENZIE et al., 1994).

A deterioração da qualidade do Lago Michigan contribuiu decisivamente para a entrada de oocistos no sistema operacional da planta de tratamento envolvida porque o manancial recebia esgotos domésticos e dejetos bovinos provenientes das fazendas produtoras de leite situadas na proximidade dos rios que seguiam para o lago. Por algum tempo, os resíduos da atividade pecuária foram apontados como a principal fonte de contaminação da água, pensamento reforçado pela ocorrência de chuvas primaveris e do escoamento de neve devido ao período de degelo que atingiram a região na época do surto e que teriam carregado fezes bovinas para o lago (KRAMER et al., 1996; MACKENZIE et al., 1994; SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996). Posteriormente, o estudo do genótipo dos oocistos presentes nas amostras fecais examinadas evidenciou a presença do genótipo 1 ou H, isto é, de origem humana como responsável pelos casos de infecção por *Cryptosporidium* o que sugere que o recebimento de esgotos domésticos fora a principal fonte de contaminação dos sistemas (PENG et al., 1997).

Em 1994, na cidade de Las Vegas (Nevada – EUA), outro surto de gastroenterite chamou a atenção por ser o primeiro envolvendo um sistema de tratamento de água conhecido como sendo o estado-de-arte em tratamento de água potável, que aparentemente não apresentava falhas e utilizava um manancial de parâmetros físico-químicos e microbiológicos ótimos (turbidez, número de partículas, número de coliformes totais e fecais). O episódio durou cerca de sete meses e foi reconhecido, primeiramente, a partir do diagnóstico da infecção entre pessoas portadoras do HIV (ROEFER et al., 1996).

A cidade de Las Vegas, conhecida pela excelente assistência à saúde desses indivíduos, agregava uma população expressiva de pessoas em busca de auxílio médico especializado; além disso, os profissionais da área de saúde eram bem preparados para diagnosticar a criptosporidiose, infecção freqüentemente detectada entre os pacientes HIV - soropositivos. Assim, um aumento do número de casos da doença foi prontamente notado e as providências para o isolamento da fonte de contaminação foram tomadas. Ao todo, 103 casos foram relatados sendo que 78 foram diagnosticados durante os estudos epidemiológicos que se seguiram; destes, 63 eram indivíduos portadores do HIV, onze crianças imunocompetentes e quatro adultos (dois em tratamento com medicamentos imunossupressores); ao todo, 41 pessoas morreram e destas, pelo menos 20 tiveram a criptosporidiose como causa da morte registrada na certidão de óbito (KRAMER et al., 1996; SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996).

A água, captada de um grande reservatório (Lago Mead), apresentava turbidez média menor que 0,2 NTU embora a bacia recebesse a descarga de efluentes industriais e domésticos em um ponto localizado a 11 km da captação; a estação de tratamento mantinha um ótimo padrão de qualidade e realizava, mensalmente, o monitoramento da presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas águas bruta, tratada e de lavagem de filtros; apesar destas condições, a água foi considerada o principal fator de risco para a aquisição da doença, conclusão inferida a partir do levantamento epidemiológico realizado no período do surto (ROEFER et al., 1996; KRAMER et al., 1996).

Durante este surto, a avaliação da presença de oocistos foi intensificada e amostras de água bruta, final e de lavagem de filtros foram analisadas semanalmente, mas os resultados revelaram “a ocorrência de estruturas semelhantes aos oocistos em cada um dos tipos de água analisados” e somente em 1996, 18 meses depois do início do surto, um oocisto foi encontrado na água de lavagem dos filtros (ROEFER et al., 1996).

Considerando os diversos surtos de criptosporidiose por veiculação hídrica, as principais causas da contaminação da água para consumo estiveram relacionadas ao: i) tratamento inadequado ou ausente das águas captadas, especialmente, no caso de poços e nascentes (águas subterrâneas) cujo tratamento era feito por meio de filtração simples ou, unicamente, cloração; ii) deficiências no sistema de tratamento que incluíram falhas na etapa de coagulação e filtração; iii) reutilização da água de lavagem de filtros; iv) problemas na distribuição da água devido à contaminação da rede por vazamentos nas conexões que conduziam o esgoto; e iv) contaminação de mananciais por esgoto doméstico ou por fezes de animais (LEVINE et al., 1990; KRAMER et al., 1996; BARWICK et al., 2000; LEE et al., 2002).

Em relação às águas recreacionais, 53 surtos de gastroenterite causados por *Cryptosporidium* spp. foram relatados nos Estados Unidos, entre 1986 e 2002 (ANEXO B). Nestes casos, a ingestão de água foi acidental e a contaminação da mesma foi devida ou a acidentes fecais durante as atividades de natação, principalmente as que envolviam crianças ou a contaminação dos sistemas por esgotos domésticos no caso de ambientes aquáticos ao ar livre. As piscinas foram indicadas como fonte de infecção em 79,2% das ocorrências, provavelmente porque eram, na maioria das vezes, de uso compartilhado entre adultos e crianças de todas as faixas etárias. As causas mais comuns da permanência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nesse ambiente envolveram deficiência no sistema de filtração da água e cloração insuficiente e, apesar da dose de cloro utilizada nas piscinas ter sido potencialmente capaz de inativar os oocistos, nem sempre o tempo de contato fora suficiente para que isso acontecesse (FAYER et al., 2000, YODER et al., 2004).

2.2.3. Considerações gerais

O levantamento da ocorrência das doenças de veiculação hídrica é extremamente importante para a melhoria da qualidade da água utilizada para consumo humano e para recreação; entretanto, o número real de casos pode ser subestimado porque nem sempre os surtos são reconhecidos, devidamente investigados e relatados às autoridades. Alguns fatores interferem no processo de coleta de informações como: a associação entre a epidemiologia da doença e o consumo ou ingestão acidental de água que nem sempre é evidente (uma vez que a giardiose e a criptosporidiose apresentam grande espectro de sintomas e mais de uma via de transmissão); o diagnóstico tardio da infecção (porque geralmente as pessoas buscam atendimento médico apenas quando a sintomatologia é severa ou aparente); a falta de treinamento técnico de médicos e laboratoristas e ausência de exames laboratoriais de rotina (que incluam a detecção de *Cryptosporidium* spp. nas amostras clínicas); a efetividade dos programas de vigilância de agências locais de saúde e, por fim, as características intrínsecas dos surtos como extensão, número de casos e tipo de infecção (infecções agudas e de curta duração são mais difíceis de serem detectadas) (BARWICK et al., 2000).

De modo geral, nos Estados Unidos, o número de surtos de gastroenterite causados por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. apresentaram uma tendência de queda a partir de 1996, o que pode ser um reflexo dos esforços das estações de tratamento em melhorar o padrão da água produzida e das alterações na legislação (BARWICK et al., 2000). Porém, no período correspondente a 1999-2002, esta propensão pareceu ser contrária, especialmente para águas recreacionais (embora o número maior de relatos também possa ter sido motivado pelo sistema de vigilância adotado e pela crescente conscientização sobre a importância destas doenças, principalmente da criptosporidiose, por parte dos sistemas locais de saúde) (LEE et al., 2002; YODER et al., 2004).

2.3. A vigilância de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em águas destinadas ao consumo humano.

À medida que a vigilância sobre as doenças transmitidas por veiculação hídrica foi sendo feita, houve a necessidade de atualizar e melhorar a legislação sobre os padrões de qualidade da água produzida para o consumo humano e para as atividades de recreação. Assim, em 1994, a USEPA propôs um conjunto de normas, denominado *Information Collection Rule* (ICR), para coleta de dados sobre a presença de vários patógenos em mananciais utilizados no abastecimento de água que atendiam comunidades com população maior ou igual a 100.000 habitantes e a capacidade das estações de tratamento em removê-los, incluindo sub - produtos da desinfecção da água. E, pela primeira vez, *Cryptosporidium* spp. tem indicação específica nos levantamentos; até então, somente *Giardia* e coliformes fecais e totais figuravam nas normas da USEPA (KRAMER et al., 1996).

Ao longo do tempo e com base nos dados do sistema de vigilância, novos acréscimos foram incorporados às normas vigentes, como o *Interim Enhanced Surface Water Treatment Rule* (IESWTR) promulgado em 1998 e que trata da inclusão da remoção de *Cryptosporidium* e outros patógenos como meta para as estações de tratamento de água para todos os sistemas de abastecimento que utilizam água superficial ou subterrânea sob sua influência, complementando a norma *Surface Water Treatment Rule* (SWTR) que estabelecia metas para a remover cistos de *Giardia*, coliformes fecais e totais (BARWICK et al., 2000; KRAMER et al., 1996).

Hoje, novas normas têm o objetivo de atender a um padrão de ausência de oocistos de *Cryptosporidium* também em pequenos sistemas públicos de abastecimento que usam água superficial (atendem a uma população inferior a 10.000 pessoas), em água de lavagem de filtros e em água subterrânea passível de contaminação por estes organismos (LEE et al., 2002).

Outros países também têm discutido regulamentos específicos que estabeleçam a remoção de oocistos e cistos. No Canadá cada província possui sua norma, sendo que *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. são citados em

algumas diretrizes como uma preocupação (FINCH e BELOSEVIC, 2002). No Reino Unido, a legislação estipula que a água de consumo deve ser monitorada diariamente e o número para *Cryptosporidium* não deve ultrapassar 10 oocistos/10 l (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002).

No Brasil, o Ministério da Saúde publicou em dezembro de 2000 a Portaria 1.469 que determina os padrões de qualidade para a água potável e recomenda a inclusão da análise da presença de oocistos e cistos em águas destinadas ao consumo humano com o objetivo de atingir um padrão de ausência destes protozoários na água utilizada no abastecimento público (BRASIL, 2000). Recentemente uma nova resolução foi aprovada, a Portaria 518, que mantém a determinação anterior (BRASIL, 2004).

2.4. Os métodos para avaliação da presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais.

Na maioria dos surtos documentados, as águas incriminadas atendiam aos padrões de potabilidade determinados pela legislação específica; assim, a adoção de programas de vigilância das doenças de veiculação hídrica exigiu que métodos específicos para a sua detecção fossem empregados, com a finalidade de coletar e relatar dados sobre a ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (BARWICK et al., 2000).

A avaliação da ocorrência de microrganismos indicadores, um dos principais recursos usados para se determinar a qualidade da água, não é eficaz para indicar a presença de cistos e oocistos porque suas características são bem distintas daquelas dos grupos de bactérias indicadoras (coliformes totais, fecais ou *Escherichia coli*), como segue: a) não são facilmente cultiváveis *in vitro*, por isso as amostras de água precisam ser analisadas microscopicamente; b) o número presente no ambiente é menor; c) apresentam grande resistência aos processos de desinfecção utilizados nas estações de tratamento de água, sobrevivem mais tempo e assim, quando há ausência de bactérias na água final não é possível afirmar que o mesmo ocorra com os protozoários. Daí a necessidade de métodos diferenciados para a detecção de cistos e oocistos (FRICKER e CRABB, 1998).

Deste modo, uma grande variedade de metodologias foi testada com a finalidade de documentar a presença de cistos e oocistos em amostras de água. As técnicas utilizadas para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático foram inicialmente adaptadas daquela originalmente delineada para cistos de *Giardia* spp. (ROSE, 1997). No início da década de 80, as primeiras análises foram feitas empregando a técnica de concentração em solução de sulfato de zinco e visualização com lugol (LeCHEVALLIER e NORTON, 1995).

Em 1987, com o desenvolvimento e disponibilidade dos testes comerciais de anticorpos monoclonais marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), específicos para os protozoários, a reação de imunofluorescência direta (IFA) foi definitivamente incorporada ao procedimento de detecção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água; somente a adoção desta etapa acarretou uma eficiência de recuperação 12 vezes maior em comparação ao uso de sulfato de zinco acompanhado de visualização com lugol (CLANCY et al., 1999).

Embora recebendo diferentes denominações: ASTM, 1993; APHA/ AWWA/ WEF, 1995; ICR/ USEPA, 1996 e apresentando pequenas modificações em relação aos reagentes e procedimentos, estas metodologias foram padronizadas e são utilizadas ainda hoje para gerar dados sobre a ocorrência destes protozoários no ambiente aquático (FRICKER e CRABB, 1998); no entanto todas são fundamentadas em três etapas básicas: i) concentração das amostras de água (coleta e filtração); ii) eluição e purificação, e iii) visualização por meio de reação de imunofluorescência (ROSE, 1997; FRICKER e CRABB, 1998; QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002).

Para a filtração, foram utilizados inicialmente filtros de cartuchos de polipropileno, fibra de vidro ou nylon com porosidades variáveis (1 a 3 µm). Um grande volume de água – 100 l para amostra bruta e 1.000 l para a tratada – passava pelo filtro (a um fluxo de 1 a 5 l/min) o qual posteriormente era cortado e lavado manualmente com solução de eluição repetidas vezes. O líquido resultante, cerca de 3 a 4 l, era submetido à centrífugo-concentração e os cistos e os oocistos eram separados das sujidades mediante a purificação com gradiente de sacarose ou Percoll® (Pharmacia Biotech) ou ambos (gravidade específica = 1.10 ou 1.18)

e, finalmente, visualizados por meio da reação de imunofluorescência e contraste de fase (LeCHEVALLIER e NORTON, 1995; JAKUBOWISKI et al., 1996; ROSE, 1997; FRICKER e CRABB, 1998; QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002).

As principais críticas a esta metodologia incluíam a necessidade de filtração de grandes volumes, a baixa reprodutibilidade, a grande variabilidade na porcentagem de recuperação, o alto limite de detecção (>100 organismos/l), a ocorrência de resultados falsos-positivos e falsos-negativos, o pequeno volume efetivamente filtrado, a complexidade analítica, a grande necessidade de manipulação e o longo tempo de execução laboratorial, além de ser sujeito à influência do tipo de amostra analisada. As modificações introduzidas como o uso de gradientes de densidade e alta velocidade de centrifugação não acarretaram melhores resultados (ALLEN et al., 2000; LINDQUIST et al., 1999; QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002); tampouco, este procedimento fornecia informações sobre viabilidade ou espécie dos protozoários detectados. A eficiência de recuperação relatada por estudos interlaboratoriais foi de 25,0%-44,0% para *Giardia* spp., com variações de 0%-139,0%, e 23,0%-35,0% para *Cryptosporidium* spp., variando de 0%-140,0% (JAKUBOWISKI et al., 1996).

Novos procedimentos utilizando membranas de policarbonato ou de acetato de celulose foram descritos com índices de recuperação em torno de 5,0%-50,0% e de 70,5% , respectivamente. Esta técnica consiste no uso de membrana com porosidade nominal de 1,2 a 3,0 μm e diâmetro de 142 mm ou 293 mm, acoplada a um sistema de porta-filtro; após a filtração da amostra, a mesma é retirada do suporte e a seguir, eluída por extração mecânica e lavagem de sua superfície. O sedimento é obtido por centrifugação (650 x g por 15 minutos) e por fim, os organismos são visualizados com o emprego de IFA, após purificação em gradiente de densidade (JAKUBOWISKI et al., 1996).

Ongerth e Stibbs (1987) propuseram o uso de filtros de membranas de policarbonato de 293 mm de diâmetro e porosidade de 5 e 1 μm ; por este método volumes de até 20 l, no máximo, passavam por pré-filtração em membrana de 5 μm e depois por filtração em 1 μm ; a concentração do material era conduzida em água destilada; a partir daí o produto final era submetido ao gradiente de

densidade com citrato de potássio e visualizado. A eficiência de recuperação de oocistos variou entre 5,0% e 22,0%.

Musial et al. (1987) introduziram modificações nesta metodologia como o uso de solução tampão contendo Tween 80 (0,1%) e flutuação em gradiente de sacarose, mas a recuperação de *Cryptosporidium* spp. ainda permaneceu baixa, cerca de 29,0%.

Dawson et al. (1993) utilizaram a filtração em membrana de nitrato de celulose com 142 mm de diâmetro seguida diretamente pelas etapas de eluição e imunofluorescência para visualização de oocistos. A média de recuperação obtida foi de 25,5%, com variação entre 19,9% e 36,6%, que apesar do baixo índice de recuperação, teve um tempo de execução menor.

Em 1995, Aldom e Chagla empregaram a filtração em membranas de acetato de celulose (293 mm de diâmetro e porosidade nominal de 1 a 2 μ m); a eluição era feita mediante dissolução em acetona da mesma, seguida de lavagens sucessivas em etanol e solução tampão; o produto da dissolução era centrifugado diversas vezes e o sedimento final submetido à imunofluorescência. A eficiência de recuperação média relatada foi de 70,5%, mas o método possuía algumas limitações como a permanência de partículas sólidas não dissolvidas que podiam reter oocistos, a impossibilidade de utilizar água com grande número de partículas em suspensão restringindo sua aplicabilidade à amostras de água tratada. Entretanto, deve se ressaltar que o protocolo de eluição escolhido é uma etapa crítica (FRANCO et al., 2001b; THOMAS et al., 2001).

Nieminski et al. (1995) compararam o desempenho da filtração em cartucho de polipropileno e em membrana de policarbonato e chegaram à conclusão de que o bom desempenho na recuperação de oocistos depende, principalmente, do número de etapas laboratoriais envolvidas na execução do procedimento e das características da água, do método escolhido; mas, segundo estes autores, a eficiência de recuperação da técnica de filtração em membrana foi maior (Filtração em membrana: *Giardia* spp.– 49,0% a 86,0%, *Cryptosporidium* spp.– 9,0% a 78,0%) em relação à filtração em cartucho (*Giardia* spp.– 12,0% a 76,0%,

Cryptosporidium spp.– 8,0% a 56,0%), além do primeiro consumir menos tempo de execução e ser economicamente menos dispendioso.

Shepherd e WynJones (1996) avaliaram a eficiência de três procedimentos: filtração em cartucho (recuperação de cistos em água bruta de rio: 16,3%; oocistos: 9,4%), em membrana a partir de filtros de diferentes características (cistos: 50,1%; oocistos: 38,1%) e floculação em carbonato de cálcio (cistos: 72,5%; oocistos: 71,3%) e demonstraram maior eficiência da técnica de filtração em membrana quando eram empregadas as de acetato de celulose cujas superfícies são mais macias, facilitando a extração mecânica dos cistos e/ou oocistos, sem risco de rompimento e conseqüente perda de organismos e apresentando a vantagem de não soltar fibras durante o processo de eluição.

Uma das restrições deste procedimento reside na saturação dos poros da membrana, devido à turbidez da água analisada o que, usualmente, limitava a 2 l os valores efetivamente filtrados (FRICKER e CRABB, 1998; HSU et al., 2001).

Outro método de concentração descrito na literatura emprega a precipitação química de volumes de 10 l mediante a precipitação e a floculação química em carbonato de cálcio (VESEY et al., 1993); os flocos formados são dissolvidos pela adição de ácido sulfâmico e os sedimentos, recuperados por centrifugação. Embora tenha a vantagem de ser um método de execução laboratorial mais simples e econômico, as limitações incluem: cuidado extremo na etapa de remoção do sobrenadante, porque o resíduo de carbonato de cálcio não pode ser ressuspenso, sob pena de perdas de oocistos; qualquer decréscimo na concentração de reagentes leva a uma diminuição do número de oocistos floculados; valores de pH menores que 10 resultaram em menor quantidade de flocos contendo oocistos e em pH acima de 10, foi registrada a diminuição da fluorescência dos oocistos. Além disso, o procedimento deve ser conduzido em pH 10 o que inviabiliza o estudo posterior do potencial infectante dos cistos e oocistos recuperados (VESEY et al., 1993; BUKHARI et al., 1998). O índice de recuperação para esta metodologia chegou à cerca de 79,0% em amostras de água bruta superficial, mas menores taxas de recuperação foram citadas variando entre

30,0% e 40,0% em condições de experimentos-controle (FRICKER e CRABB, 1998).

