UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

KARINA APARECIDA DE ABREU TONANI

# **“Bioagentes patogênicos em águas residuárias: destaque para *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., bactérias indicadoras e vírus entéricos”**

Ribeirão Preto

2011

KARINA APARECIDA DE ABREU TONANI

# “Bioagentes patogênicos em águas residuárias: destaque para *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., bactérias indicadoras e vírus entéricos”

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título Doutor em Ciências, Programa de Pós Graduação em Enfermagem em Saúde Pública

Linha de Pesquisa: Saúde Ambiental

Orientadora: Susana I. Segura Muñoz

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Tonani, Karina Aparecida de Abreu

"Bioagentes patogênicos em águas residuárias: destaque para *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., bactérias indicadoras e vírus entéricos"/ Karina Aparecida de Abreu Tonani; orientadora Susana Inés Segura Muñoz.-- Ribeirão Preto, 2011.

137 p. il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Enfermagem em Saúde Pública

Orientadora: Susana Inés Segura Muñoz

1. Águas residuárias. 2. *Giardia* spp.. 3. *Cryptosporidium* spp.. 4. Parasitas. 5. Bactérias. 6. Virus.

TONANI, K.A.A. **"Bioagentes patogênicos em águas residuárias: destaque para *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., bactérias indicadoras e vírus entéricos".** Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem em Saúde Pública.

Aprovado em ...../ ...../ .....

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura_____

# DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Clésio de Abreu e Neide Fávaro de Abreu, pelo exemplo de verdadeiros lutadores, trabalhadores e íntegros, que me ensinaram tantos predicados e valores que só se adquirem com uma boa educação. Pelo apoio irrestrito na realização do meu trabalho, permitindo a conclusão desta etapa. Meu muito obrigada.*

*A minha filha Isabella, que desde a sua geração sempre compartilhou os momentos de loucura da mamãe (noites dormidas em ônibus....) e embora ainda muito pequena tive que me ausentar de muitos momentos para a finalização deste trabalho.*

*Ao meu marido Fabiano Rodrigo Tonani, pelo incentivo, companheirismo e entendimento das minhas ausências para a realização deste trabalho.*

# AGRADECIMENTOS

*Ao meu esposo, Fabiano Rodrigo Tonani, pelo apoio e incentivo em toda a jornada de minha vida, pela demonstração de amor e carinho como forma mais digna para o progresso do ser humano;*

*À minha filha Isabella Tonani, a estrelinha mais nova de minha vida, que bem soube ser planejada e amada para chegar no momento certo!*

*Aos meus pais, Clésio Aparecido de Abreu e Neide Aparecida Fávaro de Abreu, pela vida e por tantos momentos de abdicação de seus prazeres, para me proporcionar uma esmerada educação de vida e incentivo ao ensino;*

*Aos meus sogros, Cláudio Tonani e Zenaide Aparecida Cremonez Tonani, por, desde cedo, estarem presentes em minha vida, colaborando para o meu crescimento pessoal;*

*À minha cunhada Sileia Patricia Tonani, por cuidar da minha filha com carinho e atenção;*

*À minha prima Ana Paula de Abreu Tonani, por todas as noites mal dormidas.....amizade e carinho;*

*À minha grande amiga Fabiana Cristina Julião pela paciência nas minhas ausências e na correria do dia-a-dia. Por todas as tardes que passou comigo no laboratório. E acima de tudo pelos conselhos que me deu, do alto da sua maturidade de Espírito imortal, diante das dificuldades a transpor. Seus abraços e seus olhares de compreensão jamais serão esquecidos.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Susana Inés Segura Muñoz. Profissional competente, incansável, sempre pronta para o trabalho, a qualquer hora! Professora nata, de memória invejável, consegue orientar e acompanhar todos os seus alunos. Como mãe, sempre soube compreender minhas necessidades de dividir-me entre a maternidade e o laboratório. Como orientadora, sempre soube me orientar e estimular. Como pessoa, sabia escutar e tentar compreender minhas dificuldades. Muito obrigada!!!!!*

*Aos queridos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental, que fizeram e fazem de nosso ambiente de trabalho um local de aconchego, confiança e alegria: Mariana Ragazzi, Osmar de Oliveira Cardoso, Renato Igor da Silva Alves, Marina Schimt Celere, Ariadne, Maraina e Carol.*

*À Dra. Elayse Hachich, gerente do setor de Microbiologia e Parasitologia da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) por ter possibilitado o desenvolvimento deste trabalho. Pelas considerações de extrema valia que muito ajudaram na conclusão final do trabalho.*

*Ao técnico José Antonio Padula, por toda ajuda nas análises, sem os quais esse trabalho não teria êxito. Pelas valiosas sugestões e contribuições para o aperfeiçoamento da tese. Por dividir momentos de intensas alegrias e em muitos outros ouvirem o meu desabafo.*

*À Ana Tereza Galvani, farmacêutica do laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), a Nancy C. Stoppe e a todos os funcionários por toda atenção e apoio e carinho.*

*À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (Processo: 09/50145-0) e pela concessão da bolsa de doutorado (Processo n° 2007/58903-5).*

*À Profa. Dra. Beatriz Rossetti Ferreira e a Profa. Dra. Silvia Matumoto pela contribuição com valiosas sugestões durante o Exame de Qualificação.*

*À Profa. Dra. Angela Maria Magosso Takayanagui, pela amizade, carinho.*

*À Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto, por possibilitar as coletas de amostra.*

*Às engenheiras Karina Carregari e Thais Onça, pela amizade, pelo imenso carinho e pelas vibrações positivas.*

*Ao engenheiro Carlos pela disponibilidade, confiança em mim depositada.*

*Às minhas grandes amigas Emilene Perticarrari e Leandra Burrim, pela compreensão, amizade, e companheirismo em todos os momentos de minha vida.*