Paralelamente ao desenvolvimento destes métodos para a detecção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., a USEPA iniciou em 1996 um programa com o objetivo específico de reunir, identificar e padronizar novas tecnologias para a pesquisa de cistos e oocistos em amostras de água. Os Métodos 1622 e 1623 (USEPA, 1997; USEPA, 1999) foram desenvolvidos em resposta a essa iniciativa e são idênticos em muitos aspectos, diferindo na adição de anticorpo específico para *Giardia* spp. (1623), método de purificação e uso de diferentes marcas de reagentes (CONNEL et al., 2000). No Método 1623, a adoção de novos procedimentos de filtração e eluição, como a utilização de cápsulas (Envirocheck, Gelman®) ou unidades de filtração (Filta-Max, IDEXX®), acarretou um aumento significativo da recuperação; na etapa seguinte, microesferas magnéticas reagentes recobertas com anticorpos anti-*Giardia* e anti-*Cryptosporidium* são utilizadas para separar os protozoários das sujidades e demais partículas presentes na amostra (separação imunomagnética: IMS) o que resulta em preparações finais com menos sujidades (CONNEL et al., 2000). Entretanto, persiste a variabilidade nas taxas de recuperação (entre 12,0% e 93,0%) em função das diferentes marcas dos kits comerciais de separadores imunomagnéticos, da inclusão (e tempo de condução) da etapa de dissociação ácida (para separar cistos e oocistos das microesferas), da capacidade de tamponamento das soluções presentes nos diferentes kits, do pH da amostra examinada e da limitação do volume do sedimento a ser submetido ao IMS (não superior a 500 µl), além de não fornecer informações sobre as espécies de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. ou sua viabilidade/infectividade (BUKHARI et al., 1998; KUHN et al., 2002; ROCHELLE et al., 1999; QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002).

A turbidez é um fator crítico em relação à sensibilidade deste método, bem como o tamanho e a natureza do material particulado presente na amostra (DiGIORGIO et al., 2002; FENG et al., 2003).

Yakub e Stadterman-Knauer (2000) sugerem que a presença de ferro na água em concentrações de 40 mg/l e de 4 mg/l teria um efeito inibitório na recuperação de *Giardia* spp. e de *Cryptosporidium* spp., respectivamente, por interferir na etapa de formação dos complexos microesferas-anticorpos-cistos/ocistos durante o procedimento de separação imunomagnética devido à interação entre o ferro dissolvido e a superfície de cistos e ocistos.

Novos e sofisticados métodos de concentração e visualização estão em desenvolvimento como a centrifugação de fluxo contínuo, citometria de fluxo, eletroquimioluminescência e a técnica de PCR para amostras ambientais (JAKUBOWISKI et al., 1996; QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002; BORCHARDT e SPENCER, 2002). No entanto, estas novas tecnologias apresentam um custo bastante alto que podem limitar seu uso em larga escala para monitoramento ambiental de modo que a imunofluorescência permanece como um dos métodos de referência para pesquisa de protozoários patogênicos em água (JAKUBOWISKI et al., 1996). No caso específico da reação da polimerase em cadeia, o maior obstáculo ainda é a presença de inibidores da PCR que são co-extraídos com o DNA do parasito e inibem a reação de amplificação (XIAO et al., 2001), além do fato de que ocistos e cistos estão usualmente presentes em pequena quantidade nas amostras ambientais o que limita o número de amostras que podem ser amplificadas com sucesso (GASSER e O'DONOGHUE, 1999). A técnica é sensível o bastante para detectar filamentos de DNA livre na amostra o que poderia produzir resultados falso-positivos e, por acarretar o rompimento de cistos e/ou ocistos, não é possível fazer o exame microscópico (FRICKER e CRABB, 1998).

O aprimoramento de métodos analíticos para detecção de protozoários patogênicos em água, no que tange as etapas de coleta, concentração e purificação foi assunto extensivamente estudado, mas poucos trabalhos enfocaram a questão da qualidade dos anticorpos utilizados para a reação de imunofluorescência (HOFFMAN et al., 1999). Cistos e ocistos sofrem modificações de sua parede, pelo estresse ambiental e isto pode influenciar a habilidade dos anticorpos em efetivamente ligar-se aos seus epítomos. Por outro

lado, a reatividade cruzada com algas (ex.: *Microcystis*) ou outros coccídios (ex.: *Monocysts*, Apicomplexa: Monocystidae) ou mesmo a variação entre diferentes lotes do produto, influenciam a performance dos anticorpos (FERRARI et al., 1999; BULL et al., 1998; HOFFMAN et al., 1999).

Além disso, a escolha do método deve ser fundamentada em questões como: qual o propósito da amostragem, a qualidade da água a ser analisada, a infra-estrutura do laboratório onde a análise será conduzida, o tempo consumido e a complexidade do protocolo a ser executado além da sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (FRICKER e CRABB, 1998). Por este motivo, um fator fundamental a ser levado em consideração na avaliação da performance dos diferentes métodos é a realização de experimentos controles com a inoculação de quantidades conhecidas de cistos e oocistos em alíquotas de água livre de interferências que devem ser submetidas ao mesmo tratamento da amostra ambiental a ser analisada (LINDQUIST et al., 1999).

A comparação entre as diferentes metodologias é prejudicada pela falta de padronização dos critérios para a condução destes experimentos como: informações sobre as características da água amostrada, descrição de diversos procedimentos de inoculação em diferentes trabalhos existentes que dificultam a comparação entre os tipos de amostras inoculadas, grandes concentrações de cistos e oocistos semeados que acabam por resultar em maior eficiência de recuperação, método de enumeração e qualidade da suspensão de oocistos inoculados, uso de amostras comprovadamente negativas como controle e "ensaio cego" para diminuir o erro de leitura das lâminas (LINDQUIST et al., 1999).

Os métodos comumente utilizados para detecção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. no ambiente apresentam o inconveniente de não discriminarem cistos e oocistos efetivamente capazes de completarem seu ciclo de vida no hospedeiro daqueles que não exibem esse potencial (FINCH e BELOSEVIC, 2002; LINDQUIST et al., 1999). A propriedade de distinguir organismos infectantes ou não, é de suma importância no estudo da epidemiologia ambiental dos protozoários patogênicos devido às implicações em Saúde Pública e aos riscos reais de aquisição da infecção. Ressalte-se que o termo "viabilidade",

amplamente utilizado na literatura específica, é ambíguo porque reúne vários fenômenos biológicos distintos em um só (FINCH e BELOSEVIC, 2002; LINDQUIST et al., 1999): a permeabilidade da parede; a capacidade de excistar, a de penetrar em uma nova célula-hospedeira e a de reproduzir o ciclo de vida do protozoário, com a conseqüente eliminação de formas de resistência. As técnicas propostas para avaliação de “viabilidade” nos últimos anos foram: a excistação *in vitro*, o teste de infectividade em modelo animal, a RT-PCR (transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase), a inclusão e exclusão de corantes fluorogênicos vitais (DAPI: 4'6 diamidino – 2 fenilindole e PI: iodeto de propídio), a infecção em linhagens de células e a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (NEUMANN et al., 2000; QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002; GASSER e O'DONOGHUE, 1999; GRIMASON et al., 1994). No entanto, na prática, cada método proposto tem restrições (GASSER e O'DONOGHUE, 1999).

A excistação *in vitro* simula as condições epigástricas para liberação dos esporozoítos de oocistos que teriam a capacidade de infectar os animais, entretanto, foi demonstrado que esporozoítos que não excistaram (interpretados como não “viáveis”) causaram infecção (NEUMANN et al., 2000). O uso de modelo animal em estudos de infectividade é eficaz para testar a capacidade de infecção do genótipo C (potencial zoonótico) de *C. parvum*, mas não do genótipo H (humano) o qual não infecta camundongos. Os dois métodos requerem grandes quantidades de organismos em suspensões concentradas e relativamente purificadas o que limita o uso para amostras ambientais devido ao pequeno número de cistos e oocistos usualmente presentes nas mesmas (FREIRE-SANTOS et al., 2000; JAKUBOWISKI et al., 1996).

A RT-PCR é uma ferramenta molecular que inclui vários passos: a) isolamento e purificação do RNA; b) transcrição reversa da fita complementar do DNA; c) amplificação e d) detecção do produto amplificado (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002). É baseada no princípio de que somente organismos vivos efetuam a transcrição para formar RNAm, mas já foi demonstrado que cistos de *Giardia* spp. em processo de morte celular por aquecimento (*heat killing*) produzem RNAm detectável por RT-PCR (GASSER e O'DONOGHUE, 1999). O

método também possui desvantagens como extração ineficiente do RNA de cistos e oocistos, interferência na transcrição e ampliação por constituintes ambientais, natureza não quantitativa do teste, pequenos volumes amostrados e quantidade de organismos recuperados das amostras ambientais insuficientes para extração do RNA (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002).

Os corantes fluorogênicos vitais (DAPI e PI), são indicadores de características internas e marcadores de membranas intactas, respectivamente. Agem por inclusão (DAPI) e exclusão (PI); quando utilizados no mesmo ensaio podem sugerir, por inferência, o potencial infectante; o primeiro cora o núcleo dos esporozoítos e o segundo, revela se a membrana da célula está intacta (se for impermeável à sua entrada). Porém, as características de permeabilidade aos corantes não indicam necessariamente atividade metabólica dos esporozoítos o que de fato comprovaria a natureza infectante do protozoário (GRIMASON et al., 1994).

Ressalte-se que o método 1623 recomenda a aplicação do DAPI, simultânea à IFA como um teste de confirmação da morfologia, pois seu uso propicia a visualização de características morfológicas adicionais tais como o número de núcleos o que possibilita a identificação correta da estrutura observada (GRIMASON et al., 1994; USEPA, 1999).

Outras metodologias têm sido empregadas na determinação da “viabilidade” dos protozoários como a coloração dos ácidos nucleicos (corantes SYTO 9, *hexadim* e SYTO 59), hibridização *in situ* e cultivo do protozoário em cultura de células, entretanto são procedimentos caros, laboriosos, sem protocolos devidamente padronizados (NEUMANN et al., 2000; QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002). O pequeno número de cistos e oocistos usualmente presentes nas amostras ambientais também é um fator restritivo.

Slifko et al. (1999) adotaram a técnica de enumeração denominada “número mais provável” (MPN) para quantificar focos do desenvolvimento de *Cryptosporidium* em cultura de células e concluíram que este método é bastante sensível podendo detectar oocistos infectantes em concentrações de um oocisto/ml ou menos.

Mesmo que oocistos e cistos considerados “inviáveis” sejam encontrados na amostra, não se pode assegurar que não existam organismos potencialmente infectantes na água analisada; por exemplo, LeChevallier et al. (1991), em um levantamento feito em vários mananciais, estimaram que aproximadamente 32% dos oocistos recuperados apresentavam esporozoítos, sugerindo uma capacidade potencial de causar infecção.

De modo geral, as metodologias existentes atualmente não correspondem a um padrão ótimo de desempenho tanto para a detecção como para avaliação da capacidade infectante de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.: não há um método único que apresente resultados consistentes e satisfatórios frente à ampla variação das condições ambientais como o tipo de amostra, a idade dos cistos e oocistos presentes na água, as características físico-químicas e biológicas do meio (DiGIORGIO et al., 2002).

2.5. Fatores determinantes da ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água bruta superficial

A dinâmica da ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em mananciais d'água superficial é influenciada por diversos fatores abióticos e bióticos como: a turbidez, a velocidade do fluxo de água, o pH, a precipitação, o escoamento superficial, a temperatura, a microbiota local e, sobretudo, a fonte de oocistos e cistos (ROSE et al., 2002; ATHERHOLT et al., 1998).

A turbidez é uma medida relativa de claridade da água e foi inicialmente utilizada em estudos limnológicos para avaliar a profundidade alcançada pela luz. A turbidez natural é composta por um conjunto de partículas de tamanho e características ópticas diferentes (argila, sedimentos, sílica, matéria orgânica, vegetação e organismos vivos), além disso, é um parâmetro importante para controle dos processos de tratamento da água (BURLINGAME et al., 1998).

O aumento da turbidez tem sido relacionado à dificuldade de se obter índices satisfatórios de recuperação laboratorial de *Giardia* spp. e de *Cryptosporidium* spp. principalmente porque um grande número de material particulado satura os filtros, acarretando um aumento do volume de sedimento

concentrado podendo interferir na ligação entre os anticorpos e os protozoários (NIEMINSKI et al., 1995; DiGIORGIO et al., 2002; FENG et al., 2003). Destaca-se também a tendência de cistos e oocistos se fixarem às partículas presentes em águas naturais, devido às interações hidrofóbicas ou eletrostáticas de suas cargas superficiais (MUSIAL et al., 1987; MEDEMA et al., 1998).

A velocidade e a intensidade do fluxo de água podem provocar a ressuspensão do sedimento e, conseqüentemente, do número de partículas, isso significa uma maior probabilidade de interações entre cistos e oocistos e o material particulado e embora a sedimentação destes organismos aderidos ocorra, sua velocidade é baixa e influenciada pela turbulência da água (MEDEMA e SCHIJVEN, 2001; MEDEMA et al., 1998; ATHERHOLT et al., 1998).

A concentração de cistos e oocistos no ambiente aquático sofre alterações nos períodos de maior precipitação pluviométrica e aumentando após as chuvas o que pode ser atribuído ao carreamento adicional de material particulado, ao revolvimento do sedimento depositado no leito e nas margens dos rios e ao escoamento superficial; concomitantemente, há nesta época uma acentuada sazonalidade da criptosporidiose humana (NEWMAN et al., 1993; ROSE et al., 2002; KISTEMANN et al., 2002). Entretanto, é preciso destacar que a precipitação exerce influência na turbidez e na vazão do rio, fatores que também, estão relacionados à ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (CROCKETT e HAAS, 1997; ATHERHOLT et al., 1998).

O escoamento superficial é igualmente influenciado pela pluviosidade e as características geográficas e da vegetação locais; estes fatores, somados às atividades humanas praticadas na área, determinam como os oocistos contaminam o corpo d'água. Mananciais localizados em áreas montanhosas estão sujeitos a um carreamento mais intenso de partículas provocado pela chuva ou degelo que aqueles situados em planícies (SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996); o tipo e a quantidade de vegetação presente interfere na velocidade de escoamento, pois áreas sem cobertura vegetal ou de pastagem tendem a oferecer menor resistência à passagem da água e não atuam como barreira para o transporte de cistos e oocistos (GRACZYCK et al., 2000; DAVIES et al., 2004). A

criação de animais como bovinos, ovinos e outros, hospedeiros de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., é uma fonte importante de cistos e oocistos uma vez que estes animais, quando infectados, chegam a eliminar cerca de 10^6 a 10^9 oocistos por grama de fezes durante o período correspondente ao curso clínico da infecção; os resíduos produzidos geralmente não sofrem nenhum tipo de manejo e são deixados no solo para que se decomponham naturalmente, mas no período de chuvas este material pode ser transportado para rios e córregos (IONAS et al., 1998; ROSE et al., 2002; GRACZYCK et al., 2000). Os animais silvestres também podem ser fontes de cistos e oocistos (JELLISON et al., 2002).

A temperatura e o pH da água influenciam o tempo de sobrevivência e a carga superficial dos protozoários, respectivamente. No meio ambiente estes protozoários podem sobreviver por seis meses a 20°C, três meses entre 25 e 30°C e dois meses a -5°C (FAYER et al., 2000). A interação entre a carga superficial e as partículas determinam a mobilidade dos cistos e oocistos; em pH neutro a carga é negativa, mas um aumento no pH reduz esta mobilidade produzindo uma maior afinidade com as partículas suspensas e, conseqüentemente, aumento na sedimentação dos organismos, por isso a tendência de se recuperar oocistos vazios em procedimentos que utilizam pH 10 como a floculação ou precipitação em carbonato de cálcio (ONGERTH e PECORARO, 1996; VESEY et al., 1993).

A dinâmica da microbiota presente em vários tipos de águas também determina a sobrevivência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. porque envolve a predação de cistos e oocistos por rotíferos, protozoários ciliados e amebas de vida livre e a injúria metabólica ou estrutural por substâncias produzidas pela microflora (MEDEMA et al., 1998; STOTT et al., 2003).

Por fim, um fator extremamente importante para a contaminação hídrica é a utilização de corpos d'água como receptores de efluentes de esgoto doméstico bruto ou tratado que são fontes permanentes de cistos e oocistos podendo contribuir com concentrações de $1,3 \times 10^4$ oocistos/100 l e mesmo quando estes resíduos são tratados, a remoção dos protozoários do lodo ativado acontece de maneira incompleta (CHAURET et al., 1995, GIBSON III et al., 1998). Santos et al. (2004a) obtiveram resultados semelhantes ao pesquisar a presença de cistos e

oocistos de uma companhia de tratamento de esgoto, os dados preliminares revelaram que *Giardia* spp. esteve presente em 93,5% das amostras de efluente tratado e *Cryptosporidium* spp., em 3,2%, confirmando a influência do desaguamento de esgotos nos mananciais mesmo após passarem por tratamento.

2.6. Ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água bruta superficial

Vários autores têm avaliado a presença de cistos e oocistos visando conhecer melhor as características locais dos mananciais e verificar a influência dos fatores bióticos e abióticos na ocorrência de ambos os protozoários, tais esforços podem resultar em dados relevantes para o gerenciamento das unidades hidrográficas e para o desenvolvimento ou aprimoramento das técnicas para detecção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (ONGERTH e STIBBS, 1987; MUSIAL et al., 1987; LeCHEVALLIER et al., 1991; CHAURET et al., 1995; DiGIORGIO et al., 2002; IONAS et al., 1998; HO e TAM, 1998; HSU et al., 2001; LEMARCHAND e LEBARON, 2003).

Os primeiros levantamentos da ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foram realizados a partir da década de 80 nos Estados Unidos. As amostras analisadas confirmaram a presença de cistos e oocistos na água bruta superficial em mananciais de várias regiões do país com elevados índices de positividade (alguns obtiveram 100,0% das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp.) e apresentaram uma concentração de *Giardia* spp. entre 0,01 e 112 cistos/l e de *Cryptosporidium* spp. variando entre 0,07 e 484 oocistos/l (ONGERTH e STIBBS, 1987; ONGERTH et al., 1995; LeCHEVALLIER et al., 1991; LeCHEVALLIER e NORTON, 1995).

Pesquisas realizadas ao redor do mundo também demonstraram a ubiquidade destes protozoários no ambiente aquático. Na Europa, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram detectados nos Rios Seine e Marne (França) em concentrações que variaram de 20 a 3.220 oocistos/100 l e de 40 a 6.125 cistos/100 l relacionadas à influência de descargas de esgoto (ROUQUET et al., 2000); Lemarchand e Lebaron (2003) relataram uma variação de 0,04 a 7,3

oocistos/l no Rio Tech. Na Alemanha, Kistemann et al. (2002) registraram um valor de até 12,40 cistos/100 l e 17,05 oocistos/100 l e associaram um efeito acentuado da precipitação pluviométrica na ocorrência dos protozoários.

As amostras de água bruta superficial analisadas na Escócia, Irlanda, Finlândia, Áustria e Rússia apresentaram positividade de 40,5%, 40,6%, 10,1%, 10,0% e 26,0% para *Cryptosporidium* spp., respectivamente (SMITH et al., 1991; SKERRETT e HOLLAND, 2000; HÖRMAN et al., 2004; HASSL et al., 2001; EGOROV et al., 2002). Os trabalhos que incluíram *Giardia* spp. nas análises obtiveram 46,6% (Reino Unido) e 30,0% (Rússia) (GILMOUR et al., 1991; EGOROV et al., 2002).

Na Ásia, no Oriente Médio e na África, pesquisadores também assinalaram a presença de cistos e oocistos em águas superficiais. Ho e Tam (1998) relataram a ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em três rios chineses em concentrações de até 100 cistos/l e 30 oocistos/l; estes resultados foram atribuídos principalmente à contaminação dos mananciais por efluentes domésticos não tratados, embora tenha sido raro encontrar *Cryptosporidium* spp. nas amostras (uma única amostra positiva em cada ponto). No sul de Taiwan, Hsu et al. (1999) obtiveram 80,0% de positividade para cistos e 60,0% para oocistos no Rio Kau-Ping, onde foi constatada também a contaminação por coliformes fecais (neste caso particular os autores obtiveram correlação entre a concentração dos protozoários e estes bioindicadores). Ono et al. (2001), estudando diversos rios na área de Kansai no Japão, obtiveram 47,4% de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp., sendo que em áreas de criação de gado essa porcentagem chegou a 100,0%. Na Malásia, Ahmad et al. (1997) não detectaram oocistos, apenas cistos de *Giardia* spp. em 80,0% das análises.

Em Israel, o trabalho de Zuckerman et al. (1997) indicou a presença de oocistos e cistos (80,0% e 53,3% das amostras, respectivamente) em fontes de água potável e em lago (66,6%, oocistos e 83,3%, cistos). Kfir et al. (1995), registraram a ocorrência de ambos os protozoários em concentrações médias de 6 oocistos/10 l e 30 cistos/10 l em 74,5% das análises de água bruta superficial na África do Sul. Ressalte-se que em outros países africanos essa porcentagem pode

ser maior em virtude do grande número de casos de pacientes HIV positivos e da má qualidade de vida em virtude de conflitos armados, dos baixos índices de saneamento básico e de oferta de água tratada à população (GELTMAN et al., 2003; UNAIDS, 2004).

Na Nova Zelândia, um levantamento feito por todo o país mostrou que *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. estão amplamente dispersos nos sistemas naturais de água, sendo detectados em 22,5% e 13,0% deles, respectivamente. Este resultado destaca a vulnerabilidade dos mananciais neozelandeses devido às atividades agropecuárias e a alta densidade de animais presentes nas proximidades de rios, lagos e outras fontes de água, além de uma alta incidência de criptosporidiose na população – 24,00 casos/100.000 habitantes – se comparada a de outros países: em média 7,50 casos/100.000 (IONAS et al., 1998; DUCANSON et al., 2000).

Estes protozoários foram encontrados em todas as Américas. No Canadá, a quantidade de amostras positivas variou de 14,0% a 88,9% para *Giardia* spp. e de 5,0% a 51,9% para *Cryptosporidium* spp. (ROACH et, 1993; ONG et al., 1996; WALLIS et al., 1996). Um estudo conduzido por LeChevallier et al. (1991) em 14 estados norte-americanos e um canadense, demonstrou a presença destes parasitos em amostras de água bruta superficial (cistos: 81,2%; oocistos: 87,0%), resultados que foram corroborados por outros autores (ONGERTH e STIBBS, 1987; LeCHEVALLIER e NORTON, 1995). Baseado no relato destes estudos e na ocorrência de alguns surtos é possível inferir que a distribuição de ambos protozoários seja maior (LEVINE et al., 1990; SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996; CRAUN et al., 1998; FAYER et al., 2000; BARWICK et al., 2000; LEE et al., 2002).

Solo-Gabriele et al. (1998), detectaram ambos os parasitos em todas as amostras analisadas em Honduras. Na Costa Rica, Luna et al. (2002) registraram 85,7% de positividade para *Cryptosporidium* spp..

Diante destes achados, é preciso ressaltar que os países considerados desenvolvidos também apresentam mananciais contaminados por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., uma vez que a ocorrência destes protozoários está

associada à ocupação humana existente ao longo das bacias hidrográficas, principalmente quando envolve atividades que podem ser consideradas fontes potenciais de cistos e oocistos, por exemplo: fazendas de gado leiteiro e outros, despejo de efluentes tratados e/ou sem tratamento e descarga combinada de resíduos (ONGERTH et al., 1995; STATES et al., 1997).

2.7. Ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água bruta superficial no Brasil

Os dados disponíveis sobre a ocorrência destes protozoários no Brasil provêm, especialmente de pesquisas científicas que demonstraram a presença de cistos (CANTUSIO NETO e FRANCO, 2004; SANTOS et al., 2004a/b; FRANCO et al., 2001a; DIAS JÚNIOR, 1999) e oocistos (FARIAS et al., 2002, GAMBA et al., 2000, MULLER, 2000; NEWMAN et al., 1993) em águas superficiais, subterrâneas, tratadas, de esgotos tratados parcialmente ou sem tratamento.

Oocistos estavam presentes em água potável proveniente do sistema de distribuição e de poço particular numa região da periferia de Fortaleza (Ceará). O método empregado foi o de concentração em filtro de cartucho e a detecção realizada por meio de coloração álcool-ácido resistente e imunofluorescência; no entanto, o baixo número de amostras positivas não permitiu a comparação entre as duas. A contaminação da água pode ter tido múltiplas causas por se tratar de uma área com infra-estrutura deficiente (núcleo de sub-moradias) e por contar com casos de criptosporidiose na população humana e animal do local (NEWMAN et al., 1993).

Em águas subterrâneas, no município de Itaquaquecetuba (São Paulo), oocistos foram encontrados por meio da técnica da concentração por floculação em carbonato de cálcio; a origem da contaminação provavelmente foi o contato com a água de esgoto doméstico proveniente de fossas sépticas (GAMBA et al., 2000).

Cryptosporidium spp. foi detectado em efluentes de esgoto, em córregos, em água bruta e tratada; as amostras foram recolhidas em pontos da cidade e da

região metropolitana de São Paulo e submetidas à floculação em carbonato de cálcio e filtração/dissolução em membrana (FARIAS et al., 2002; MULLER, 2000).

No estado de São Paulo, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) faz o monitoramento de alguns mananciais das unidades de gerenciamento de recursos hídricos do estado e os resultados deste trabalho mostram a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em vários rios utilizados para a captação de água para consumo e para recreação (HACHICH et al., 1999; CETESB, 2003; HACHICH et al., 2004).

No interior do estado de São Paulo, a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foi demonstrada em manancial da cidade de Araçatuba em 9,0% e 67,0%, respectivamente (DIAS JÚNIOR, 1999). No Rio Atibaia, ambos foram detectados por Franco et al. (2001a); nesta pesquisa as técnicas utilizadas foram filtração e dissolução em membrana: oocistos e cistos estavam presentes em todas as amostras. Os fatores mais relevantes para a contaminação do trecho do rio avaliado foram: o impacto causado pelo desaguamento de esgotos (com e sem tratamento) e as chuvas intensas que antecederam o estudo.

Santos et al. (2004a) pesquisaram o uso dos métodos de centrífugo-concentração e filtração para analisar amostras de esgotos brutos (afluentes) e tratados (efluentes) de uma Estação de Tratamento de Esgoto em Campinas e encontraram alta concentração de ambos protozoários (afluentes: $1,2 \times 10^5$ cistos/l, $6,0 \times 10^4$ oocistos/l; efluentes: $1,5 \times 10^3$ cistos/l, $1,6 \times 10^2$ oocistos/l).

É importante salientar que, em 1996, a prevalência de criptosporidiose e giardiose na população infantil na cidade de Campinas em crianças saudáveis de 0-3 anos de idade que freqüentavam creches urbanas, situava-se ao redor de 5,5% e 10,1%, respectivamente (FRANCO e CORDEIRO, 1996). Levantamentos recentes indicaram a prevalência de 9,7% de *Cryptosporidium* spp. em pacientes portadores do HIV neste município (BARALDI et al., 2004).

A Portaria 518/04, do Ministério da Saúde recomenda a inclusão da pesquisa de protozoários patogênicos em água tratada destinada ao consumo humano (BRASIL, 2004). No entanto, vários fatores podem dificultar o atendimento imediato à esta recomendação pelas companhias de tratamento de

água, como os altos custos dos protocolos validados pela USEPA (o Método 1623 tem um custo inicial de implantação de 3.800 dólares), a complexidade laboratorial inerente ao método, a necessidade de pessoal devidamente treinado (HSU et al., 2001) e a falta de informações disponíveis sobre a ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nos mananciais nacionais.

Atualmente, não há dados contínuos sobre a avaliação da ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras do Rio Atibaia, colhidas a intervalos regulares de tempo, existindo apenas registros pontuais (FRANCO et al., 2001a; HACHICH et al., 1999; HACHICH et al., 2004; CETESB, 2003). A obtenção de dados quinzenais pode fornecer informações importantes sobre a ocorrência destes protozoários no manancial estudado, pois é possível que variações cíclicas da concentração dos protozoários ocorram em função de fatores abióticos (turbidez, precipitação e variação climática estacional) e bióticos (contaminação por esgotos domésticos).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivos:

- Determinar a ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de água bruta superficial do Rio Atibaia, principal manancial que abastece a cidade de Campinas, durante um período de 12 meses, utilizando o método de filtração em membranas (de 47mm de diâmetro e 3 µm de porosidade nominal) e visualização por IFA dos cistos e oocistos, eventualmente presentes nas amostras;
- Avaliar o efeito do recebimento do desaguamento do Ribeirão Pinheiros no Rio Atibaia mediante a comparação e correlação entre os níveis de indicadores microbiológicos (coliformes totais e fecais), físico-químicos (pH, turbidez, cor) e climáticos (pluviosidade) e a concentração de cistos e oocistos em dois pontos significativos: à montante (A1) e à jusante (A2) do encontro do Ribeirão Pinheiros com o Atibaia, sendo que o segundo (A2) coincide com o ponto de captação da estação de tratamento de água do município de Campinas; e,
- Verificar a possível variação sazonal da ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nas águas superficiais do Rio Atibaia, frente às distintas estações do ano.

4. MATERIAL e MÉTODOS

4.1. Área de Amostragem

O Rio Atibaia é formado pela junção dos rios Atibainha e Cachoeira e pertence à Bacia do Rio Piracicaba que possui 12.746 km² de área de drenagem (SEMAE, 2002) (FIGURA 1). A sub-bacia do Atibaia é composta por 15 municípios: Atibaia, Joanópolis, Piracaia, Nazaré Paulista, Jarinu, Bragança Paulista, Bom Jesus dos Perdões, Itatiba, Valinhos, Campinas, Paulínia, Nova Odessa, Americana, Jaguariúna e Morungaba e tem uma área de drenagem de 2817,88 km² (CARMO, 2002). O uso da água na bacia é dividido em abastecimento público e industrial, irrigação de culturas, criação de animais, recreação e afastamento de efluentes domésticos e industriais, gerando uma grande demanda: somente o município de Campinas capta 92,0% da água utilizada para consumo deste rio (SANASA, 2004 CETESB, 2003).

O Rio Atibaia recebe diretamente esgotos domésticos e industriais como a carga poluidora dos municípios de Atibaia, Bom Jesus dos Perdões, Nazaré Paulista e Paulínia e indiretamente, por meio de seus afluentes como o Ribeirão Pinheiros que, por sua vez, recebe os efluentes de esgoto das cidades de Valinhos e Vinhedo (CHB-PCJ, 2000; CETESB, 2003).

O estudo levou em consideração os possíveis efeitos do desaguamento dos esgotos não tratados provenientes do Ribeirão Pinheiros na qualidade parasitológica da água do Rio Atibaia (FIGURA 2).

Assim, dois pontos foram selecionados: o primeiro (A1), está localizado nas imediações da Ponte do Padre Abel (46°57.37229'W; 22°54.67000'S) (FIGURA 3) à montante do Ribeirão Pinheiros e o segundo (A2), corresponde à entrada do ponto de captação na estação de tratamento de água (ETAs 3 e 4 da Sociedade de Abastecimento S/A, SANASA) (46°58.45311'W; 22°54.24449'S) e, por estes motivos, considerado estratégico neste estudo (FIGURA 4). Ambos localizam-se entre os quilômetros 123 e 124, da Rodovia Dom Pedro I, na divisa dos municípios de Valinhos e Campinas e distam cerca de 2,3 km entre si.

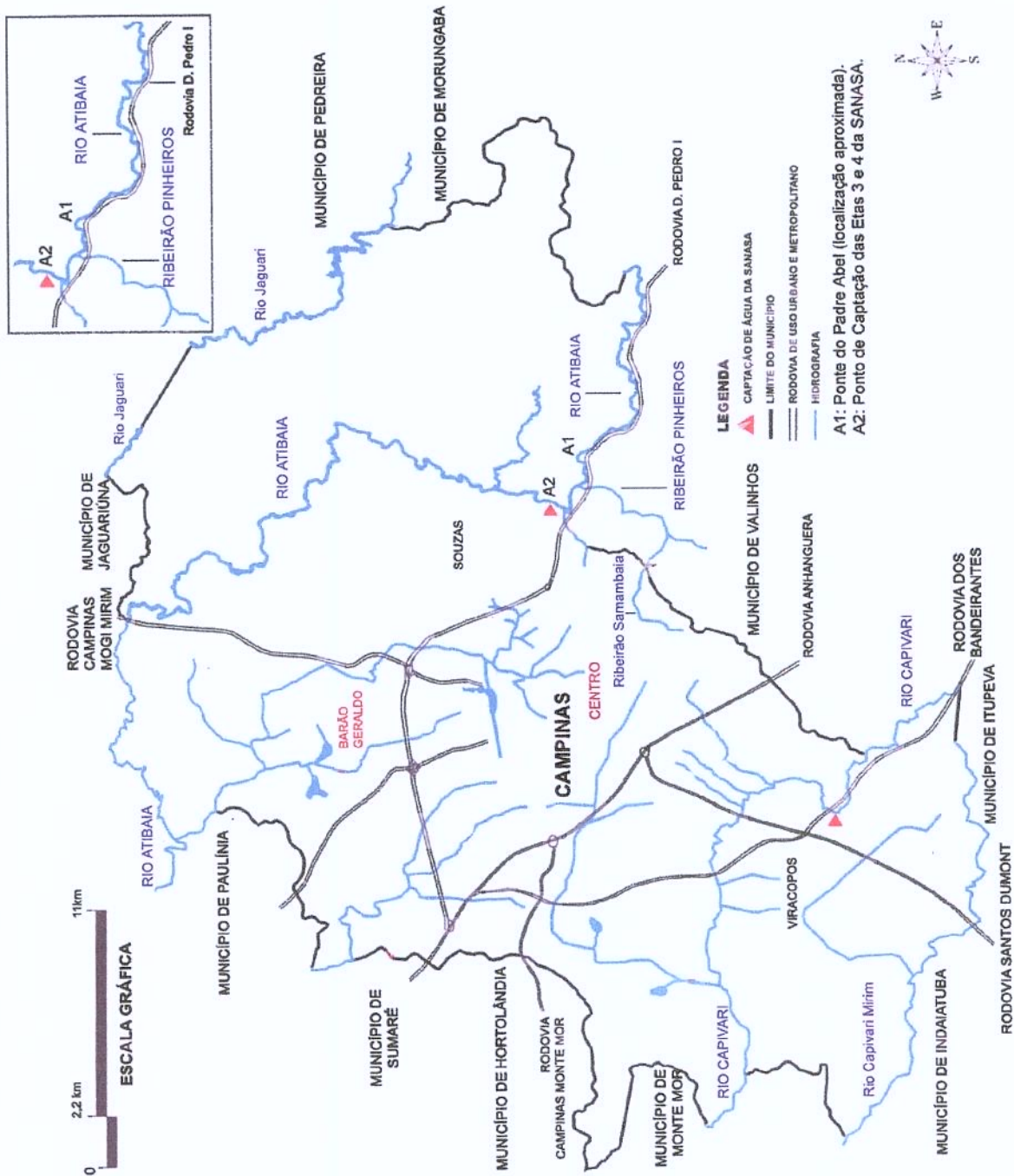


FIGURA 1: Área de Estudo, Rio Atibaia, Ribeirão Pinheiros e os pontos de coleta: A1 e A2.
FONTE: A cidade de Campinas e seus recursos hídricos, modificado (Folheto informativo: SANASA, 2005).

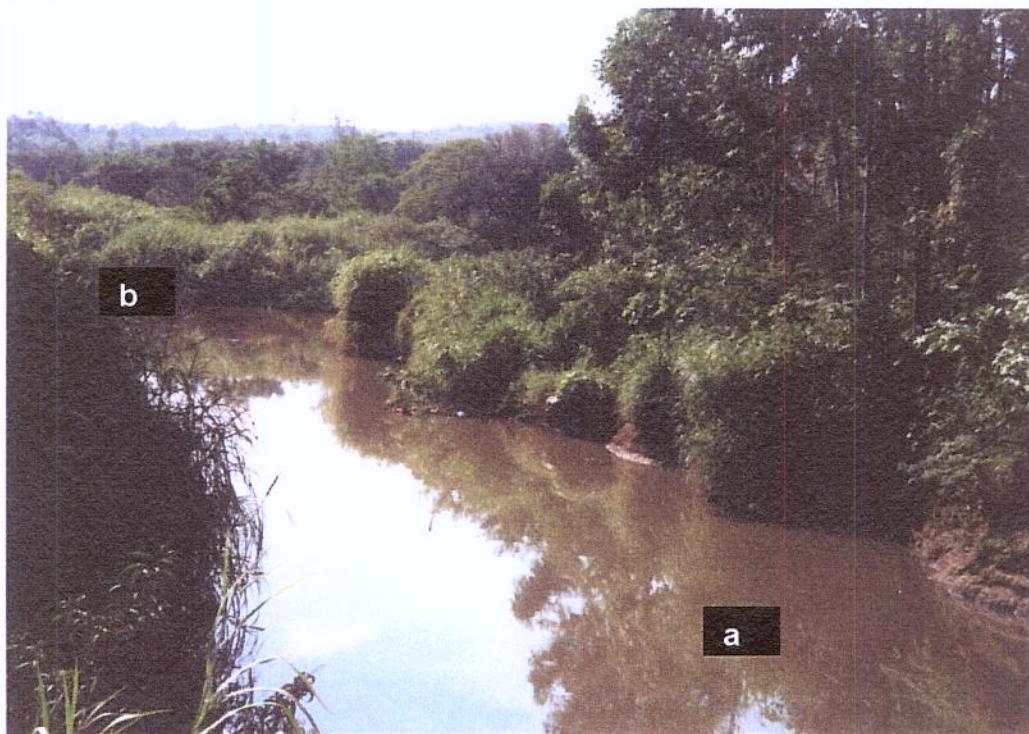


FIGURA 2: Junção das águas do Ribeirão Pinheiros (a) com o Rio Atibaia (b).