*À Deus a oportunidade valorosa de aprendizado que ora se encerra. Mais do que um ensaio científico num olhar limitado da realidade da matéria plasmada, este projeto foi uma escola de luz que me permitiu avançar no conhecimento de mim mesma, superando limites, desfazendo ilusões, valorizando amizades que se mostraram fortalezas. Sou imensamente grata a Ele por dar-me a oportunidade de chegar ao final desta pequena tarefa com a alma lapidada pelos tropeços e descaminhos que ferem, porém fazem-nos amadurecer.*

*O tempo é muito lento para os que esperam, muito rápido para os que têm medo, muito longo para os que lamentam, muito curto para os que festejam.*

*Mas, para os que amam, o tempo é eternidade.....*

*William Shakespeare*

# RESUMO

TONANI, K.A.A. **"Bioagentes patogênicos em águas residuárias: destaque para *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., bactérias indicadoras e vírus entéricos".** 2011.137 f. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Esgotos urbanos constituem compartimentos ambientais que favorecem a emergência e re-emergência de enfermidades de veiculação hídrica. Este estudo objetivou analisar cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp., assim como cistos, ovos e larvas de outros protozoários e helmintos patogênicos; Coliformes Totais e Termotolerantes, Rotavírus e Adenovírus em amostras de esgoto bruto e tratado da Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto – SP. As coletas de esgoto foram realizadas no ponto de entrada e no ponto de saída da ETE-Ribeirão Preto/SP. As análises de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram realizadas pelo Método 1623 da EPA. Ovos, cistos e larvas de outros protozoários e helmintos foram analisados pelo Método de Sedimentação proposto pela CETESB (1989). A análise de coliformes totais e termotolerantes foi realizada pela Técnica de Tubos Múltiplos (Colilert®). A análise de vírus foi realizada através do Teste de Elisa com o KIT da RIDASCREEN® Enzimaimunoensaio. Os resultados obtidos revelaram que a concentração de *Giardia* spp. no esgoto bruto variou de 120 a 2200 cistos/L, já no esgoto tratado essa concentração variou de 0,45 a 3,5 cistos/L. Com relação aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. a concentração no esgoto bruto variou de não detectável a 28,9 oocistos/L e no esgoto tratado as concentrações variaram de não detectável a 1,05 oocistos/L. O processo de lodos ativados na ETE-RP promoveu uma remoção parcial de parasitas, tais como: *Endolimax nana, Entamoeba coli, Entamoeba hystolitica*, *Ancylostoma* sp., *Ascaris* sp. *Fasciola hepatica* e *Strongyloides stercoralis*, cujo fator de redução variou entre 18,2 e 100%. Pode-se observar que houve diferença estatisticamente significante entre o número mais provável de coliformes totais e termotolerantes no esgoto bruto e esgoto tratado, mostrando uma redução na concentração desses organismos indicadores após o tratamento do esgoto na ETE-Ribeirão Preto/SP. Não houve correlação significativa entre as concentrações de coliformes totais e termotolerantes em relação à concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.. A análise de vírus mostrou resposta positiva para Rotavirus e Adenovirus em todas as amostras analisadas (esgoto bruto e tratado), mostrando menor absorvância no esgoto tratado. Os resultados obtidos contribuem para a identificação e caracterização de microorganismos de veiculação hídrica no esgoto tratado na ETE-RP, fornecendo dados úteis para a definição de políticas públicas de saneamento, referentes ao controle da qualidade microbiológica do esgoto no país.



**Palavras-chave:** Águas residuárias. *Giardia* spp.. *Cryptosporidium* spp.. Parasitas. Bactérias. Virus.

# ABSTRACT

TONANI, K.A.A. **"Patogenics agents in wastewater: emphasis in *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., indicator bacteria and enteric viruses"** 2011. 137 f. Dissertation (Doctoral program) – University of São Paulo at Ribeirão Preto, College of Nursing, Ribeirão Preto.

Sewage treatment is still precarious in many Brazilian cities, which has contributed to the emergence and re-emergence of waterborne diseases. This study analyzed Giardia spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts, as well as cysts, eggs and larvae of other protozoa and helminthes. Also part of the study were total and thermotolerant coliforms, Rotavirus and Adenovirus in samples of raw and treated sewage of the Sewage Treatment Station (ETE) of Ribeirão Preto, SP, Brazil. Sewage samples were taken at the points of entry and exit of the ETE, Ribeirão Preto. Analyses of Giardia spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts were performed through the EPA's method 1623. Eggs, cysts and larvae of other protozoa and helminthes were analyzed utilizing the method of sedimentation as proposed by CETESB (1989). Analyses of total and thermotolerant coliforms were performed using the Multiple Tube method (Colilert®). Viral analyses were performed through the RIDASCREEN® enzyme immunoassay ELISA test kit. The results revealed that the concentration of Giardia spp. in raw sewage varied from 120 to 2,200 cysts/L; this concentration varied from 0.45 to 3.5 cysts/L in treated sewage. The concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage varied from non-detectable to 28.9 oocysts/L and from non-detectable to 1.05 oocysts/L in treated sewage. The activated sludge process used in ETE promoted a partial removal of parasites such as: *Endolimax nana, Entamoeba coli, Entamoeba hystolitica*, *Ancylostoma* sp., *Ascaris* sp. *Fasciola hepatica* and *Strongyloides stercoralis*. Reduction factors varied from 18.2 to 100%. A statistically significant difference was observed between the most probable number of total and thermotolerant coliforms in raw and treated sewage, showing a reduction in the concentration of these indicators after the treatment of sewage in ETE, Ribeirão Preto. No statistically significant correlation was found between the concentrations of total and thermotolerant coliforms in relation to the concentration of Giardia cysts spp. and *Cryptosporidium* spp. oocysts. Analyzing viruses showed positive responses for Rotavirus and Adenovirus in all the studied samples (raw and treated sewage), with a smaller absorbance in the treated sewage. The results contribute to the identification and evaluation of the prevalence of waterborne microorganisms in treated sewage in ETE, Ribeirão Preto, providing useful data for the definition of public policies for sanitation concerning microbiological quality control in Brazil's sewage.