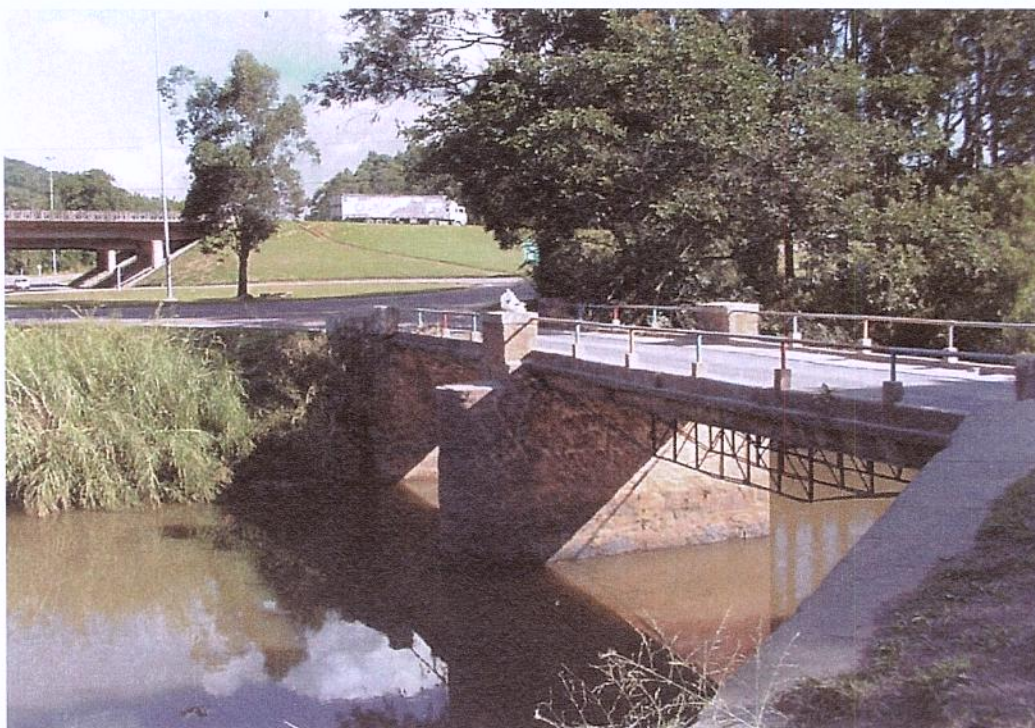


FIGURA 3: Rio Atibaia, Campinas. Ponte do Padre Abel: ponto A1.



FIGURA 4: Rio Atibaia, Campinas. Ponto de Captação da Estação de Tratamento de Água da SANASA: ponto A2.

4.2. Preparo do Material

Os recipientes plásticos utilizados para acondicionar as amostras de água foram previamente lavados com detergente, enxaguados em água de torneira por 30 minutos e tratados com a solução de eluição por 5 minutos a fim de evitar a possível adesão de cistos e oocistos à sua superfície. Depois de utilizados, foram descartados apropriadamente.

O frasco plástico (coletor) para recolher as amostras de água foi previamente lavado com solução de hipoclorito de sódio e detergente para retirada de eventuais resíduos e sujidades e, a seguir, enxaguado em água de torneira.

Após a obtenção de cada amostra, o frasco foi descontaminado com álcool 70° para remoção de agentes bacterianos ou virais e lavado com solução de eluição contendo água destilada e Tween 80 – 1,0% no local.

4.3. Obtenção das amostras

As amostras foram recolhidas durante 12 meses com a periodicidade de 15 dias, totalizando 50 espécimes.

Dois litros de água foram recolhidos sempre no mesmo horário do dia, por volta das 13 horas e a uma profundidade de até 20 cm da superfície; as amostras

foram transportadas em condições adequadas ao laboratório para posterior análise.

4.4. Exame Parasitológico da Água Bruta Superficial

4.4.1. Filtração

No mesmo dia em que foram recolhidas, as amostras foram submetidas à filtração em membranas de ésteres mistos de celulose (47 mm de diâmetro; porosidade nominal de 3 µm – Millipore®). O sistema de filtração utilizado foi o de bomba de pressão negativa, ajustada a um fluxo de filtração de 0,4 a 4 l/min e porta-filtro de vidro (Gelman®).

Após a filtração de cada amostra, o sistema foi descontaminado com etanol e posterior lavagem com água e detergente. As membranas contendo o material filtrado foram colocadas em placas plásticas de Petri (Millipore®) estéreis, onde foram submetidas aos procedimentos de eluição.

4.4.2. Procedimentos de Eluição e Concentração

As membranas foram eluídas mediante um protocolo combinado de extração mecânica (raspagem cuidadosa e suave da superfície da membrana evitando rompimentos e soltura das fibras utilizando alça plástica macia) e lavagens sucessivas com solução de eluição contendo água destilada e Tween 80 – 1,0%. Ambas as etapas foram executadas durante 20 minutos.

O líquido resultante deste procedimento foi submetido à centrifugação a 650 x g por 10 minutos; o sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento suspenso em solução de água destilada e Tween 80 – 1,0% e novamente centrifugado sob as mesmas condições. O produto final foi armazenado em tubo cônico, sendo mantido sob refrigeração por um período máximo de 24 horas, previamente à reação de imunofluorescência direta.

4.4.3. Reação de Imunofluorescência Direta - IFA

O sedimento final das amostras de água foi submetido à reação de imunofluorescência direta (IFA) para a visualização e enumeração de cistos e oocistos eventualmente presentes nas diversas preparações utilizando o kit Merifluor® (*Cryptosporidium/Giardia* - Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio).

Alíquotas de 5 µl foram distribuídas homogeneamente nos poços da lâmina, permanecendo por 30 minutos à temperatura ambiente e, a seguir, foram fixadas com 10 µl de metanol, durante 10 minutos.

Posteriormente, uma gota do “fluido de detecção” contendo os anticorpos monoclonais, foi colocada sobre cada poço, acrescentando-se rapidamente uma gota da “solução de contraste”. O material permaneceu ao abrigo da luz, à temperatura ambiente e em câmara úmida por 30 minutos, de acordo com as instruções do fabricante. Ao término deste tempo, o excesso de reagentes foi cuidadosamente retirado por meio de gotejamento da “solução tampão” (diluída a 1:20), também disponível no kit.

O material a ser examinado foi ordenado nas lâminas de tal forma que o controle negativo ficasse entre as amostras da suspensão do “controle positivo” e a da água bruta concentrada. Para a retirada do excesso de reagentes a preparação foi inclinada 45° evitando o possível contato entre os poços.

O teste confirmatório da morfologia foi feito mediante o uso de corante fluorogênico vital, DAPI (4'-6- diamidino-2-fenilindole - Sigma Chemicals®), concomitantemente à reação de imunofluorescência. Assim, após a retirada do excesso do fluido de detecção da IFA, 25 µl da solução diluída (2:5000) de DAPI foi acrescentada a cada poço, durante 5 minutos. Na sequência, a lâmina foi suavemente inclinada e o excesso, aspirado com pipeta automática.

Em seguida, o material passou por quatro lavagens consecutivas, sendo três com “solução tampão” diluída (10 µl) e uma com água destilada (10 µl), conduzidas durante um minuto e ao abrigo da luz. O excesso de líquido foi aspirado cuidadosamente.

Ao término das reações, a lâmina foi mantida em dessecador (contendo sílica gel) à temperatura ambiente por uma hora. Por fim, uma gota do “meio de montagem” foi colocada em cada poço antes da cobertura com lamínula. A preparação foi mantida sob refrigeração e ao abrigo da luz até o momento da análise.

4.4.4. Visualização

As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio de epifluorescência (Jenalumar – Carl Zeiss®), com filtros de excitação de 450-490 nm e 520 nm de barreira.

As estruturas que exibiram fluorescência em tonalidade verde-maçã, tamanho e forma equivalentes à descrição de cistos e oocistos e comparáveis às estruturas observadas no controle positivo da lâmina foram submetidas à leitura da reação com o DAPI em microscópio com filtros de excitação 365-400 nm e 395 nm de barreira (Zeiss-Axiolab®). A visualização em microscópio de contraste de fase também foi empregada. E em todos os casos foram utilizados aumentos de 250x e 400x.

4.5. Critérios de Positividade

Os critérios para a identificação de oocistos e cistos levaram em consideração os seguintes indicadores:

- a) Imunofluorescência: fluorescência definida pela cor verde-maçã brilhante (comparável àquela exibida por mais de 50% de cistos e oocistos presentes nas suspensões de “controles positivos”); ausência de poros ou apêndices; tamanho e formato compatíveis: 8-12 µm de tamanho e forma oval para os cistos de *Giardia* spp. e, 4-6 µm de diâmetro, formato esférico e presença (não obrigatória) de sutura no oocisto - para *Cryptosporidium* spp..
- b) Contraste de fase: axonema e núcleos (um a quatro) para cistos; presença das estruturas internas, sutura para oocistos.
- c) Teste confirmatório – DAPI: presença de quatro núcleos distintos ou axonema, de cor azul-céu intensa, no interior de um único cisto/oocisto.

4.6. Equação da Concentração de Cistos e Oocistos

A estimativa do número de cistos e oocistos por litro (concentração = X) levou em consideração o volume efetivamente filtrado da amostra (l), do sedimento obtido após a etapa de concentração e eluição (µl) e da alíquota submetida à IFA (µl).

O cálculo foi feito de acordo com a seguinte equação:

$$X = \frac{n}{k} \times \frac{S}{A} \quad (1)$$

Onde:

X = concentração de cistos/oocistos;

n = número de cistos/oocistos;

k = constante, μl ($k = 5$);

S = volume do sedimento obtido (μl);

A = volume da amostra filtrada (l).

4.7. Experimentos Controle

Com a finalidade de conhecer a sensibilidade do procedimento, experimentos controles positivos e negativos foram efetuados. Para isso, cistos e oocistos provenientes do kit Merifluor® foram utilizados, sendo enumerados e inoculados em água destilada.

A enumeração inicial de ambos protozoários (previamente à inoculação) foi feita diretamente na lâmina de imunofluorescência e, para cálculo da dose de cistos e oocistos a serem inoculados, levou-se em consideração o número médio de cistos/oocistos a partir da contagem de três alíquotas da suspensão “controle positivo” do kit, colocadas, respectivamente, nos três poços da lâmina de IFA.

Controle positivo: Um litro de água destilada foi artificialmente contaminado com uma quantidade estimada de 22 cistos e 270 oocistos (a partir da enumeração inicial como descrito acima) e submetido aos procedimentos de filtração, eluição, concentração e visualização referentes às demais amostras exceto a reação com DAPI.

Controle negativo: Um volume de 500ml de água reagente foi examinado de acordo com todas as etapas referentes à análise parasitológica, de maneira intercalada às amostras de água do ponto A1 e as do ponto A2. Assim, o controle negativo serviu como indicativo de possível contaminação do equipamento utilizado e das condições presentes no laboratório durante a manipulação do material de estudo.

4.8. Equação da Eficiência de Recuperação do Método

A eficiência de recuperação foi estimada por:

$$Y = \frac{r}{i} \quad (2)$$

Onde:

Y = eficiência de recuperação;

r = número de cistos/oocistos recuperados;

i = número de cistos/oocistos inoculados.

4.9. Exame Microbiológico das Amostras de Água Bruta

Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram determinados no laboratório de Microbiologia da SANASA, de acordo com metodologia descrita no "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th" (APHA, 1998).

A análise de coliformes foi realizada mediante a técnica de tubos múltiplos, segundo as normas da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB: NT L5.202, 1993). Os parâmetros físico-químicos foram mensurados nos seguintes equipamentos: turbidímetro (HACH), espectrofotômetro (DR 2500 – HACH) e peagômetro (DIGIMED) para a determinação da turbidez, da cor e do pH, respectivamente.

4.10. Dados Climáticos

Os dados climáticos foram obtidos junto ao Centro de Ensino e Pesquisa em Agricultura – CEPAGRI – Unicamp.

4.11. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados com o emprego de estatística descritiva e analítica, incluindo teste "t de Student", para a comparação entre a concentração de cistos e oocistos nos dois pontos; análise de correlação de *Pearson* entre os parâmetros físico-químicos e biológicos estudados e análise de variância para determinar a influência das estações do ano em relação à concentração de cistos e oocistos, coliformes totais, coliformes fecais, turbidez e pluviosidade. O programa estatístico utilizado foi SPSS, v.12.0.

5. RESULTADOS

5.1. Experimentos-controle

A eficiência de recuperação média obtida durante os experimentos-controle positivos ($n = 3$) foi de 72,72% para *Giardia* spp. e de 65,18% para *Cryptosporidium* spp. (TABELA 1).

Em todos os experimentos-controle negativos realizados ($n = 25$) durante o estudo, cistos e oocistos não foram encontrados.

TABELA 1: Eficiência de recuperação do método de filtração em membrana.

Número do Controle	Tipo de Água	Volume de água inoculado (ml)	Número de Organismos Visualizados**		Eficiência de Recuperação (%)	
			<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.
I	Destilada	1.000	19	231	86,3	85,5
II	Destilada	1.000	19	130	86,3	48,1
III	Destilada	1.000	10	167	45,4	61,8

**Foram inoculados 22 cistos de *Giardia* spp. e 270 oocistos de *Cryptosporidium* spp. a cada experimento.

5.2. Amostras de Água Bruta do Rio Atibaia

No período compreendido entre março de 2002 a abril de 2003, foram recolhidas 25 amostras de água bruta superficial do rio Atibaia, dos pontos A1 e A2, respectivamente. O volume de água efetivamente filtrado foi de 500 ml para todas as amostras e o volume do sedimento final, após os processos de eluição e concentração, variou entre 25 μ l e 165 μ l, dependendo da turbidez da água analisada (TABELAS 3 e 4).

Ponto A1: A positividade das amostras foi de 52,0% (13+/25) para cistos de *Giardia* spp. cuja concentração média foi de 25,12 cistos/l (DP = 33,43; variação de 16 – 136) (FIGURA 5). Oocistos de *Cryptosporidium* spp. não foram detectados nas amostras neste ponto (TABELA 2). Quanto aos parâmetros físico-químicos, os valores médios foram para a turbidez: 53,76 NTU (DP = 59,65; variação de 12 – 279); pH, 7,0 (DP = 0,45; variação de: 5,8 a 7,8) e cor, 274,56 mg Pt – Co/L (DP = 316,96; variação de 68 – 1491) (TABELA 3).

TABELA 2: Concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água bruta superficial do Rio Atibaia – Pontos A1 e A2, Campinas, SP, Brasil (Março de 2002 a Abril de 2003).

Datas	<i>Giardia</i> (cistos/l)	<i>Cryptosporidium</i> (oocistos/l)	<i>Giardia</i> (cistos/l)	<i>Cryptosporidium</i> (oocistos/l)
	A1	A1	A2	A2
23/04/02	ND*	ND	32	ND
07/05/02	ND	ND	130	ND
21/05/02	ND	ND	240	ND
04/06/02	136	ND	90	ND
18/07/02	ND	ND	40	ND
02/07/02	80	ND	44	ND
16/07/02	28	ND	14	ND
30/07/02	60	ND	88	ND
13/08/02	ND	ND	42	ND
27/08/02	ND	ND	42	ND
10/09/02	56	ND	ND	ND
24/09/02	44	ND	66	ND
08/10/02	54	ND	144	ND
22/10/02	ND	ND	60	ND
05/11/02	30	ND	ND	ND
19/11/02	24	ND	182	ND
03/12/02	20	ND	ND	ND
17/12/02	40	ND	20	20
30/12/02	16	ND	22	ND
14/01/03	ND	ND	168	ND
28/01/03	ND	ND	124	ND
11/02/03	ND	ND	ND	ND
25/02/03	ND	ND	ND	ND
11/03/03	40	ND	56	ND
25/03/03	ND	ND	ND	ND

*ND = não detectado

TABELA 3: Parâmetros físicos, químicos e microbiológicos e volume do sedimento da água bruta superficial do Rio Atibaia no ponto A1, Campinas, SP, Brasil (Março de 2002 a Abril de 2003).

Datas	Sedimento (μ l)	Turbidez (NTU)	pH	Cor mg Pt-Co/l	Coliformes totais NMP/100ml	Coliformes fecais NMP/100ml	Pluvios. pontual (mm)
23/04/02	45	17	6,6	82	$8,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	0,0
07/05/02	45	17	6,4	90	$1,7 \times 10^4$	$2,7 \times 10^3$	7,3
21/05/02	80	16	6,3	83	$5,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$	20,2
04/06/02	85	26	6,2	138	$2,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$	0,0
18/07/02	35	14	6,5	83	$1,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	0,0
02/07/02	50	16	7,3	81	$1,3 \times 10^4$	$4,0 \times 10^2$	0,0
16/07/02	35	12	7,5	74	$7,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$	0,0
30/07/02	75	90	7,3	464	$3,3 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	0,0
13/08/02	45	121	6,6	692	$2,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	0,0
27/08/02	35	27	7,0	77	$7,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	0,2
10/09/02	35	21	6,9	68	$1,7 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	0,0
24/09/02	55	18	6,4	84	$1,3 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	0,0
08/10/02	65	15	7,1	75	$5,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	0,0
22/10/02	65	52	6,8	297	$2,1 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	6,4
05/11/02	75	26	7,7	128	$8,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	24,0
19/11/02	60	29	7,4	151	$3,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$	25,6
03/12/02	50	76	7,7	381	$5,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$	0,0
17/12/02	50	18	7,3	62	$2,4 \times 10^4$	$9,0 \times 10^2$	0,8
30/12/02	40	135	7,0	660	$2,4 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	0,0
14/01/03	135	121	7,7	540	$3,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	18,6
28/01/03	85	279	7,2	1491	$2,2 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	15,4
11/02/03	35	51	7,1	261	$7,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	0,0
25/02/03	25	43	7,0	234	$5,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	0,0
11/03/03	100	62	6,8	346	$1,7 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	6,2
25/03/03	25	42	7,5	222	$2,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	0,0

TABELA 4: Parâmetros físicos, químicos e microbiológicos e volume do sedimento da água bruta superficial do rio Atibaia no ponto A2, Campinas, SP, Brasil (Março de 2002 a Abril de 2003).