**Key words:** Sewage. *Giardia* spp.. *Cryptosporidium* spp.. Intestinal parasites. Bacteria. Virus.-

# RESUMEN

TONANI, K.A.A. **“Bioagentes patogénicos en aguas residuales: destaque para *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., bacterias indicadoras y virus entéricos”.** 2011. 137 h. Tesis (Doctorado) – Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto.

As aguas residuales constituyen compartimientos ambientales que favorecen la emergencia y re-emergencia de enfermedades de transmisión hídrica. Este estudio tuvo como objetivo analizar quistes de *Giardia* spp., ooquistes de *Cryptosporidium* spp., así como huevos, larvas y quistes de otros protozoários y helmintos patogénicos; Coliformes Totales y Termotolerantes, Rotavirus y Adenovírus en muestras de aguas residuales antes y después del tratamiento en la Estación de Tratamiento de Efluentes de Ribeirão Preto – SP. Las colectas de efluentes fueron realizadas en el punto de entrada y en el punto de salida de la ETE-Ribeirão Preto/SP. Los análisis de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. fueron realizados por el Método 1623 de EPA. Huevos, quistes y larvas de otros protozoarios y helmintos fueron analizados por el Método de Sedimentación propuesto por CETESB (1989). El análisis de coliformes totales y termotolerantes fue realizado a través de la Técnica de Tubos Múltiples (Colilert®). El análisis de virus fue realizado a través del Test de Elisa con el kit de RIDASCREEN® Enzima-inmunoensayo. Los resultados obtenidos revelaron que la concentración de *Giardia* spp. en el efluente antes del tratamiento varió de 120 a 2200 quistes/L, en el efluente tratado esa concentración varió entre 0,45 e 3,5 quistes /L. Con relación a los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. la concentración en efluentes no tratados varió de no detectable a 28,9 ooquistes/L y en el efluente tratado las concentraciones variaron de no detectable a 1,05 ooquistes/L. El proceso de lodos activados en la ETE-RP promovió una remoción parcial de parásitos, tales como: *Endolimax nana, Entamoeba coli, Entamoeba hystolitica*, *Ancylostoma* sp., *Ascaris* sp. *Fasciola hepatica* e *Strongyloides stercoralis*, cuyo factor de reducción varió entre 18,2 y 100%. Puede ser observado que hubo diferencia estadisticamente significativa entre la concentración de coliformes totales y termotolerantes en el elfuente no tratado e tratado, mostrando una reducción en la concentración de esos organismos indicadores después del tratamiento en la ETE-Ribeirão Preto/SP. No hubo correlación significativa entre las concentraciones de coliformes totales y termo-tolerantes en relación a la concentración de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp.. En relación a los análisis de virus, se obtuvo respuesta positiva para Rotavirus y Adenovirus en muestras del efluente antes y después del tratamiento, mostrando menor absorvancia en el efluente tratado. Los resultados obtenidos contribuyen para la identificación y caracterización de microorganismos de transmisión hídrica en efluentes tratados en la ETE-RP, proyectando informaciones útiles para la definición de políticas públicas de saneamiento, referentes al control de la calidad microbiológica de las aguas residuales en el país.

**Palabras claves:** Aguas residuales. *Giardia* spp.. *Cryptosporidium* spp.. Entero-parásitos. Bacterias. Virus.

# LISTA DE FIGURAS


Figura 1 - Fluxograma de propagação de doenças parasitárias, bacterianas e virais no ambiente.....26.

Figura 2 - Cistos de *Giardia* spp. visualizado em microscopia de Contraste de fase e DAPI.....31

Figura 3 - Ciclo da *Giardia* spp. no ser humano.....32

Figura 4 - Oocistos de *Cryptosporidium* spp. visualizados em microscopia de Contraste de fase e DAPI.....35

Figura 5 - Ciclo biológico do *Cryptosporidium* spp. .....36

Figura 6 - Distribuição estrutural das proteínas do *Rotavirus*.....42

Figura 7 - Fotomicrografia de partículas de *Adenovirus* humano.....45

Figura 8 - Distribuição global do número estimado de mortes relacionadas com o *Rotavirus*. Cada ponto representa 1000 mortes.....48

Figura 9 - Localização do município de Ribeirão Preto.....56

Figura 10 - Estação de Tratamento de Esgoto Caiçara – Ribeirão Preto/SP.....57

Figura 11 - Estação de Tratamento de Esgoto Ribeirão Preto/SP.....57

Figura 12 - Localização e fotografia aérea da Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto/SP.....58

Figura 13 - Coleta de esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP.....59

Figura 14 - Etapas da filtração para concentração da amostra.....61

Figura 15 - Preparação da esponja para homogeneização.....61

Figura 16 - Etapa de homogeneização e decantação da amostra no béquer.....62

Figura 17 - Centrifugação e separação imunomagnética das amostras.....63

Figura 18 - Visualização do processo de agitação e homogeneização da amostra.....64

Figura 19 - Homogeneização da amostra a 180° e ressuspensão com água destilada.....65

Figura 20 - Etapas de agitação e dissociação térmica da amostra.....66

Figura 21 - Etapas de coloração e leitura da amostra.....67

Figura 22 - Câmara de Sedgwick-Rafter.....71

Figura 23 - Preparo das diluições decimais.....72

Figura 24 - Leitura dos coliformes totais e termotolerantes pelo Método Colilert® após 24 horas de incubação.....73

Figura 25 - Célula de Agitação.....74
Figura 26 - Procedimento realizado no Elisa Sanduíche.....75
Figura 27 - Imagens de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. capturadas durante a análise de amostras de esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP.....78
Figura 28 - Distribuição das concentrações de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP.....83
Figura 29 - Distribuição das concentrações de coliformes totais e termotolerantes detectados nas amostras de esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP.....91
Figura 30 - Visualização da variação da Absorbância durante o Teste de Elisa - RIDASCREEN® para *Rotavirus* e *Adenovirus* no esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP.....95

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais agentes causadores de doenças de veiculação hídrica.....27

Tabela 2 - Lista das assemblages e espécies de *Giardia duodenalis*, e seus principais hospedeiros.....30

Tabela 3 - Concentração de cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP: valores individuais, média aritmética, valores mínimos e máximos.....80

Tabela 4 - Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP: valores individuais, média aritmética, valores mínimos e máximos.....80

Tabela 5 - Média da concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em esgoto bruto e tratado por diferentes sistemas de tratamento.....81

Tabela 6 - Remoção de parasitas no esgoto bruto durante o tratamento da ETE-Ribeirão Preto/SP.....88

Tabela 7 - Concentração de coliformes totais e termotolerantes no esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP, expresso em NMP/100mL.....90

Tabela 8 - Valores da Absorbância (A) obtidos na Técnica de Elisa - RIDASCREEN® durante a análise de *Rotavirus* e *Adenovirus* no esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP.....94

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| AIDS | Síndrome de Imunodeficiência Adquirida |
| APHA | American Public Health Association (Associação Americana de Saúde Pública) |
| C. | *Cryptosporidium* |
| CDC | Centers for Disease Control (Centro de Controle de Doenças) |
| CE | Ceará |
| CETESB | Companhia Ambiental do Estado de São Paulo |
| CNRH | Conselho Nacional de Recursos Hídricos |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| DABCO/glicerol | Glicerol e PBS |
| DAERP | Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto |
| DAPI | 4’,6-diamidino-2-fenilindol |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DP | Desvio Padrão |
| ds RNA | Ácido Ribonucléico – dupla fita |
| *E. coli* | *Escherichia coli* |
| EPA | Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental) |
| ESVs | Vesículas secretoras específicas |
| ETE | Estação de Tratamento de Esgoto |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FAPESP | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo |
| FITC | Fluocromo isotiocianato de fluoresceína |
| G. | *Giardia* |
| gdh | Glutamato desidrogenase |
| HAdV | *Adenovirus* |

| | |
|---|---|
| HAV | *Hepatite A* |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| ICTV | Comitê Internacional de Taxonomia Viral |
| IMS | Separação Imunomagnética |
| KI | Iodeto de potássio cristalizado |
| LEPA | Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental |
| MG | Minas Gerais |
| min. | Minuto |
| MPC - 1 | Concentrador de partículas magnéticas |
| MPC-M | Concentrador de partículas magnéticas |
| MUG | 4-metil-umbeliferil |
| NMP | Número mais provável |
| NSPs | Proteínas não estruturais |
| NTU | Unidade Nefelométrica de Turbidez |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| ONPG-MUG | o-nitrofenil – Método do Substrato Cromogênico |
| PBS | Tampão salina fosfato |
| PBST | Tampão salina fosfato Tween |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PROSAB | Programa de pesquisas em Saneamento Básico |
| sp. | Espécie |
| spp. | Espécies |
| q.s.p. | Quantidade suficiente para |
| rpm | Rotação por minuto |
| RV | *Rotavirus* |

| | |
|---|---|
| SP | São Paulo |
| TMB | Tetrametilbenzidina |
| UASB | Upflow anaerobic sludge (Reator anaerobic de fluxo ascendente e manta de lodo) |
| Unicef | Fundo das Nações Unidas para a infância |
| USEPA | United States Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos EUA) |
| USP | Universidade de São Paulo |
| UV | Ultravioleta |
| VPs | Proteínas virais |
| WHO | Organização Mundial da Saúde |

# LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| % | Porcentagem |
| °C | Graus Celsius |
| < | Menor que |
| µm | Micrômetro |
| g | Grama |
| h | Hora |
| $I_2$ | Iodo em pó |
| L | Litro |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| n° | Número |
| Nm | Nanômetro |
| + | Positivo |

# SUMÁRIO

**1. INTRODUÇÃO**.....21

**2. REVISÃO DA LITERATURA**.....25

2.1. Doenças de transmissão hídrica.....25

2.2. Doenças de transmissão hídrica causadas por protozoários.....27

2.2.1 *Giardia lamblia*.....28

a) Biologia.....28

b) Morfologia.....30

c) Transmissão.....31

2.2.2 *Cryptosporidium hominis*.....34

a) Biologia.....34

b) Morfologia.....34

c) Transmissão.....35

2.2.3 Surtos de Giardose e Cryptosporidiose associados à água e alimentos.....37

2.3. Doenças de transmissão hídrica causadas por vírus entéricos.....40

2.3.1 *Rotavirus*.....41

a) Biologia.....41

b) Morfologia.....42

c) Transmissão.....43

2.3.2 *Adenovirus*.....44

a) Biologia.....44

b) Morfologia.....45

c) Transmissão.....46

2.3.3 Surtos de viroses associados à água e alimentos.....46

2.4. Parâmetros Microbiológicos.....48

2.5. Processos de Tratamento de Esgoto.....49

2.5.1 Processo de lodos ativados.....50

**3. OBJETIVOS**.....52

**4. MATERIAL E MÉTODOS**.....56

4.1. Cenário do Estudo.....56

4.2. Local da Pesquisa.....56

4.3. Coleta de amostras.....58

4.4. Métodos de análise do esgoto.....60

4.4.1 Turbidez.....60

4.4.2 Preparação da amostra para análise de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em esgoto bruto (McCuin & Clancy - 2005) .....60