Datas	Sedimento (µl)	Turbidez (NTU)	pH	Cor mg Pt-Co/l	Coliformes totais NMP/100ml	Coliformes fecais NMP/100ml	Pluvios. pontual (mm)
23/04/02	40	26	6,7	125	$2,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	0,0
07/05/02	65	19	6,1	101	$1,1 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	7,3
21/05/02	100	19	6,2	131	$1,7 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	20,2
04/06/02	75	23	5,8	127	$6,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	0,0
18/07/02	25	15	6,4	80	$1,7 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	0,0
02/07/02	55	15	7,4	69	$1,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	0,0
16/07/02	35	13	7,3	65	$9,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$	0,0
30/07/02	55	33	7,1	185	$3,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	0,0
13/08/02	35	54	6,4	295	$1,7 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	0,0
27/08/02	35	18	6,7	77	$3,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	0,2
10/09/02	45	26	6,7	122	$1,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	0,0
24/09/02	55	27	6,9	135	$9,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	0,0
08/10/02	45	56	7,2	377	$2,6 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	0,0
22/10/02	75	255	6,3	350	$2,6 \times 10^4$	$9,0 \times 10^4$	6,4
05/11/02	165	29	7,5	161	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	24,0
19/11/02	65	63	7,3	344	$9,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	25,6
03/12/02	75	168	7,1	915	$9,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	0,0
17/12/02	50	17	7,2	60	$2,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	0,8
30/12/02	55	17	7,2	60	$2,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	0,0
14/01/03	105	192	7,8	990	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	18,6
28/01/03	155	129	7,2	702	$2,2 \times 10^5$	$9,0 \times 10^3$	15,4
11/02/03	45	60	7,1	309	$2,2 \times 10^5$	$9,0 \times 10^3$	0,0
25/02/03	20	46	7,4	267	$5,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	0,0
11/03/03	70	100	6,5	549	$2,6 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$	6,2
25/03/03	25	40	7,1	226	$7,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	0,0

A análise microbiológica mostrou que a quantidade média de coliformes totais e fecais foi de $5,8 \times 10^4$ NMP/100ml (DP = $8,6 \times 10^4$; variação de $1,7 \times 10^3 - 3,0 \times 10^5$) e de $1,1 \times 10^4$ NMP/ml (DP = $2,1 \times 10^4$; variação de $4,0 \times 10^2 - 9,0 \times 10^4$), respectivamente (TABELA 3).

Ponto A2: Cistos de *Giardia* spp. estiveram presentes em 76,0% (19+/25) das amostras e oocistos de *Cryptosporidium* spp., em 0,04% (1+/25) delas (FIGURA 5). A concentração média de *Giardia* spp. foi de 64,16 cistos/l (DP =

66,19; variação de 14 – 240) e de *Cryptosporidium* spp., 0,8 oocistos/l (TABELA 2).

A turbidez média foi de 58,4 NTU (DP = 63,12; variação de 17 – 255), a média do pH foi de 6,9 (DP = 0,499; variação de 5,8 – 7,8) e a da cor, 272,88 mg Pt – Co/L (DP = 259,70; variação de 60 – 990) (TABELA 4).

A quantidade média de coliformes totais foi de $6,6 \times 10^7$ NMP/100ml (DP = $3,2 \times 10^8$; variação de $5,0 \times 10^4$ – $1,6 \times 10^9$) e de coliformes fecais foi de $6,44 \times 10^7$ NMP/ml (DP = $3,2 \times 10^8$; variação de $9,0 \times 10^3$ – $1,6 \times 10^9$) (TABELA 4).

Durante o período de estudo, em ambos os pontos, a precipitação pluviométrica apresentou os seguintes valores*: verão, 689,1 mm; outono, 195 mm; inverno, 126,2 mm e primavera, 349,5 mm.

5.3. Análise Estatística

Teste t de Student: A comparação da concentração de cistos entre os dois pontos analisados revelou diferença significativa entre eles ($p = 0,04$; $\alpha = 0,05$).

Análise de Correlação: Houve correlação entre os seguintes parâmetros: coliformes totais e fecais (pontos A1 e A2); índices pluviométricos e concentração de cistos no ponto A2, mas não no A1; turbidez e índices microbiológicos no ponto A1 (TABELA 5).

Não houve correlação entre a concentração de cistos e os seguintes parâmetros: coliformes totais, fecais e turbidez (TABELA 5).

Análise de Variância: Em relação à sazonalidade, não houve diferença significativa entre as estações e as variáveis: concentração de cistos e estações do ano ($F = 2,868$; $P = 0,05$); coliformes totais ($F = 4,940$; $P = 0,05$); coliformes fecais ($F = 4,951$; $P = 0,05$) e pluviosidade ($F = 5,104$; $P = 0,05$). A turbidez apresentou variação entre os períodos de verão e inverno ($p = 0,016$; $\alpha = 0,05$), verão e outono ($p = 0,006$; $\alpha = 0,05$).

* Deve-se considerar tais valores aproximados, pois a medição representa uma área de no máximo 100 metros de raio do Posto Meteorológico.

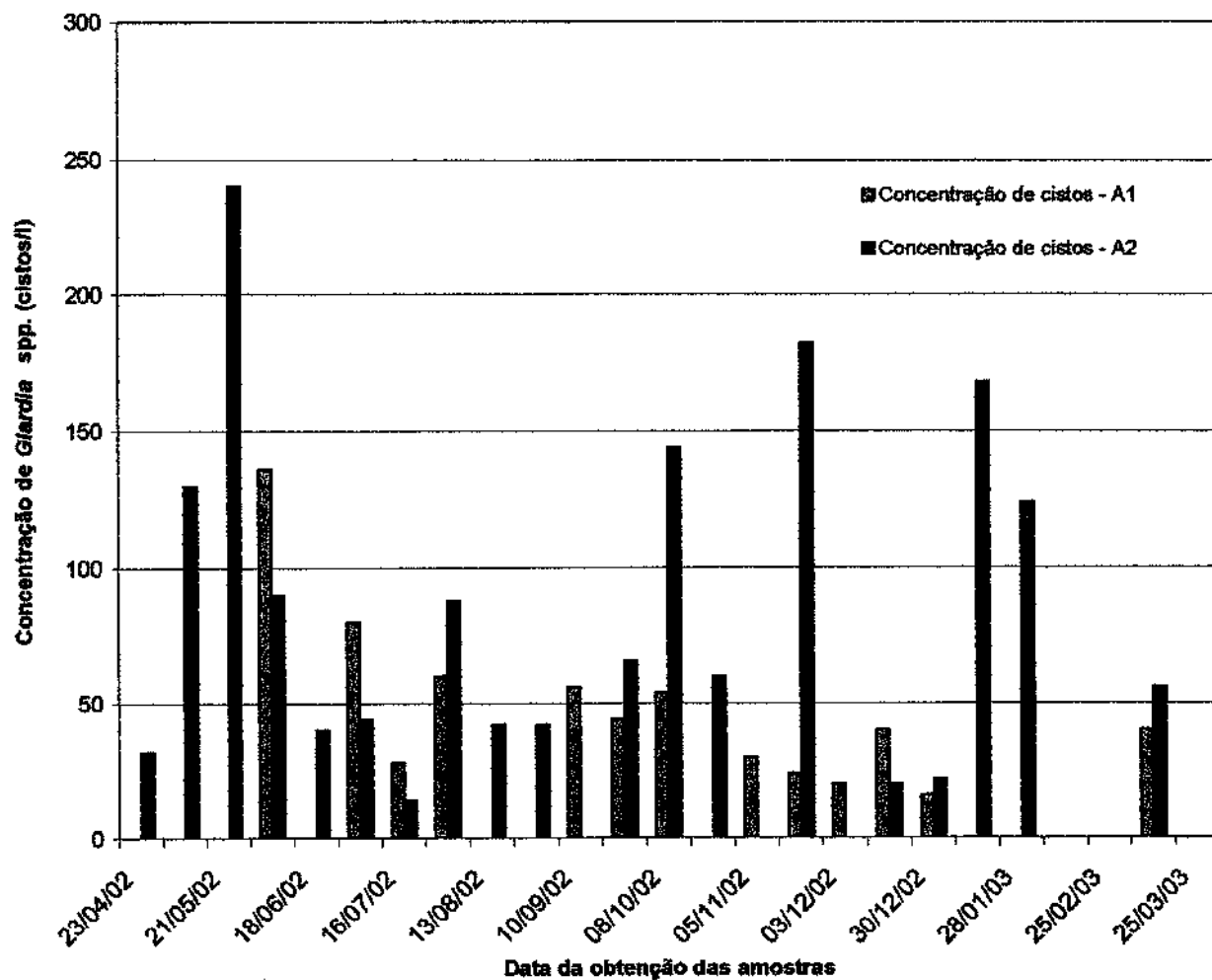


Figura 5: Gráfico da concentração de cistos de *Giardia* spp. na água bruta superficial do Rio Atibaia, Campinas, Brasil (Março de 2002 a Abril de 2003).

TABELA 5: Correlação* entre a concentração de cistos de *Giardia* spp., turbidez, coliformes fecais, coliformes totais e pluviosidade nos pontos A1 e A2, Campinas, SP, Brasil (Março de 2002 a Abril de 2003).

Parâmetros	Ponto	Turbidez (NTU)	Coliformes totais (NMP/100ml)	Coliformes fecais (NMP/100ml)	Pluviosidade (mm)
<i>Giardia</i> spp. (cistos/l)	A1	$r = -0,252$; $p = 0,224$	$r = -0,276$; $p = 0,0181$	$r = -0,252$; $p = 0,224$	$r = -0,223$; $p = 0,285$
	A2	$r = -0,055$; $p = 0,795$	$r = -0,201$; $p = 0,335$	$r = -0,201$; $p = 0,334$	$r = 0,611$; $p = 0,001$
Turbidez (NTU)	A1	—	$r = 0,694$; $p = 0,000$	$r = 0,750$; $p = 0,000$	$r = 0,197$; $p = 0,346$
	A2	—	$r = -0,087$; $p = 0,679$	$r = -0,086$; $p = 0,682$	$r = 0,010$; $p = 0,962$
Coliformes totais NMP/100ml	A1	—	—	$r = 0,602$; $p = 0,001$	$r = 0,284$; $p = 0,169$
	A2	—	—	$r = 1,000$; $p = 0,000$	$r = 0,467$; $p = 0,019$
Coliformes fecais NMP/100ml	A1	—	—	—	$r = 0,275$; $p = 0,183$
	A2	—	—	—	$r = 0,467$; $p = 0,019$
	A2	—	—	—	—

*r: coeficiente de correlação; p: nível de significância.

6. DISCUSSÃO

Os problemas relacionados à escassez e à qualidade dos mananciais de água doce constituem uma preocupação crescente em todo o mundo, inclusive no Brasil, principalmente nas regiões metropolitanas porque podem prejudicar a oferta e distribuição da água, além de trazer prejuízo para a saúde da população (VASCONCELOS, 2002). As enfermidades causadas pela água contaminada comprovam o quanto é necessário o acesso à água tratada adequadamente: a cada ano, ocorrem cerca de 3,4 milhões de óbitos e mais de 30 milhões de casos de doenças de veiculação hídrica (BRUNDTLAND, 2002).

No Brasil, ainda é uma prática comum o despejo de esgoto doméstico *in natura* nos corpos d'água, cerca de 52,2% dos municípios possuem rede de esgotamento sanitário, mas somente 20,2% tratam o esgoto (IBGE, 2000). O município de Campinas possui redes de afastamento e coleta de esgotos em 88,0% dos domicílios, mas trata apenas 14,0% do esgoto doméstico produzido (SANASA, 2004; SANTOS et al., 2004b).

No caso da Bacia do Rio Piracicaba, a demanda crescente de água em função do aumento da população e do desenvolvimento econômico, é incompatível com o volume disponível destes recursos, principalmente porque a qualidade de vários mananciais está comprometida. A área da bacia possui um expressivo número de indústrias e produção agrícola bastante intensa (CARMO, 2002); estas características são comuns à região do Rio Atibaia, responsável pelo abastecimento da Região Metropolitana de Campinas e outras cidades próximas (CARMO, 2002; SANASA, 2004; SEMAE, 2002). Ao longo dos últimos anos, este manancial vem sofrendo intensa atividade antrópica, destacando-se a ocupação imobiliária e práticas agrícolas (que têm contribuído para o aumento da quantidade de material particulado proveniente de processos erosivos e do escoamento superficial) (SIVIERO, 1999; SIVIERO, 2003) e a disposição de resíduos industriais e domésticos (que chegam aos cursos d'água com tratamento parcial ou ausente, sobretudo nas áreas de maior concentração populacional, como no município de Campinas) (KRUSCHE et al., 2002).

O Ribeirão Pinheiros recebe esgotos não tratados de cidades vizinhas, além do efluente da Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) Samambaia/Campinas e, deságua no rio à montante do ponto de captação (A2) de água pela companhia de abastecimento do município de Campinas, considerado estratégico neste estudo.

Os altos índices de coliformes totais e fecais (TABELAS 3 e 4), atestaram a contaminação da água e refletiram as más condições da qualidade deste manancial, principalmente após o recebimento do Ribeirão Pinheiros. Ao compararmos a qualidade da água do Rio Atibaia, em relação à presença de cistos, verificamos que a mesma é fortemente influenciada pelo desaguamento do ribeirão como demonstra a maior concentração de cistos no ponto A2 em relação ao A1 ($p = 0,011$). Além disso, já foi documentado que este ponto apresenta, em alguns momentos, uma diminuição do oxigênio dissolvido, aumento da demanda bioquímica de oxigênio, nitratos e coliformes, parâmetros que indicam perda da qualidade da água (KRUSCHE et al., 1997; KRUSCHE et al., 2002).

A presença de bactérias do grupo “coliformes” (totais e fecais) é amplamente empregada para indicar contaminação em ambientes e sistemas aquáticos (ROMPRÉ et al., 2002), entretanto, estes microrganismos não são considerados indicadores obrigatórios da presença de cistos de *Giardia* spp. e/ou oocistos de *Cryptosporidium* spp. (FRICKER E CRABB, 1998), sendo que a correlação entre a ocorrência de coliformes e destes protozoários patogênicos ainda é um aspecto controverso, pois enquanto alguns estudos apontam esta correlação (LEMARCHAND e LEBARON, 2003; HSU et al., 1999; ATHERHOLT et al., 1998; AHMAD et al., 1997; LECHEVALLIER et al., 1991), outros não obtiveram o mesmo resultado (CARRARO et al., 2000; ROUQUET et al., 2000; HO e TAM, 1998); também, nesta investigação não houve correlação entre cistos e coliformes totais/ fecais, em ambos os pontos (A1 e A2). No entanto, é importante mencionar que “... a relação entre estes indicadores e a ocorrência de cistos e oocistos pode variar de um sistema aquático para outro e também em locais diferentes em um mesmo manancial...” (CHAURET et al., 1995).

Quanto à presença de *Giardia* spp. no Rio Atibaia, a concentração de cistos observada no ponto A2 (TABELA 1) foi alta assim como os dados obtidos pela CETESB, em levantamento que incluía o ponto de captação (A2) no qual, Hachich et al. (1999) relataram uma concentração máxima de 521 cistos/l. É importante enfatizar que a comparação entre diversos estudos é dificultada em função das diferentes metodologias empregadas e da grande variabilidade inter-laboratorial no que tange a recuperação de cistos e oocistos (FRICKER e CRABB, 1998). Além disso, outro fator que pode ter contribuído para a diminuição da concentração de cistos de *Giardia* spp. neste ponto foi o início do funcionamento (julho de 2001) da ETE Samambaia cujo efluente tratado chega ao Ribeirão Samambaia e posteriormente ao Ribeirão Pinheiros; o tratamento do esgoto doméstico desta área atende a 4,1% da população de Campinas (39.892 habitantes) (SANASA, 2004). A ocorrência de *Giardia* spp. não apresentou variação sazonal durante o período de estudo o que é coerente com as características climáticas regionais cujas diferenças estacionais não são tão acentuadas em Campinas (CEPAGRI, 2004).

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em uma amostra proveniente do ponto A2, na concentração de 20 oocistos/l (TABELA 2). Este achado ocorreu no início do verão depois de pesadas chuvas que caíram anteriormente ao dia desta coleta. Situações semelhantes, nas quais oocistos foram detectados após forte precipitação pluviométrica também foram relatadas por outros autores (KISTEMANN et al., 2002; SKERRETT e HOLLAND, 2000; FERGUNSON et al., 1996) e, segundo ATHERHOLT et al., (1998), as chuvas contribuem para aumentar a concentração de cistos e oocistos pelo acréscimo da quantidade de material particulado devido ao revolvimento de sedimentos; por outro lado, cistos e oocistos podem, dada a sua grande capacidade de sobrevivência ambiental e de adesão às partículas presentes na água, acumularem-se no leito do rio, de modo que as chuvas, principalmente aquelas que ocorrem no início do verão, podem originar altas concentrações do organismo no manancial. Ressalte-se que os fenômenos de adesão exibidos por cistos e oocistos são um importante fator na epidemiologia ambiental de *Giardia* spp. e

Cryptosporidium spp. (KISTEMANN et al., 2002; ROSE et al., 2002; NEWMAN et al., 1993; GILMOUR et al., 1991).

A correlação existente entre coliformes totais/ fecais e a pluviosidade (TABELA 5) e entre concentração de cistos e pluviosidade no ponto A2 reflete claramente o papel das chuvas na qualidade microbiológica e parasitológica do Rio Atibaia e a influência do desaguamento do Ribeirão Pinheiros neste manancial.

Em relação às diferentes estações do ano, houve variação da turbidez (verão/outono; verão/inverno; $p = 0,05$); tal resultado era esperado uma vez que existem diferenças na taxas de pluviosidade em cada um destes períodos: no verão, época das chuvas, há maior quantidade de partículas em suspensão e, no outono/inverno, em função da estiagem prolongada que atinge usualmente a região de Campinas, o teor de material particulado suspenso no manancial é menor.

Algumas das amostras analisadas apresentaram alterados os parâmetros de cor, pH e turbidez (referentes ao ponto A2) (TABELA 3); tais alterações confirmam a contribuição exercida pontualmente pelo Ribeirão Pinheiros na deterioração da qualidade de água do Atibaia e sua possível interferência nos processos de autodepuração natural desse manancial (FIGURA 2).

Apesar dos valores de turbidez terem variado de 12 a 279 NTU nas amostras analisadas, as preparações finais permitiram a identificação dos organismos sem que houvesse interferência como fluorescência residual ou compactação de sujidades que poderiam obscurecer e dificultar a visualização dos cistos e oocistos (FIGURAS 6 e 7).