4.4.3 Preparação da amostra para análise de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em esgoto tratado (Método 1623 – EPA).....60

a) Filtração.....60

b) Eluição.....61

c) Concentração das amostras de esgoto bruto e tratado.....62

d) Separação imunomagnética das amostras de esgoto bruto e tratado.....63

e) Critérios de positividade para identificação de cistos e oocistos.....67

***Imunofluorescência***.....67

***Contraste de fase***.....67

***Teste confirmatório utilizando o DAPI***.....68

f) Teste de Eficiência da separação imunomagnética (IMS).....68

O Easy seed TMBTF (Biotecnology Frontiers Australia)……...68

O Color seed TMBTF (Biotecnology Frontiers Australia)……..…68

g) Cálculo da Eficiência de Recuperação (%).....69

h) Quantificação dos cistos e oocistos.....70

4.4.4 Análise de cistos, ovos e larvas de helmintos e protozoários.....70

a) Procedimento.....70

4.4.5 Análise microbiológica das amostras de esgoto bruto e tratado.....71

a) Procedimento.....72

4.4.6 Análise de vírus.....73

a) Concentração do esgoto bruto e tratado através da Célula de Agitação (Mllipore®).....73

b) Método de detecção do vírus.....74

c) Procedimento.....75

d) Interpretação dos resultados da análise viral.....76

***Validação do Teste***.....76

**5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....77

5.1. Cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo Método 1623 (EPA, 2005) modificado por McCuin & Clancy (2005).....77

5.2. Cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos identificados por métodos analíticos tradicionais.....87

5.3. Parâmetros Microbiológicos.....89

5.4. Parâmetros Virológicos.....93

**6. CONCLUSÕES**..... 98

**7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**.....101

**8. REFERÊNCIAS**.....104

**APÊNDICES**.....129

**ANEXO..**.....136

# *INTRODUÇÃO*

# 1. INTRODUÇÃO

O transporte de microrganismos patogênicos pelas águas é um fator importante no comprometimento dos recursos hídricos e na disseminação de processos infecciosos em populações, especialmente quando sistemas de abastecimento de águas e tratamento de esgotos são precários (RIVIERA; MARTINS, 1996).

A elevada incidência de doenças parasitárias, bacterianas e virais é um problema permanente para a saúde pública pelo fato de apresentar ampla distribuição geográfica em todo o mundo, e principalmente nos países em desenvolvimento. As condições climáticas, o nível sócio-econômico e a falta de educação são elementos que unidos à falta de saneamento básico e a baixa qualidade de água, contribuem para a disseminação de microrganismos patogênicos de transmissão fecal oral.

De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que em 2007 existiam cerca de 1,1 bilhões de pessoas sem acesso à água segura e 2,6 bilhões sem saneamento adequado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2007). O déficit do setor de saneamento básico é elevado, sobretudo no que se refere ao esgotamento sanitário devido a diversos fatores, dentre eles, podem ser mencionados a fragmentação de políticas públicas e a carência de instrumentos de regulamentação e regulação (NASCIMENTO; HELLER, 2005) e insuficiência e má aplicação de recursos públicos.

No Brasil, a cobertura dos serviços de saneamento básico ainda é bastante deficiente e está distante de atingir um índice satisfatório. Assim, as parasitoses intestinais e as viroses, devido a sua elevada prevalência e diversidade de manifestações clínicas, representam um problema de grande importância em saúde pública, uma vez que aproximadamente um terço da população brasileira vive em condições ambientais propícias à disseminação das infecções parasitárias e virais (MUNIZ; QUEIROZ, 2002).

A ocorrência de doenças como o cólera, a febre tifóide, a giardiose, a amebíase, a hepatite A e diarréia, são constantes entre a população menos favorecida, evidenciando a iniqüidade social existente no país, o que contribui para a diminuição da qualidade de vida da população (BRASIL, 2004).

A doença diarréica ou gastroenterite é uma síndrome que pode ser causada por diferentes agentes como parasitas, bactérias e vírus. O *Rotavirus* e a *Escherichia coli*

enteropatogênica são os patógenos mais comuns nos episódios agudos de diarréias em crianças de todo o mundo (BORGES et al., 2009). A importância desses agentes está relacionada às condições de saneamento básico e higiene da população.

Embora as estatísticas demonstrem o declínio da mortalidade em países desenvolvidos durante as duas ultimas décadas, a diarréia ainda permanece como uma das principais causas de morte em crianças menores de cinco anos de idade em países em desenvolvimento (O'RYAN et al., 2001; PARASHAR et al., 2003).

A maioria das infecções sintomáticas ocorre em crianças menores de dois anos de idade e, entre as crianças menores de cinco anos. Estima-se que uma em cada cinco precisa de cuidados médicos, e uma em cada 65 é hospitalizada (BRICKS, 2005; GLASS et al.; 2005). Segundo a OMS (2008), cerca de 88% dos casos de diarréia no mundo estão relacionados ao saneamento inadequado ou insuficiente; o que resulta em 1,5 milhões de mortes a cada ano, sendo que a maioria dos óbitos ocorrem em crianças.

Segundo Craun et al. (2006), durante 1920 a 2002, 883.806 casos de doenças hídricas foram relatados, apresentando uma média de 10.648 casos por ano. A média anual do número de casos variou de um mínimo de 1.249, durante 1951 a 1960 para uma alta de 36.162 casos durante 1991-2002. Durante 1920 a 2002, 1.165 mortes foram registradas, uma média de 14 mortes por ano. Durante o período de 12 anos de 1991-2002, 73 mortes foram registradas (uma média de 6 mortes por ano), onde 50 óbitos foram associado com o surto de criptosporidiose em Milwaukee, Estados Unidos.

Os impactos à saúde atribuídos à falta de saneamento são significativos e são causados pela exposição à patógenos através de várias rotas como ingestão de água contaminada, contato com parasitas como helmintos que vivem ou cujos ciclos de vida estão associados aos corpos d'água, contato direto ou indireto com fezes, contaminação da água antes ou após a captação e as relacionadas às toxinas produzidas por bactérias associadas à eutrofização de corpos d'água. Essas diferentes categorias, que muitas vezes estão associadas, demonstram como o saneamento e doenças relacionadas à higiene podem afetar a população (MONTGOMERY; ELIMELECH, 2007).

Como resultado do uso de água pelo homem, em função de seus hábitos de higiene e de suas necessidades fisiológicas, é formado o esgoto doméstico/sanitário que, por sua vez, é composto pelas águas de banho, urina, fezes, restos de comida, detergentes e águas de lavagens. De modo geral, pode-se dizer que, sem contar com a

significativa contribuição de despejos industriais, os esgotos domésticos são constituídos de aproximadamente 99,9% de água e 0,1% de sólidos (peso seco). De maneira geral, a produção de esgotos está intimamente ligada ao consumo de água, aproximadamente 60% a 80% do consumo de água é convertido em esgoto (SANTOS; KRESPKY, 1998).

Esgoto é o termo utilizado para caracterizar os dejetos provenientes dos diversos usos das águas, como por exemplo, uso doméstico (efluentes de vasos sanitários, cozinhas, chuveiros, etc.), industrial (oriundos dos processos específicos de cada segmento da produção industrial), comercial (restaurantes, hotéis, aeroportos, etc.), de estabelecimentos públicos (serviços de saúde, escolas, e repartições públicas), infiltração de água na rede de esgotos, agrícola, etc. (SANTOS; KRESPKY, 1998).

Deve-se lembrar que os esgotos domésticos contêm inúmeros microorganismos vivos, tais como: vírus, bactérias, helmintos e protozoários que, na sua maioria, são eliminados com os dejetos humanos (SANTOS; KRESPKY, 1998). Alguns desses organismos desempenham um papel importante no tratamento das águas residuárias; outros, porém, são denominados de organismos patogênicos, veiculadores de doenças.

As pesquisas de patógenos e parâmetros físico-químicos em esgoto, antes e depois de ser submetido a algum tratamento é de grande importância epidemiológica no âmbito da saúde pública. O desenvolvimento desse tipo de estudo, permite verificar a eficiência dos sistemas de tratamento implementados e avaliar a possibilidade de veiculação de doenças para a população, perante potenciais usos que sejam dados aos efluentes que recebem águas residuais tratadas.

Nesse contexto, consideram-se necessários os estudos que objetivem conhecer melhor a biologia, a ecologia e a dinâmica dos agentes patogênicos no esgoto, além daqueles que busquem o desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias que melhorem os processos de tratamento e de desinfecção da água e do esgoto.

O presente estudo aborda as questões relacionadas à identificação de bioagentes patogênicos no esgoto enquadrando-se nessa relevante temática.

# REVISÃO DA LITERATURA

# 2. REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1. Doenças de Transmissão hídrica

Segundo o Unicef (Fundo das Nações Unidas para a Infância), menos da metade da população mundial tem acesso à água potável. Estima-se que 1,2 bilhões de pessoas (35% da população mundial) não têm acesso à água tratada e 1,8 bilhões de pessoas (43% da população mundial) não contam com serviços adequados de saneamento básico. Diante desses dados, constata-se que 10 milhões de pessoas morrem anualmente em decorrência de doenças intestinais transmitidas pela água (UNICEF, 2008).

Com isso, o impacto em saúde pública torna-se cada vez maior, principalmente aquele relacionado às doenças de veiculação hídrica. Dentre elas estão enquadradas as doenças causadas por bactérias (*Salmonella typhi*, *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira* sp.); vírus (*Enterovirus*, *Rotavirus*, *Vírus da hepatite A*, *Adenovirus*); protozoários (*Entamoeba histolytica*, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp.) e helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Schistosoma mansoni* e *Trichuris trichiura*) (KARANIS et al., 2007).

Com relação às doenças de veiculação hídrica, o esgoto tem sido a principal fonte de contaminação, no caso de surtos epidêmicos (CRAUN, 1998). A transmissão de doenças humanas pelo esgoto (não tratado) pode ocorrer de forma direta e/ou indireta (SOCCOL; PAULINO; CASTRO, 1998; GONÇALVES; LIMA; PASSAMANI, 1999; MEDEIROS et al., 1999) ou ainda, de forma vetorizada (GONÇALVES; LIMA; PASSAMANI, 1999).

A contaminação direta pode ocorrer pelo manejo de áreas onde o esgoto foi aplicado, pelo contato com vegetais crus irrigados com esgoto e/ou cultivados em solo adubado com lodo e pela inalação de microorganismos patogênicos através da aerossolização de partículas do lodo no solo (GONÇALVES; LIMA; PASSAMANI, 1999; MEDEIROS et al.,1999).

A transmissão indireta pode acontecer por consumo de vegetais, carne, leite e animais que tenham sido contaminados por patógenos presentes no esgoto e no lodo, pela ingestão de água contaminada, pela proximidade das áreas de aplicação do lodo e pelo contato com agentes vetores (roedores e insetos), que tenham estado nas áreas

contaminadas (GONÇALVES; LIMA; PASSAMANI, 1999; MEDEIROS et al., 1999). Um fluxograma que representa a propagação de doenças parasitárias, bacterianas e virais no ambiente é apresentado na Figura 1.