Assim, considerando que a recuperação laboratorial destes protozoários é dependente das características da água a ser analisada, introduziu-se modificações em relação ao método de filtração em membrana originalmente descrito por Franco et al. (2001b) visando reduzir a possível perda de organismos por meio da alteração da solução de eluição (utilizando água destilada ao invés de PBS), de modo a diminuir as interações entre a carga superficial de cistos e oocistos e o meio (THOMAS et al., 2001); da utilização de membranas de ésteres

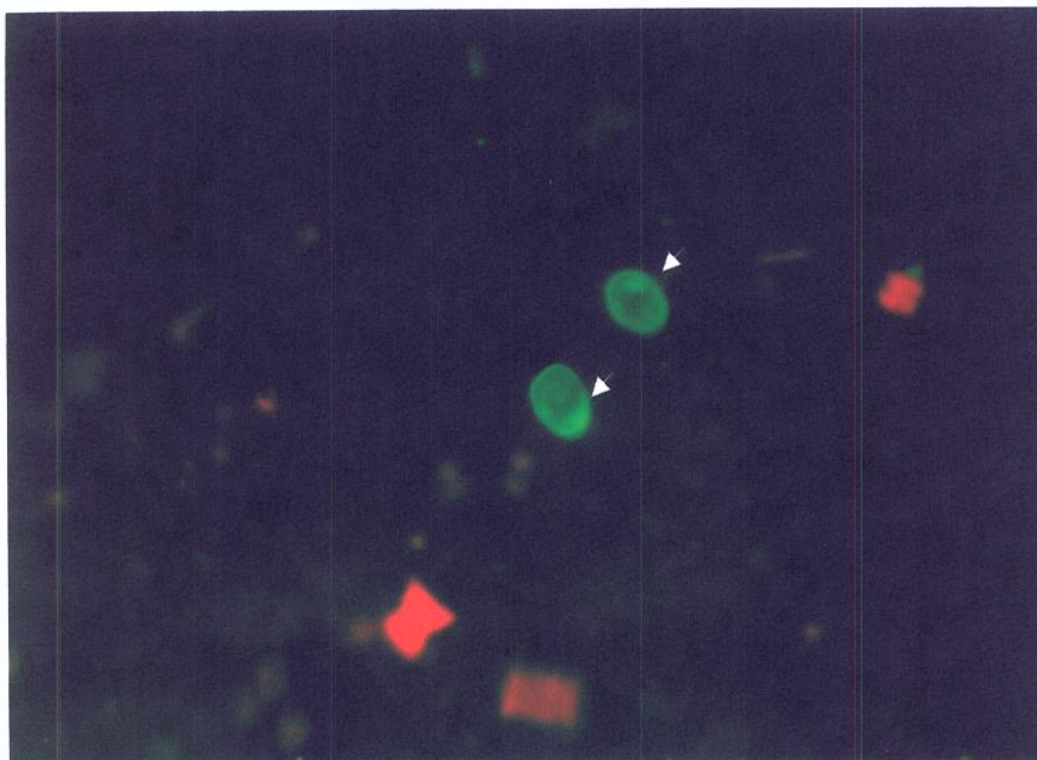


FIGURA 6: Cistos de *Giardia* spp. em amostra da água bruta do Rio Atibaia, ponto A2. Aumento: 400x.

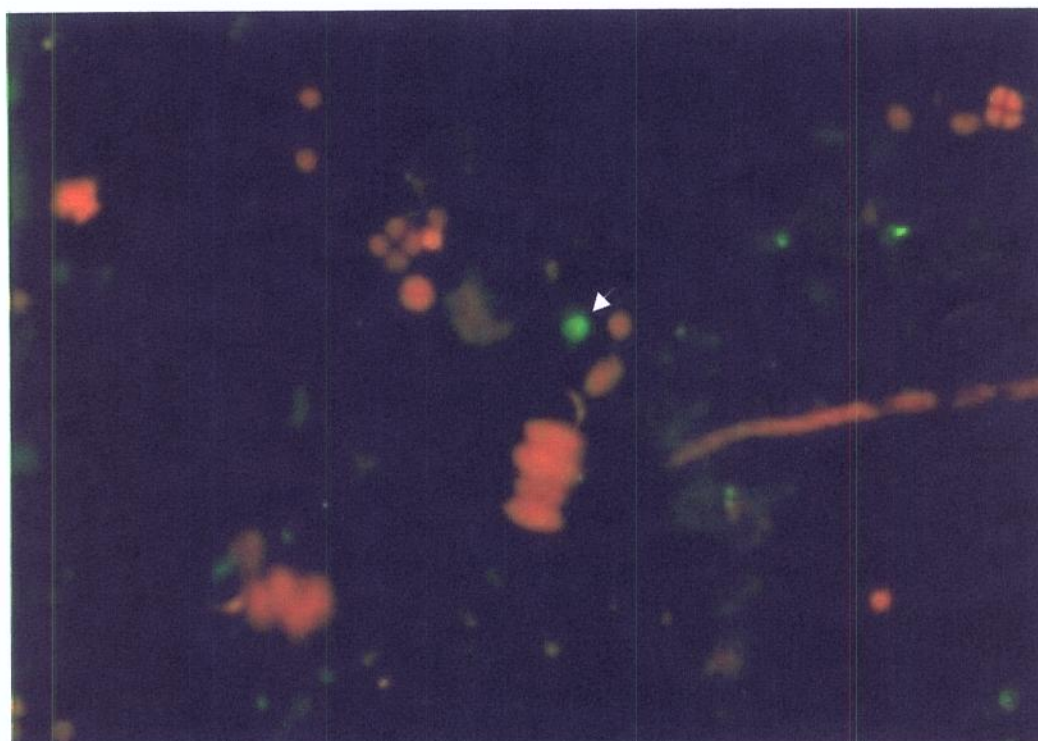


FIGURA 7: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. em amostra da água bruta do Rio Atibaia, ponto A2. Aumento: 400x.

de celulose devido à sua maior maciez, resistência e facilidade de manuseio (SHEPHERD e WYN-JONES, 1996) o que garantiu boa eficiência de recuperação nos experimentos – controle: 72,7% para *Giardia* spp. e 65,9% para *Cryptosporidium* spp. (TABELA 1). Franco et al. (2001a) empregando cistos e oocistos purificados obtiveram um resultado semelhante com taxas de recuperação para *Giardia* spp. entre 33,0% a 95,0% e para *Cryptosporidium* spp.: 44,5% a 100,0%.

Por estes motivos, é pouco provável que os resultados negativos para a presença de *Cryptosporidium* spp. neste estudo sejam devidos à metodologia empregada. Estes dados são semelhantes aos resultados apresentados pela CETESB (2003) nos quais oocistos de *Cryptosporidium* spp. não foram detectados neste manancial, utilizando o método 1623 (separação imunomagnética) (USEPA, 1999).

É importante enfatizar que não há uma única metodologia que seja apropriada em todas as situações e que apresente um desempenho reprodutível, diante de uma ampla variação de condições ambientais; mesmo a introdução de tecnologias como a separação imunomagnética ou os aparatos de filtração (Envirocheck/Filta-Max) acarretaram pequenas melhorias nas taxas de recuperação e, a etapa de filtração mostrou-se ser crítica, principalmente quando analisando a água bruta (FRANCY et al., 2004; FENG et al., 2003); assim, a escolha do método a ser utilizado deve levar em consideração qual o propósito da amostragem, a qualidade da água a ser analisada, a infra-estrutura do laboratório onde a análise será conduzida, o tempo de execução, o custo e a complexidade do protocolo a ser executado, além da sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (FRICKER e CRABB, 1998; DiGIORGIO et al., 2002).

Vale ressaltar que os métodos validados em outros países podem não se mostrar adequados para analisar os mananciais brasileiros devido às suas características intrínsecas, por isso há a necessidade de se pesquisar alternativas compatíveis com as características de cada região e que envolvam menores custos de implantação e de manutenção.

Estudos sobre a epidemiologia ambiental de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. são de grande relevância para os sistemas produtores de água devido ao risco potencial que estes protozoários representam para a Saúde Pública quando presentes em água para consumo humano caso ocorram possíveis falhas no sistema de tratamento convencional. Condições como a alta turbidez em amostras de água bruta, podem representar uma maior dificuldade nas etapas de decantação e filtração (consideradas críticas para a remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.) durante este tipo de sistema de tratamento (CANTUSIO NETO e FRANCO, 2004; LeCHEVALLIER e NORTON, 1995).

7. CONCLUSÃO

As conclusões obtidas neste trabalho foram:

1. Cistos de *Giardia* spp. estiveram presentes em 52,0% (13+/25) das amostras de água bruta superficial do ponto A1 e em 76,0% (19+/25) das amostras no ponto A2;
2. A concentração de *Giardia* spp. no ponto A2 foi maior (variando entre 14 a 240 cistos/l; média de 64,16 cistos/l) que no ponto A1 (16 e 136 cistos/l; média de 25,12 cistos/l);
3. Houve diferença significativa entre as concentrações de cistos de *Giardia* spp. quando comparados os pontos A1 e A2 ($p = 0,05$) o que indica que a qualidade do Rio Atibaia é fortemente influenciada pelo desaguamento do Ribeirão Pinheiros;
4. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. estiveram presentes em 0,04% (1+/25) das amostras do ponto A2, mas não foram detectados no ponto A1 e a concentração *Cryptosporidium* spp. foi de 20 oocistos/l (média de 0,8 oocistos/l);
5. A detecção de ambos os protozoários foi possível com o emprego da técnica de filtração em membrana de 47 mm e porosidade nominal de 3 μm ;
6. As modificações introduzidas no método de filtração em membranas alcançaram uma eficiência de recuperação de 72,2% para *Giardia* spp. e 65,9% para *Cryptosporidium* spp.;
7. A precipitação pluviométrica exerce grande influência na qualidade da água e também nas características do rio uma vez que houve correlação: entre a pluviosidade e a concentração de cistos de *Giardia* spp. no ponto A2 ($r = 0,611$), mas não no A1 ($r = -0,223$); entre a pluviosidade e a quantidade de coliformes totais ($r = 0,467$) e fecais ($r = 0,467$) no ponto A2; entre a turbidez e coliformes totais ($r = 0,694$) e fecais ($r = 0,750$) no ponto A1;
8. Não houve correlação entre: coliformes totais e a concentração de cistos de *Giardia* spp. (A1: $r = -0,276$; A2: $r = -0,201$); coliformes fecais e a concentração de cistos de *Giardia* spp. (A1: $r = -0,187$; A2: $r = -0,201$) e, portanto, não foram parâmetros adequados para indicar a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.;

9. A presença e a quantidade de cistos de *Giardia* spp. não apresentaram sazonalidade ($p = 0,05$);
10. A turbidez apresentou variação entre os períodos de verão e inverno ($p = 0,016$) e verão e outono ($p = 0,006$).

8. REFERÊNCIAS

- AHMAD, R. A.; LEE, E.; TAN, I. T. L.; MOHAMAD-KAMEL, A. G. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw and treated water from two large treatment plants in Selangor, Malaysia. **Wat. Res.**, v. 31, n. 12, p. 3132-3136, 1997.
- ALDOM, J. E.; CHAGLA, A. H. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 186-187, 1995.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20^a ed. Washington: American Public Health Association, Water Works Association e Water Environment Federation, 1998.
- ALLEN, M. J.; CLANCY, J. L.; RICE, E. W. The plain, hard truth about pathogen monitoring. **J. AWWA**, v. 92, n. 9, p. 64-76, 2000.
- ATHERHOLT, T. B.; LeCHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.; ROSEN, J.S. Effect of rainfall on *Giardia* and *Crypto*. **J. AWWA**, v. 90, n. 9, p. 66-80, 1998.
- BARALDI, S. R.; DEL GUÉRCIO, V. M. F.; BORGES, V. R. P.; VIEIRA, C. S. Protozoários entéricos: *Cryptosporidium* sp. e *Isospora belli* na região de Campinas, SP. In: I Seminário Internacional em Protozoários Patogênicos Emergentes. II Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia: Meio Ambiente, Saneamento e Impactos na Saúde. **Anais eletrônicos...** [Campinas]: [s.n], 2004. resumo n. 34. 1 CD-ROM.
- BARWICK R. S.; LEVY, D. A.; CRAUN, G. F.; BEACH, M. J.; CALDERON, R. L. Waterborne disease outbreaks, United States, 1997-1998. In: Surveillance Summaries. **MMWR**, v. 49, n. SS-4, p. 1-35, may 2000. Disponível em: <www.epa.gov/mmwr>. Acesso em: 03 maio 2004.
- BLACKBURN, B. G.; CRAUN, G. F.; YODER, J. S.; HILL, V.; CALDERON, R. L.; CHEN, N.; LEE, S. H.; LEVY, D. A.; BEACH, M. J. Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks Associated with Drinking Water – United States, 2001 – 2002. In: Surveillance Summaries. **MMWR**, v. 53, n. SS-08, p. 24-45, oct. 2004. Disponível em: <www.epa.gov/mmwr>. Acesso em 15 de dez. 2004.
- BORCHARDT, M. A. e SPENCER, S. K. Concentration of *Cryptosporidium*, microsporidia and other water-borne pathogens by continuous separation channel centrifugation. **J. Appl. Microbiol.**, v. 92, p. 649-656, 2002.
- BRANCO, S. M. Água, Meio Ambiente e Saúde. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B. e TUNDISI, J.G. (Org.). **Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico**,

Uso e Preservação. 2ª ed. São Paulo: Editora Escrituras. Cap. 7, p. 227-248, 2002.

- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Recursos Hídricos no Brasil**. Brasília, DF: Secretaria dos Recursos Hídricos, Ministério do Meio Ambiente, Abril, 1998. Acervo Técnico. Disponível em: <www.mma.gov.br>. Acesso em: 15 maio 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.469 de 29 de dezembro de 2000. Brasília, DF, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. **Diário Oficial da União** n. 59, Brasília, DF., 26 mar. 2004, Seção I, pág. 266-270.
- BRUNDTLAND, G. H. **Water Supply Sanitation and Hygiene Links to Health**. Disponível em: <http://www.who.int/docstore/water_sanitation_health/General/facts&fig.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2002.
- BUKHARI, Z.; McCUIN, R. M.; FRICKER, R. C.; CLANCY, J. L. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 4495, 1998.
- BULL, S.; CHALMERS, R.; STURDEE, A. P.; CURRY, A. KENNAUGH, J. Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. **Vet. Parasit.**, v. 77, p. 195-197, 1998.
- BURLINGAME, G. A.; PICKEL, M. J.; ROMAN, J. T. Practical applications of turbidity monitoring. **J. AWWA**, v. 90, n. 8, p. 57-69, 1998.
- CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R.M.B. 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. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 118, p. 52-59, 2004.
- CARMO, R. L. **A água é o limite? Redistribuição espacial da população e recursos hídricos no Estado de São Paulo**. Campinas: Núcleo de Estudos da População, Unicamp, set. 2002, 181p. (Textos NEPO 42).
- CARRARO, E.; FEA, E.; SALVA, S.; GILLI, G. Impact of wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in a surface water. **Wat. Sci. Tech.**, v. 41, n. 7, p. 31-37, 2000.
- CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). CDC surveillance summaries. **MMWR**, v. 40, n. SS-3, 1991. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr>>. Acesso em: 03 maio 2004.
- CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks – United States, 1991-1992. In: CDC

Surveillance Summaries. **MMWR**, v. 42, n. SS-5, p. 1-22, nov. 1993. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr>>. Acesso em: 03 maio 2004.

▪ CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS À AGRICULTURA. **Clima de Campinas**. Disponível em: <<http://orion.cpa.unicamp.br/portal/index.php>>. Acesso em: 10 dez. 2004.

▪ CHAURET, C.; ARMSTRONG, N.; FISHER, J.; SHARMA, R.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. **J. AWWA**, v. 7, n. 11, p. 76-84, 1995.

▪ CLANCY, J. L.; BUKHARI, Z.; McCUIN, R. M.; MATHESON, Z.; FRICKER, C. R. USEPA Method 1622. **J. AWWA**, v. 91, n. 9, p. 60-68, 1999.

▪ COMITÉ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI, JUNDIAÍ (CBH-PCJ). 2.4.3.- Uso dos Recursos Hídricos e Demanda de Água. In: **Situação dos Recursos Hídricos das Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí, UGRHI 5 – Relatório técnico final**. v. 1. São Paulo: Centro Tecnológico da Fundação Paulista de Tecnologia e Educação (CETEC), maio 2000, p.163-258. Disponível em: <<http://www.comitepcj.sp.gov.br/>>. Acesso em: 08 maio 2003.

▪ COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2002**. São Paulo: CETESB, p. 273, 2003. ISSN: 0103-4103. Secretaria Estadual de Meio Ambiente: Série Relatórios. Disponível em: <www.cetesb.sp.gov.br>. Acesso em: 18 out. 2003.

▪ COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Coliformes totais e fecais em amostras de água pela técnica de tubos múltiplos**. São Paulo, NT L5.202, 1993.

▪ CONNELL, K.; RODGERS, C. C.; SHANK-GIVENS, H. L.; SCHELER, J.; POPE, M. L.; MILLER, K. Building a better protozoa data set. **J. AWWA**, v. 92, n. 10, p. 30-43, 2000.

▪ CORSO, P. S.; KRAMER, M. H.; BLAIR K. A.; ADDISS, D. G.; DAVIS, J. P.; HADDIX, A. C. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, n. 4, p. 426-431, 2003.

▪ CRAUN, G. F. Waterborne giardiasis. In: MEYER, E. A. (Ed.) **Giardiasis**. 1ª ed. Amsterdam: Elsevier. Vol 3. Cap. 15, p. 267-293, 1990.

▪ CRAUN, G. F.; HUBBS, S. A.; FROST, F.; CALDERON, R. L.; VIA, S. H. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. **J. AWWA**, v. 90, n. 9, p. 81-91, 1998.

▪ CROCKETT, C.S.; HAAS, C. N. Understanding protozoa in your watershed. **J. AWWA**, v.89, n. 9, p. 62-73, 1997.

- D'ANTONIO, R. G.; WINN, M. D.; TAYLOR, JEFFERY; GUSTAFSON, T. L. CURRENT, W. L.; RHODES, M. M.; GARY Jr., G. W.; ZALAC, R. A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **An. Int. Med.**, v. 103, n. 6, pt. 1, p. 886-888, 1985.
- DAVIES, C. M.; FERGUNSON, C. M.; KAUCNER, C.; KROGH, M.; ALTAVILLA, N.; DEERE, D. A.; ASHBOLT, N. J. Dispersion and transport of *Cryptosporidium* oocysts from fecal pats under simulated rainfall events. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 2, p. 1151-1159, 2004.
- DAWSON, D. J.; MADDOCKS, M.; ROBERTS, J.; VIDLER, J. S. Evaluation of recovery of *Cryptosporidium parvum* oocysts using membrane filtration. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 17, p. 276-279, 1993.
- DIAS JÚNIOR, O. Occurrence of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in surface waters and sewage from Araras city, São Paulo, Brazil. 1999. Dissertação (Mestrado) – Universidade Mackenzie.
- DILLINGHAM, R. A.; LIMA, A. L.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microb. Inf.**, v. 4, p. 1059-1066, 2002.
- DiGIORGIO, C.L.; GONZALEZ, D.A.; HUITT, C. C. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using Environmental Protection Agency Method 1623. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 12, p. 5952-5955, 2002.
- DUCANSON, M.; RUSSEL, N.; WEINSTEIN, P; BAKER, M.; SKELLY, C.; HEARNDEN, M.; WOODWARD, A. Rates of notified cryptosporidiosis and quality of drinking water supplies in Aotearoa, New Zealand. **Wat. Res.** v. 14, n. 15, p. 3804-3812, 2000.
- EGOROV, A.; PAULAUKIS, J.; PETROVA, L.; TERESCHENKO; DRIZHD, N.; FORD, T. Contamination of waters supplies with *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* and diarrheal illness in selected Russian cities. **Int. J. Hyg. Environ. Health.**, v. 205, p. 281-289, 2002.
- FARIAS, E. W. C.; GAMBA, R. C.; PELLIZARI, V. H. Detection of *Cryptosporidium* spp oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Brazil. J. Microbiol.**, v. 33, p. 41-43, 2002.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1305-1322, 2000.
- FENG, Y.Y.; ONG, S.L.; HU, J.Y.; SONG, L.F.; TAN, X.L.; NG JERN, W. Effect on particle on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from source water samples of various turbidities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 4, p. 1898-1903, 2003.