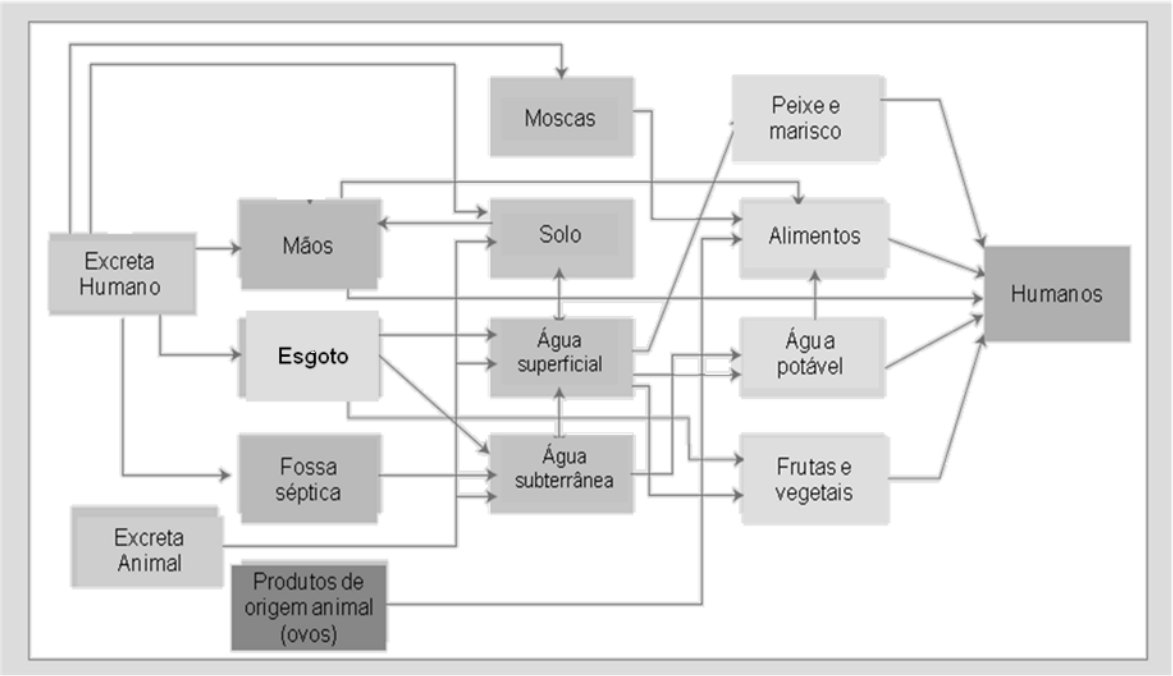


Figura 1- Fluxograma de propagação de doenças parasitárias, bacteriana e virais no ambiente.
Fonte - Adaptado de OMS, 2008

Para o desenvolvimento da doença, vários fatores devem ser considerados, tais como: dose infectante, patogenicidade (capacidade do agente infeccioso em causar doenças e danos ao hospedeiro), fatores ambientais e susceptibilidade do hospedeiro. Para ocorrer a disseminação de uma infecção, uma dose infectante do agente patogênico tem de ser capaz de passar dos excretas do indivíduo infectado ou reservatório da infecção para a boca ou outra porta de entrada de um indivíduo suscetível (BITTON, 1997).

Alguns dos mais importantes agentes patogênicos presentes na água, tanto em relação ao número de casos já relatados na literatura, quanto em preocupação no contexto de concentração excretada e respectiva dose infectante, estão citados na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais agentes causadores de doenças de veiculação hídrica

| Agente | Doença | Concentração excretada (por grama de fezes) | Dose infectante (n° de organismos) |
|---|---|---|---|
| *Salmonella typhi* (1) | Febre Tifóide | $10^6$ | $10^5$ - $10^9$ |
| *Shigella* spp. (1) | Disenteria Bacilar | $10^6$ | 10 - 100 |
| *Vibrio cholerae* (1) | Cólera | $10^6$ | $10^8$ |
| *Enterovirus* (2) | Gastroenterite | $10^6$ | < 100 |
| *Virus da Hepatite A* (2) | Gastroenterite | $10^6$ | < 100 |
| *Giardia lamblia* (3) | Giardiose | $10^5$ | < 10 |
| *Cryptosporidium* spp. (3) | Criptosporidiose | $10^6$ | < 10 |
| *Entamoeba histolytica* (3) | Amebíase | $10^5$ - $10^7$ | < 100 |
| *Ascaris lumbricoides* (4) | Ascaridíase | 10 - $10^4$ | < 10 |
| *Ancylostoma duodenale* (4) | Ancilostomose | 10 – 100 | < 10 |
| *Taenia* (4) | Teníase | $10^5$ | < 10 |

(1)Bactéria; (2)Vírus; (3)Protozoário; (4)Helminto
Fonte - USEPA, 1999a

Na Tabela 1 estão citados os principais microorganismos causadores de doenças de veiculação hídrica (bactérias, vírus, protozoários e helmintos). Dentre eles, segundo Bouzid et al. (2008), a criptosporidiose, giardiose e amebíase, constituem protozooses que merecem atenção no contexto da saúde pública.

### 2.2. Doenças de transmissão hídrica causadas por protozoários

Atualmente, enfermidades humanas onde os agentes etiológicos são veiculados pela água não estão mais restritas geográfica ou economicamente, pois se tornaram uma preocupação global, atingindo também os países desenvolvidos (GAJADHAR; ALLEN, 2004).

Somente nos Estados Unidos, nos últimos 25 anos, aconteceram 740 surtos de veiculação hídrica, totalizando 571.373 casos e cerca de 100 mortes. Trezentos e quarenta e nove destes surtos não tiveram etiologia identificada, porém, quando identificada, os protozoários foram a principal causa na maioria, seguido das bactérias, dos agentes químicos e dos agentes virais (CRAUN et al., 1998).

Em nível mundial, os protozoários foram a causa de 325 surtos epidêmicos de veiculação hídrica nos últimos anos, ocorridos nos Estados Unidos e Europa, e entre várias espécies, como *Entamoeba histolytica* e *Cyclospora cayetanensis*, destaram-se *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. que foram agentes etiológicos de 50,8% e 40,6% destes surtos, respectivamente (KARANIS et al., 2007).