- FERGUNSON, C. M.; COOTE, B. G.; ASHBOLT, N. J.; STEVENSON, I. M. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. **Wat. Res.**, v. 30, n. 9, p. 2045-2054, 1996.
- FERRARI, B.C.; VESEY, G.; WEIR, C.; WILLIAMS, K.L.; VEAL, D.A. Comparison of *Cryptosporidium*-specific and *Giardia*-specific monoclonal antibodies for monitoring water samples. **Wat. Res.**, v. 33, n. 7, p. 1611-1617, 1999.
- FINCH, G.R. e BELOSEVIC, M. Controlling *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in drinking water by microbial reduction processes. **J. Environ. Eng. Sci.** v.1, p. 17-31, 2002.
- FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 43, n. 2, p. 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 protocolos de eluição. In: XV Congresso Latino-Americano de Parasitologia. [Rio de Janeiro]. **J. Bras. Patol.**, v. 37, n. 4, p. 205, 2001b.
- FRANCO, R. M. B.; CORDEIRO, N. da S. Giardiose e criptosporidiose em creches no município de Campinas, SP. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 29, p. 585-591, 1996.
- FRANCY, D. S.; SIMMONS III, O. D.; WARE, M. W.; GRANGER, E. J.; SOBSEY, M. D.; SCHAEFER III, F. W. Effects of seeding procedures and water quality on recovery of *Cryptosporidium* oocysts from stream water by using US Environmental Protection Agency method 1623. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 7, p. 4118-4128, 2004.
- FREIRE-SANTOS, F.; OTEIZA-LÓPEZ, A. M.; VERGARA-CASTIBLANCO, C. A.; ARES-MAZÁS, E. Study of combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. **Vet. Parasitol.**, v. 89, p. 253-259, 2000.
- FRICKER, C. R.; CRABB, J. H. Water-borne Cryptosporidiosis: Detection methods and treatment options. **Adv. Parasitol.**, v. 40, p. 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 Itaquaquecetuba city, São Paulo, Brazil. **Bras. J. Microbiol.**, v. 31, p. 151-153, 2000.

- GASSER, R.B.; O'DONOGHUE, P. Isolation, propagation and characterization of *Cryptosporidium*. **Int. J. Parasit.**, v. 29, p. 1379-1413, 1999.
- GELTMAN, P. L.; COCHRAN, J.; HEDGECOCK, C. Intestinal parasites among African refugees resettled in Massachusetts and the impact of an overseas pre-departure treatment program. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 69, n. 6, p. 657-662, 2003.
- GIBSON III, C. J.; STADTERMAN, K. L.; STATES, S.; SYKORA, J. Combined sewer overflows: a source of *Cryptosporidium* and *Giardia*? **Wat. Sci. Tech.**, v. 38, n. 12, p. 67-72, 1998.
- GILES, M.; WEBSTER, K. A.; MARSHALL, J. A.; CATCHPOLE, J.; GODDARD, T. M. Experimental infection of a lamb with *Cryptosporidium parvum* genotype 1. **Vet. Rec.**, v. 149, n. 17, p. 523-525, 2001.
- GILMOUR, R. A.; SMITH, H. V.; SMITH, P. G.; MORRIS, G. P.; GIRDWOOD, R. W. A. The occurrence and viability of *Giardia* spp. cysts in UK waters. **Wat. Sci. Tech.**, v.24, n. 2, p. 179-182, 1991.
- GLABERMAN, S.; MOORE, J. E.; LOWERY, C. J.; CHALMERS, R. M.; SULAIMAN, I.; ELWIN, K.; ROONEY, P. J.; MILLAR, B. C.; DOOLEY, J. S. G. LAL, A. A.; XIAO, L. Three drinking water associated cryptosporidiosis outbreaks Northern Ireland. **Emerg. Inf. Dis.**, v. 8, n. 6, p. 631-633, 2002.
- GRACZYCK, T. K.; EVANS, B.M.; SHIFF, C.J.; KARREMAN, H.J. e PATZ, J.A. Environmental and geographical factors contributing to watershed contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Environ. Res. Sec. A**, v.82, p. 263-271, 2000.
- GRIMASON, A. M.; SMITH, H. V.; PARKU, J. F. W.; BUKHARI, Z.; CAMPBELL, A. T.; ROBERTSON, L. J. Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples. **Wat. Res.**, v. 28, n. 3, p. 733-736, 1994.
- GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. J. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, n. 1, p. 63-68, 2002.
- HACHICH, E. M.; SATO, M.I.Z.; GALVANI, A. T.; MENEGON, J. R. N.; MUCCI, J. L. N. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. **Wat. Sci. Tech.**, v. 50, n. 1, p. 239-245, 2004.
- HACHICH, E. M.; GALVANI, A. T.; PADULA, J. A.; MENEGON, N.; SATO, M. I. Z. Importância do controle dos parasitas patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas captadas para consumo humano. In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES), 20., 1999, [Salvador]. **Anais...**[Bahia]: 17, 1999. p. 1-7. Resumo expandido.

- HASSL, A.; BENYR, G.; SOMMER, R. Occurrence of *Cryptosporidium* sp. oocysts in fecal and water samples in Austria. **Acta tropica**, v. 80, p. 145-149, 2001.
- HERWALDT, B. L.; CRAUN, G. F. STOKES, S. L.; JURANEK, D. D. Publication of CDC Surveillance Summaries: Waterborne diseases outbreaks, 1989-1990. In: **MMWR Weekly**. **MMWR**, n. 41, v. 05, p. 85-87, feb. 1992. Disponível em: <www.epa.gov/mmwr>. Acesso em: 03 maio 2004.
- HESPAHOL, I. Água e Saneamento Básico – Uma visão realista. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B. e TUNDISI, J.G. (Org.). **Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico, Uso e Preservação**. 2ª ed. São Paulo: Editora Escrituras, Cap. 8, p. 249-304, 2002.
- HO, B.S.W. e TAM, T.Y. *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage-contaminated river waters. **Wat. Res.**, v. 32, n. 9, p. 2860-2864, 1998.
- HOFFMAN, B.; CHAURET, C.; STANBRIDGE, J.; PETERSON, L. Evaluation of four commercial antibodies. **J. AWWA**, v. 91, p. 69-78, 1999.
- 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 outbreaks. **Emerg. Inf. Dis.** v. 8, n. 6, p. 619-624, 2002.
- HÖRMAN, A.; RIMHANEN-FINNE, R.; MAUNULA, L.; von BONSDORFF, C. H.; TORVELA, N.; HEIKINHEIMO, A.; HÄNNINEN, M. L. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in Southwestern Finland, 2000-2001. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 1, p. 87-95, 2004.
- HSU, B.; HUANG, C.; HSU, C. L.; HSU, Y. F. YEH, J. H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in the Kau-Ping river and its watershed in Southern Taiwan. **Wat. Res.**, v. 33, n. 11, p. 2701-2707, 1999.
- HSU, B.; HUANG, C.; HSU, C. L. Analysis for *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water samples from small water systems in Taiwan. **Parasitol. Res.**, v.87, p.163-168, 2001.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000**. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/default.shtm>. Acesso em: 05 maio 2002.
- IONAS, G.; LEARMONTH, J. J.; KEYS, E. A.; BROWN, T. J. Distribution of *Giardia* and *Cryptosporidium* in natural water systems in New Zealand – A nationwide survey. **Wat. Sci. Tech.**, v. 38, n. 12, p. 57-60, 1998.

- JAKUBOWISKI, W.; BOUTROS, S.; FABER, W.; FAYER, R.; GHIOSE, W.; LeCHEVALLIER, M.; ROSE, J.; SCHAUB, S.; SINGH, A.; STEWART, M. Environmental methods for *Cryptosporidium*. **J. AWWA**, v. 88, n. 9, p. 107-121, 1996.
- JELLISON, K. L.; HEMOND, H. F.; SCHAUER, D. B. Sources and species of *Cryptosporidium* oocysts in the Wachusett reservoir watershed. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 2, p. 569-575, 2002.
- KFIR, R.; HILNER, C.; du PREEZ, M.; BATEMAN, B. Studies on the prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in South Africa water. **Wat. Sci. Tech.**, v. 31, n. 5-6, p. 435-438, 1995.
- KISTEMANN, T.; CLAßEN, T.; KOCH, C.; DANGERDORF, F.; FISCHEDER, R.; GEBEL, J.; VACATA, V.; EXNER, M. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, n. 5, p. 2188-2197, 2002.
- KRAMER, M. H.; HERWALDT, B. L. CALDERON, R. L., JURANEK, D. D.. Waterborne disease outbreaks, United States, 1993-1994. In: CDC Surveillance Sumaries. **MMWR**, v. 45, n. SS-1, p. 1-33, apr 1996. Disponível em: < www.epa.gov/mmwr>. Acesso em: 03 maio 2004.
- KRUSCHE, A. V.; CARVALHO, F. P.; MORAES, J. M.; CAMARGO, P. B.; BALLESTER, M. V. R.; HORNINCK, S.; MARTINELLI, L. A.; VICTORIA, R. L. Spatial and temporal water variability in the Piracicaba River Basin, Brazil. **JAWRA**, v. 33, n. 5, 1997.
- KRUSCHE, 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). **Wat. Res.**, v. 36, p. 2743-2752, 2002.
- KUHN, R. C.; ROCK, C. M.; OSHIMA, K. H. Effects of pH and magnetic material on immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from concentrated water samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 4, p. 2066-2070, 2002.
- LeCHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.; LEE, R. G. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 9, p. 2610-2616, 1991.
- LeCHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D. *Giardia* e *Cryptosporidium* in raw and finished water. **J. AWWA**, v. 87, p. 54-68, 1995.
- LEE, S. H.; LEVY, D. A.; CRAUN, G. F.; BEACH, M. J.; CALDERON, R. L. Surveillance for Waterborne disease outbreaks, United States, 1999-2000. In: CDC

Surveillance Summaries. **MMWR**, n. 51, v. SS-8, p. 1-52, nov. 2002. Disponível em < www.epa.gov/mmwr>. Acesso em: 03 maio 2004.

- LEMARCHAND, K.; LEBARON, P. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal, watershed: relationship with fecal indicators. **FEMS Microb.**, v. 218, p. 203-209, 2003.
- LEVINE, W. C.; STEPHENSON, W. T.; CRAUN, G. F. Waterborne disease outbreaks, 1986-1988. In: CDC Surveillance Summaries. **MMWR**, v. 39, n. SS-1, p. 1-9, mar 1990. Disponível em: <www.epa.gov/mmwr>. Acesso em: 03 maio 2004.
- LEVY, D. A.; BENS, M. S.; CRAUN, G. F.; CALDERON, R. L.; HERWALDT, B. L. Surveillance for Waterborne disease outbreaks, United States, 1995-1996. In: CDC Surveillance Summaries. **MMWR**, v. 47, n. SS-5, p. 1-34, dec. 1998. Disponível em: <www.epa.gov/mmwr>. Acesso em: 03 maio 2004.
- LINDQUIST, A.; DUFOUR, A. P.; WYMER, L. J.; SCHAEFER, F. W. Criteria for evaluation of proposed protozoan detection methods. **J. Microb. Meth.**, v. 37, p. 33-43, 1999.
- LUNA, S.; REYES, L. L.; CHINCHILLA, M.; CATARINELLA, G. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas superficiales en Costa Rica. **Parasitol. Latinoam. (FLAP)**, v. 57, p. 63-65, 2002.
- MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, S. M.; BLAIR, S. M.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADIS, D. G. FOX, K. R.; ROSE, J. B.; DAVES, J. P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New Engl. J. Med.**, v. 331, n. 3, p. 161-167, 1994.
- MARSHAL, M. M.; NAUMOVITZ, D.; ORTEGA, Y.; STERLING, C. R. Waterborne Protozoan Pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 1, p. 67-85, 1997.
- MEDEMA, G. J.; SCHETS, F. M.; TENIS, P. F. M.; HAVELAR, A. H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 11, p. 4460-4466, 1998.
- MEDEMA, G. L.; SCHIJVEN, J. F. Modelling the sewage discharge and dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. **Wat. Res.**, v. 35, n. 18, p. 4307-4316, 2001.
- MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia* – zoonoses: fact or fiction? **Inf. Gen. Evol.**, v. 3, p. 233-244, 2003.
- MORGAN, U. M.; XIAO, L.; HILL, B. D.; O'DONOGHUE, P.; LIMOR, J.; LAL, A.; THOMPSON, R.C.A. Detection of the *Cryptosporidium parvum* "human"

genotype in a dugong (*Dugong dugon*). **J. Parasitol.**, v. 86, n. 6, p. 1352-1354, 2000.

- MULLER, A. P. B. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo.** 2000. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MUSIAL, C. E.; ARROWOOD, M. J.; STERLING, C. R.; GERBA, C. P. Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, n.4, p. 687-692, 1987.
- NEUMANN, N. F.; GYÜREK, L. L.; GAMMIE, L.; FINCH, G. R.; BELOSEVIC, M. Comparison of animal infectivity and nucleic acid staining for assessment of *Cryptosporidium parvum* viability in water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 1, p. 406-412, 2000.
- NEWMAN, R.D.; WUHIB, T.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C. L. Environmental sources of *Cryptosporidium* in urban slum in Northeastern Brazil. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 49, p. 270-275, 1993.
- NIEMINSKI, E. C.; SCHAEFFER III, F. W.; ONGERTH, J. E. Comparison of two methods of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 5, p. 1714-1719, 1995.
- ONG, C.; MOOREHEAD, W.; ROSS, A.; ISAAC-RENTON, J. Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in two adjacent watersheds. **App. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 8, p. 2798-2805, 1996.
- ONGERTH, J. E.; HUNTER G. D.; DeWALLE, F. B. Watershed use and *Giardia* cyst presence. **Wat. Res.**, v. 29, n. 5, p. 1295-1299, 1995.
- ONGERTH, J. E.; PECORARO, J. P. Electrophoretic mobility of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. **J. Environ. Engin.**, v. 122, n. 3, p. 228-230, 1996.
- ONGERTH, J. E.; STIBBS, H. H. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53,n.4, p. 672-676, 1987.
- ONO, K.; TSUJI, H.; RAI, S. K.; YAMAMOTO, A.; MASUDA, K.; ENDO, T.; HOTTA, H.; KAWAMURA, T.; UGA, S. Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in western Japan. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 9, p. 3832-3836, 2001.
- ORTEGA, Y. R.; ADAM, R. D. *Giardia*: Overview and update. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 545-50, 1997.

- PENG, M. M.; XIAO, L.; FREEMAN, A. R.; ARROWOOD, M. J.; ESCALANTE, A. A.; WELTMAN, A. C.; ONG, C. S. L.; MACKENZIE, W. R.; LAL, A. A.; BEARD, C. B. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence for two distinct human transmission cycles. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 3, p. 567-573, 1997.
- QUINTERO-BETANCOURT, W.; PEELE, E. R.; ROSE, J. B. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayentanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. **J. Microb. Meth.**, v. 49, n. 3, p. 209-224, 2002.
- REBOUÇAS, A.C. Água Doce no Mundo e no Brasil. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B. e TUNDISI, J.G. (Org.). **Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico, Uso e Preservação**. 2ª ed. São Paulo: Editora Escrituras. Cap. 1, p. 1-37, 2002.
- ROACH, P. D.; OLSON, M. E.; WHITLEY, G.; WALLIS, P. M.; Waterborne *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in the Yukon, Canada. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 1, p. 67-73, 1993.
- ROCHELLE, P. A.; DeLEÓN, R.; JOHNSON, A.; STEWART, M. H.; WOLFE, R. L. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 2, p. 841-845, 1999.
- ROEFER, P. A.; MONSCVITZ, J. T.; REXING, D. J. The Las Vegas cryptosporidiosis outbreak. **J. AWWA**, p. 95-106, sept. 1996.
- ROMPRÉ, A.; SERVAIS, P.; BAUDART, J.; de ROUBIN, M. R.; LAURENT, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. **J. Microb. Meth.**, v. 49, p. 31-54, 2002.
- ROSE, J. B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. **An. Rev. Public Health**, v. 18, p. 135-61, 1997.
- ROSE, J. B.; HUFFMAN, D. E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS Microb. Rev.**, v. 26, p. 113-123, 2002.
- ROUQUET, V.; HOMER, F.; BRIGNON, J. M.; BONNE, P.; CAVARD, J. Source and occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Paris rivers. **Wat. Sci. Tech.**, v. 41, n. 7, p. 79-86, 2000.
- RYAN, U. M.; MONIS, P.; ENEMARKT, H. L.; SULAIMANT, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDDLE, R.; ROBERTSON, I.; ZHOUT, L.; THOMPSON, R. C. A.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **J. Parasitol.**, v. 90, n. 4, p. 769-773, 2004.
- SAID, B.; WRIGHT, F.; NICHOLS, G. L.; REACHER, M.; RUTTER, M. Outbreaks of infectious disease associated with private drinking water supplies in England and Wales 1970-2000. **Epidemiol. Infect.** v. 130, p. 469-479, 2003.

- SALATI, E.; LEMOS, H. M.; SALATI E. Água e o Desenvolvimento Sustentável. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B. e TUNDISI, J.G. (Org.). **Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico, Uso e Preservação**. 2ª ed. São Paulo: Editora Escrituras. Cap. 2, p: 39-63, 2002.
- SANTOS, L. U.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R. M. B. Metodologias para detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de esgoto. In: I Seminário Internacional em Protozoários Patogênicos Emergentes. II Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia: Meio Ambiente, Saneamento e Impactos na Saúde. **Anais eletrônicos...** [Campinas]: [s.n], 2004a. resumo n. 40. 1 CD-ROM.
- SANTOS, L. U.; BONATTI, T. R.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R. M. B. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 46, n. 6, p. 309-313, 2004b.
- SERVIÇO MUNICIPAL DE ÁGUA E ESGOTO DE PIRACICABA (SEMAE) **Formação do Rio Piracicaba**. Disponível em: <www.semaepiracicaba.org.br/bacia.htm>. Acesso em: 15 maio de 2002.
- SHEPHERD, K. M.; WYN-JONES, A. P. An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 4, p. 1317-1322, 1996.
- SIVIERO, M. R. L. **A produção de sedimentos a montante de uma seção do Rio Atibaia associada à descarga sólida transportada**. 1999. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- SIVIERO, M. R. L. **Estudo da ocupação do solo à montante de uma seção do Rio Atibaia associada à descarga sólida transportada**. 2003. Tese (Doutorado) Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- SKERRETT, H. E.; HOLLAND, C. V. The occurrence of *Cryptosporidium* in environmental waters in the Greater Dublin area. **Wat. Res.**, v. 34, n. 15, p. 3756-3760, 2000.
- SLIFKO, T. R.; HUFFMAN, D. E.; ROSE, J. B. A most-probable-number assay for enumeration of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, n. 9, p. 3936-3941, 1999.
- SMITH, H. V.; GRIMASON, A. M.; BENTON, C.; PARKER, J. F. W. The occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in Scottish waters, and the development of a fluorogenic viability assay for individual *Cryptosporidium* spp. oocysts. **Wat. Sci. Tech.**, v. 24, n. 2, p. 169-172, 1991.

- SOCIEDADE DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA E SANEAMENTO. **A SANASA Hoje**. [Campinas]. Disponível em: <www.sanasa.com.br/_indexins.htm>. Acesso em: 15 dez. de 2004.
- SOCIEDADE DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA E SANEAMENTO. **A SANASA Hoje**. [Campinas]. Programa Minha Escola na SANASA: Bacias Hidrográficas. Folheto informativo. Jan. de 20005
- SODRÉ F.C.; FRANCO, R.M.B. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **RBAC**, v. 33, n. 2, p. 97-107, 2001.
- SOLO-GABRIELE, H.; AGER JR, A. L.; LINDO, J. F.; DUBÓN, J. M.; NEUMEISTER, S. M.; BAUM, M. K.; PALMER, C. J. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water supplies of San Pedro Sula, Honduras. **Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am. J. Public Health**, v. 4, n. 6, 398-400, 1998.
- SOLO-GABRIELE, H.; NEUMEISTER, S. US outbreaks of cryptosporidiosis. **J. AWWA**, v. 88, n. 9, p. 76-86, 1996.
- STATES, S.; STADTERMAN, K. AMMON, L.; VOGEL, P.; BALDIZAR, J.; WRIGHT, D.; CONLEY, L.; SYKORA, J. Protozoa in river water: sources, occurrence, and treatment. **J. AWWA**, v.89, n. 9, p. 74-83, 1997.
- STOTT, R.; MAY, E.; WARREN, A. Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers: implications for water quality and public health. **Wat. Sci. Tech.**, v. 47, n. 3, p. 77-83, 2003.
- THOMAS, F.; BARD, E.; ROUILLIER, M. C.; PRÉLOT, B.; MATGIEU, L. Filtration-elution of *Cryptosporidium* oocysts assisted by electrostatic interactions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 195, p. 135-142, 2001.
- THOMPSON, R.C.A. Giardiasis as re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1259-1267, 2000.
- THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitol. Today** v. 16, p. 210-213, 2000.
- TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microb. Inf.**, v. 4, p. 1047-1058, 2002.
- UNAIDS – JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. **AIDS epidemic update. December 2004**. Disponível em: <http://www.unaids.org/wad2004/EPI_1204_pdf_sp/Chapter3_subsaharan_africa_sp.pdf>. Acesso em: 29 dez. 2004.

- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA.** United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C. Dec. de 1997. Disponível em: <www.epa.gov/nerlcwww/1622ap01.pdf>. Acesso em: 10 out. de 2002.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA.** United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C. Abril de 1999. Disponível em: <www.epa.gov/nerlcwww/1622ap01.pdf>. Acesso em: 10 out. de 2002.
- VASCONCELOS, Y. A purificação das águas. **Rev. Pesq. FAPESP**, v. 75, p. 65-69, 2002.
- VESEY, G.; SLADE, J. S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; FRICKER, C. R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 75, p. 82-86, 1993.
- WALLIS, P. M.; ERLANDSEN, S. L.; ISAAC-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. **App. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 8, p. 2789-2797, 1996.
- WIDMER, G.; TCHACK, L.; SPANO, F.; TZIPORI, S. A study of *Cryptosporidium parvum* genotypes and population structure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 685-686, 1998.
- XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.
- XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZUK, T. K.; GRADUS, S.; LAL, A. A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 3, p. 1097-1101, 2001.
- YAKUB, G. P. STADTERMAN-KNAUER, K. L. Evaluation of Immunomagnetic Separation for Recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from High-Iron Matrices. **App. Environ. Microb.**, v. 66, n. 8, p. 3628-3631, 2000.
- YODER, J. S.; BLACKBURN, B. G.; CRAUN, G. F.; HILL, V.; LEVY, D. A.; CHEN, N.; LEE, S. H.; CALDERON, R. L.; BEACH, M. J. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with recreational water – United States, 2001-2002. In: CDC Surveillance Summaries. **MMWR**, v. 53, n. SS08, p. 1-22, oct. 2004. Disponível em: <www.epa.gov/mmwr>. Acesso em: 15 dez. 2004.
- ZUCKERMAN, V.; GOLD, D.; SHELEF, G.; ARMOS, R. The presence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in surface waters and effluents in Israel. **Wat. Sci. Tech.**, v. 35, n. 11-12, p. 381-384, 1997.

9. ANEXOS

9.1. Anexo A

Surtos de criptosporidiose e giardiose em águas destinadas ao consumo humano.

<i>Cryptosporidium</i> spp.: Água para consumo humano – UK e outros países					
Data	Local	Nº Casos (Estimados)*	Fonte de Captação	Causas	Hospital./ Óbitos
1986	UK Sheff	49 (537)	Reservatório	Def.Tratamento	a
1988	UK Ayr	27	Fonte	Def.Tratamento	a
1989	UK Sw	516	Rio	Def.Tratamento	a
1990	UK Loch	442	Canal	Def.Tratamento	a
1990	UK Nhum	477	Rio	Def.Tratamento	a
1990/1	UK IsThan	47	Rio	Def.Tratamento	a
1991	UK LonS	44	Distribuição	Def.Tratamento	a
1992	UK Devon	?	Torneira	Cont. água final	a
1992	UK NO	42	Torneira	Cont. água final	a
1992	UK NO	63	Torneira	Cont. água final	a
1992	UK SO	108	Torneira	Cont. água final	a
1992	UK Yorks	125	Torneira	Distribuição	a
1992	UK Mersey	47	Torneira	Distribuição	a
1992	UK Bradf	125	Torneira	Distribuição	a
1992/3	UK Warri	47 (1.840)	Torneira	Distribuição	a
1993	UK Wess	40	Torneira	Distribuição	a
1993	UK North	05	Torneira	Distribuição	a
1993	UK Yorks	97	Torneira	Distribuição	a
1993	UK Northt	43	Fonte	Distribuição	a
1993	UK Wess	27	Torneira	Distribuição	a
1994	UK várias	224	Torneira	Distribuição	a
1994	UK Trent	33	Torneira	Distribuição	a
1995	UK Devon	575	Rio	Água não floculada	a
1995	UK SO	575	Torneira	Distribuição	a
1996	UK NEngl	~126	Torneira	Distribuição	a
1996	UK Yorks	20	Torneira	Distribuição	a
1996	UK NEEng	?	Torneira	Distribuição	a
1997	UK Ntham	345	Torneira	Distribuição	a
1997	UK EngWa	>4.321	Múltiplas	Múltiplos	a
1998	UK Lancashire	24	Torneira	Cont. reservatório	a
1999	UK NEEng	~360	Água superf	Ausência de filt.	a
2000	UK South Wes	8	Poço/Fonte	Def.Tratamento	a
2000	UK Lancashire	58	Nascente	Ausência de filt.	a
1993	CAN Water	>1.000	Torneira	Distribuição	a
1994	JAP Kan	461	Torneira	Distribuição	a

Data	Local	Nº Casos (Estimados)*	Fonte de Captação	Causas	Hospital./ Óbitos
1995	ITA Norte	294	Cisternas?	Comunidade	a
1996	JAP Orose	>9.000	Fonte/Poço	Ausência de filt.	a
1996	CAN Ontar	~182	Reservatório	Ausência de filt.	a
1996	BC Kelow	~14.500	Lago	Ausência de filt.	a
1996	BC Cranbr	~2.097	Reservatório	Ausência de filt.	a
1997	CAN Ontar	~100	Lago	Ausência de filt.	a
1998	BC Chilliw	25-30	?	?	a
1999	NZe Haw	20	?	?	a
1999	NZe Nisl	?	?	?	a
2000	Irlanda	129	a	a	a
	Norte				
2000	Irlanda	117	a	Cont. distribuição	a
	Norte				
2001	Irlanda	230	a	Cont. distribuição	a
	Norte				
TOTAL	47 surtos	37.195			

*Dado disponível somente em alguns surtos.

?: Desconhecido.

a: Sem dados.

<i>Cryptosporidium</i> spp.: Água para consumo humano – EUA					
Data	Local	Nº Casos	Fonte de Captação	Causas	Hospital./ Óbitos.
1984	Texas	2.006	Poço	Cont. esgoto	a
1986	Novo México	78	Água Superficial	Cont. resíduo bovino	a
1987	Georgia	13.000	Rio	Def. Tratamento	a
1991	Pensilvania	551	Poço	Def. Tratamento	a
1992	Oregon	3.000	Fonte	Def. Tratamento	a
1992	Oregon	3.000	Rio	Def. Tratamento	a
1993	Minnesota	27	Lago	Passagem ooc. filtros	a
1993	Nevada	103	Lago	Passagem ooc. filtros	a/ 41
1993	Washington	07	Poço	Água não tratada	a
1993	Wisconsin	403.000	Lago	Def. Tratamento	4.030/ 100
1994	Washington	134	Poço	Cont. água irrigação	a
1995	Flórida	72	Caixa d'água	Cont. distribuição	a
1998	Novo México	32	Poço	Def. Diversas	a
1998	Texas	1.400	Poço	Def. Tratamento	a
2000	Flórida	05	Poço	Def. Distribuição	a
2001	Indiana	10	Poço	Def. Tratamento	a
TOTAL	16 surtos	423.425			

a: Sem dados.

<i>Giardia</i> spp.: Água para consumo humano – EUA						
Data	Local	Nº e/ou Surtos	Casos de	Fonte de Captação	Causas	Hospital./ Óbitos
1965-1985	Vários	24.541/surtos	92	Vários ^c	Diversas	a
1986-1988	Vários	09 surtos		Superficial	Def. Tratamento	a
1989-1990	Vários	07 surtos		Superficial./ Subterrânea	Ausência de Filtração	a
1991	Califórnia	15		Fonte	Def. Distribuição	a
1991	Pensilvânia	13		Poço	Sem Tratamento	a
1992	Idaho	15		Poço	Sem Tratamento	a
1992	Nevada	80		Lago	Def. Tratamento	a
1993	Pensilvânia	20		Poço	Cont. esgoto	a
1993	Dakota Sul	07		Poço	Cont. riacho	a
1994	New Hamps	18		Reservatório	Ausência de Filtração	a
1994	New Hamps	36		Lago	Ausência de Filtração	a
1994	Tennessee	304		Reservatório	Def. Distribuição	a
1995	Alasca	10		Superficial	Sem Tratamento	a
1995	Nova York	1.449		Lago	Def. Tratamento	a
1997	Nova York	50		Lago	Def. Tratamento	a
1997	Oregon	100		Poço/Fonte	Def. Distribuição	a
1998	Flórida	07		Poço	Sem Tratamento	a
1998	Flórida	02		Poço	Sem Tratamento	a
1999	Flórida	02		Poço	Sem Tratamento	a
2000	Colorado	27		Rio	Def. Tratamento	a
2000	Flórida	02		Poço	Def. Distribuição	a
2000	Minnesota	12		Poço	Sem Tratamento	a

Data	Local	Nº e/ou Surto	Casos de	Fonte de Captação	Causas	Hospital./ Óbitos
2000	New Hamps	05		Poço	Def. Tratamento	a
2000	N. México	04		Rio	Def. Diversas	a
2001	Colorado	06		Rio	Def. Tratamento	a
2001	Flórida	06		Poço	Sem Tratamento	a
2002	Nova York	06		Poço/Fonte	Def. Distribuição	a
TOTAL	132 surtos	26.737				

a: Sem dados.

°: Incluindo sistemas individuais e de recreação.

9.2. Anexo B

Surtos de criptosporidiose e de giardiose causados por águas usadas em atividades de recreação.

<i>Cryptosporidium</i> spp.: Águas recreacionais – UK e outros países					
Data	Local	Nº Casos (Estimados*)	Tipo	Cenário	Hospital./ Óbitos
1988	UK Doncaster	79	Piscina	b	a
1990	Can BC	23 (66)	Piscina	b	a
1992	UK Gloucester	13	Piscina	b	a
1994	AUS Sutherland	70	Piscina	b	a
1996	UK Andover	(8)	Piscina	b	a
1997	UK NEEngl	7 (27)	Rio	b	a
1997	UK NEEngl	9	Piscina	b	a
1998	AUS Canberra	210	Piscina	b	a
1997	AUS Queensl	(129)	Piscina	b	a
1998	AUS New South	(370)	Piscina	b	a
1998	NEZel Hutt Val	171	Piscina	b	a
TOTAL	11 surtos	1.089			

a: Sem dados.

b: Indeterminado.

*: Casos estimados (Dado disponível somente em alguns relatos).

<i>Cryptosporidium</i> spp.: Águas recreacionais – EUA					
Data	Local	Nº Casos (Estimados*)	Tipo	Cenário	Hospital./ Óbitos
1986	N. México	56	Lago	b	a
1988	LA	44	Piscina	b	a
1992	Idaho	26 (500)	Espelho d'água	Parque aquático	a
1992	Oregon	52 (500)	Ondas Artific.	Parque aquático	a
1993	Wisconsin	51	Piscina	Motel	a
1993	Wisconsin	05	Piscina	Motel	a
1993	Wisconsin	54	Piscina	b	a
1993	Wisconsin	64	Piscina	b	a
1994	Missouri	101	Piscina	b	a
1994	New Jersey	418	Lago	b	a
1995	Georgia	5.449	Piscina	Parque aquático	a
1995	Kansas	24	Piscina	Parque aquático	a
1995	Nebraska	14	Piscina	Parque aquático	a
1996	Califórnia	3.000	Piscina	Parque diversão	a
1996	Flórida	22	Piscina	Uso comunitário	a
1996	Indiana	03	Lago	Praia	a
1997	Minnesota	369	Fonte	Zoológico	a
1998	Flórida	07	Piscina	Creche	a
1998	Minnesota	45	Piscina	Clube	a
1998	Minnesota	07	Piscina	Uso comunitário	a
1998	Oregon	69	Piscina	Uso comunitário	a
1998	Pensilvânia	08	Lago	Parque est.	a
1998	Wisconsin	12	Piscina	Uso comunitário	a
1998	Wisconsin	09	Piscina	Uso comunitário	a
1998	Wisconsin	12	Piscina	Uso comunitário	a
1999	Flórida**	38	Fonte	Praia	a
1999	Flórida	06	Piscina	Uso particular	a
1999	Minnesota	10	Piscina	Parque trailers	a
1999	Wisconsin	10	Piscina	Uso público	a
2000	Colorado	112	Piscina	Uso público	a
2000	Flórida	03	Piscina	Condomínio	a

Data	Local	Nº Casos (Estimados)	Tipo	Cenário	Hospital./ Óbitos
2000	Flórida	05	Piscina	Clube	a
2000	Flórida	19	Piscina	Resorte	a
2000	Flórida	05	Piscina	Condomínio	a
2000	Geórgia	36	Piscina	Uso comunitário	a
2000	Minnesota	200	Lago	Praia	a
2000	Minnesota	07	Piscina	Camping	a
2000	Minnesota	06	Piscina	Hotel	a
2000	Minnesota	04	Piscina	Uso público	a
2000	Nebraska	225	Piscina	Uso comunitário	a
2000	Ohio	700	Piscina	Clube	a
2000	Carolina Sul	26	Piscina	Uso comunitário	a
2001	Illinois	358	Piscina	Parque aquático	a
2001	Nebraska	157	Piscina	Uso comunitário	a
2001	Nebraska	21	Piscina	Uso comunitário	a
2001	Wyoming	02	Fontes	Parque estadual	a
2002	Geórgia	03	Piscina	Creche	a
2002	Massachussetts	767	Piscina	Clube	a
2002	Minnesota	52	Piscina	Clube	a
2002	Minnesota	41	Piscina	Hotel	a
2002	Minnesota	16	Piscina	Resorte	a
2002	Texas	54	Piscina	Hotel	a
2002	Wyoming	03	Lago	Lago	a
TOTAL 53 surtos		12.807			

a: Sem dados.

b: Indeterminado.

*: Dado disponível somente em alguns relatos.

**: *Cryptosporidium* e *Shigella sonnet*.

<i>Giardia</i> spp. : Águas recreacionais - EUA					
Data	Local	Nº Casos e/ou de Surtos	Tipo	Cenário	Hospital./ Óbitos
1965-85	Vários	3.000/ 3 surtos	Vários ^c	Diversos	a
1986-88	Vários	02 Surtos	Piscina	b	a
1991	Geórgia	09	Piscina	Creche	a
1991	Geórgia	07	Piscina	Creche	a
1991	Maryland	14	Piscina	Parque	a
1991	Washington	04	Lago	Camping	a
1993	Maryland	12	Lago	b	a
1993	New Hamps	43	Lago	b	a
1993	Washington	06	Rio	b	a
1994	Indiana	80	Piscina	b	a
1996	Flórida	77	Piscina	Uso comunitário	a
1999	Massachussets	18	Lago	Lago	a
2002	Wyoming	02	Rio	Rio	a
TOTAL	16 surtos	3.272			

a: Sem dados.

b: Indeterminado.

^c: Incluindo sistemas individuais e de recreação.

9.3. Anexo C

Dados climáticos – precipitação pluviométrica durante o período de abril de 2002 a março de 2003. Em destaque, as datas da obtenção das amostras.

PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA MENSAL (mm)												
Mês Dia	Abr 2002	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2003	Fev	Mar
1	0,0	2,8	0,0	0,0	6,4	4,8	0,4	0,0	0,8	0,0	2,8	0,0
2	2,8	0,0	0,0	0,0	25,8	0,0	2,5	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0
3	0,3	4,8	0,0	0,0	19,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	1,3	12,1	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	30,0	1,6	1,2
5	0,3	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	24,0	35,0	23,8	0,0	0,0
6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	23,0	26,4	3,5
7	18,8	7,3	0,0	0,0	4,0	8,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	1,0
8	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,9
9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,4
10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,6
11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,0	1,2	18,9	0,0	6,2
12	0,0	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,4	2,8	9,9	0,0	3,8
13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,2	0,0	24,1	6,8	3,6
14	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,6	19,9	18,6	16,8	13,4
15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	7,1	0,0	0,0	5,8	0,3
16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,3	18,4	0,0	2,3	0,0
17	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	19,3	0,8	24,4	15,3	8,4
18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,6	2,4	0,0	104,8	0,0
19	0,0	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,6	0,0	12,5	3,8	0,0
20	0,0	14,7	0,0	0,0	0,0	1,0	8,8	0,0	5,0	2,1	0,0	0,0
21	0,0	20,2	0,0	0,0	0,0	29,2	0,0	0,0	1,8	0,6	9,1	5,2
22	0,0	4,8	0,0	0,2	0,0	0,0	6,4	0,0	69,9	29,6	1,0	3,2
23	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,4	0,0	0,0
24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	9,6	0,0	0,0
25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,4	0,5	0,0	0,0
26	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,8	12,4	4,8	0,5	0,0	0,0
27	3,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	6,6	0,0	1,8	0,0	0,0
28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,4	0,0	0,0
29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	26,2	0,0	35,4	-	0,3
30	0,0	0,0	0,0	0,0	15,0	0,0	33,0	19,8	0,0	20,4	-	0,0
31	-	0,0	-	0,0	0,0	-	2,2	-	0,0	11,8	-	0,0
Total	29,0	73,8	0,0	6,8	71,0	49,0	63,1	189,1	181,9	312,4	163,4	152,8
Máx.	18,8	20,2	0,0	3,6	25,8	29,2	33,0	26,2	69,9	80,2	30,7	72,0
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

Observações: 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 Meteorológico. 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.