Estes protozoários causam gastroenterite no homem e em outros animais. O *Cryptosporidium* spp. é, atualmente considerado um patógeno emergente enquanto *Giardia* spp. um patógeno re-emergente (MONIS; THOMPSON, 2003; HUNTER; THOMPSON, 2005), pois as enfermidades criptosporidiose e a giardose, respectivamente, apresentam um aumento da incidência em humanos nas últimas duas décadas e há perspectiva do aumento de casos em um futuro próximo (LUNA, 2002).

Nos países em desenvolvimento, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., juntamente com bactérias e vírus, constituem parte de um complexo grupo de doenças diarréicas que causam grande absenteísmo no trabalho e podem representar uma das causas que impedem o desenvolvimento socioeconômico. Estes protozoários estão incluídos na Iniciativa das Doenças Neglicenciadas da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organisation Neglected Diseases Initiative* - OMS) por causa de sua estreita relação com a pobreza, com a falta de saneamento básico e com a qualidade da água de consumo (SAVIOLI et al., 2006).

### 2.2.1 *Giardia lamblia*

#### a) Biologia

*Giardia lamblia* (sinônimo: *G. duodenalis* e *G. intestinalis*) é um protozoário eucariótico unicelular, flagelado, comum no intestino do homem e causa doenças gastrointestinais com freqüência em todo mundo. O parasito foi observado pela primeira vez por Antonie van Leeuwenhoek em 1681, nas suas próprias fezes, tendo sido mais tarde designado de *Cercomonas intestinalis* em 1859.

Posteriormente, foi-lhe atribuído o nome de *Lamblia intestinalis* por Blanchard em 1888 e a designação *Giardia lamblia* foi aceita a partir de 1970, como homenagem ao professor Alfred Giard (KULDA; NOHÝNKOVÁ, 1995; ADAM, 2001).

Baseado na genética, estrutura e bioquímica; a *Giardia* pertence ao Filo *Metamonada*, subfilo *Trichozoa*, Superclasse *Eopharyngia*, Classe *Trepomonadea*, Subclasse *Diplozoa*, Ordem *Giardiida* e Família *Giardiidae* (CAVALIER-SMITH, 2003).

Durante o período de 1920 e 1930, mais de 50 espécies de *Giardia* foram descritas. Em 1952, Filice propôs uma reavaliação destas espécies com base na morfologia e não na especificidade pelo hospedeiro. Durante a década de 1990, muitos pesquisadores adotaram o nome *G. intestinalis*, mas, atualmente a denominação de *G. lamblia* continua sendo muito aceita pela comunidade de pesquisadores internacionais (ADAM, 2001).

Com um grupo de seis assemblages reconhecidos, *G. duodenalis* é considerada um complexo de espécies com morfologia similar, mas com variedades genéticas e fenotípicas com diferença na especificidade pelo hospedeiro (ALI; HILL, 2003; BERTRAND; SCHWARTZBROD, 2007; THOMPSON, 2004; THOMPSON et al., 2007).

Atualmente, dentro da espécie formalmente conhecida como *G. duodenalis*, numerosos grupos de isolados ou genótipos aparentemente exclusivos de determinadas espécies animais estão sendo reconhecidos (THOMPSON, 2000). Embora um consenso a respeito da nomenclatura para estes grupos ainda não esteja estabelecido, o termo assemblages tem sido adotado se referindo as linhagens da espécie pela análise da seqüência de nucleotídeos do gene da enzima glutamato desidrogenase (gdh) (HUNTER; THOMPSON, 2005).

Tabela 2 – Lista das assemblages e espécies de *Giardia duodenalis*, e seus principais hospedeiros.

| Espécie | Principais Hospedeiros |
|---|---|
| Assemblage A (*G. duodenalis*) | humanos, animais de produção, gatos, cães e castores |
| Assemblage B (*G. enterica*) | humanos, chinchilas, cães, castores e ratos |
| Assemblage C (*G. canis*) | Cães |
| Assemblage E (*G. bovis*) | alpaca, bovinos, caprinos, suínos e ovinos |
| Assemblage F (*G. cati*) | gatos |
| Assemblage G (*G. simondi*) | rato doméstico |

Reclassificação de *G. duodenalis* de Proposta por Thompson; Monis (2004).

As assemblages são geneticamente distintas e sabidamente infectantes para vários hospedeiros. Mesmo com as técnicas moleculares atuais, ainda tem sido difícil interpretar a extensa variabilidade genética observada na *G. duodenalis* (ALI; HILL, 2003; BERTRAND; SCHWARTZBROD, 2007; THOMPSON, 2004).

Nas assemblages A e B encontram-se os genótipos que acometem o homem, podendo ocorrer infecções concomitantes, as assemblages de C a G, são restritas a outros animais (ALI; HILL, 2003; GUY et al., 2004; THOMPSON, 2004).

**b) Morfologia**

*Giardia* spp. durante seu ciclo vital apresenta duas formas distintas: trofozoíto e cisto. O trofozoíto é a forma ativa, na qual se alimenta e se reproduz, tem formato de pêra com aproximadamente 8 a 18 µm de comprimento, 5 a 15 µm de largura e 1 a 2 µm de espessura, possui dois núcleos e quatro pares de flagelos livres (anterior, caudal, posterior e ventral) que emergem das duas fibras longitudinais ou axonemas. No citoplasma estão presentes ribossomos, glicogênio e vacúolos lisossomais. O aparelho de Golgi torna-se visível nos trofozoítos durante o encistamento (REINER et al., 1990; GILLIN; REINER, 1996), embora outras organelas presentes nos eucariotas, como mitocôndrias, peroxissomas e nucléolos não tenham sido, ainda, identificados (ADAM, 2001).

O cisto é a forma infectante e também de resistência. Apresenta uma forma ovóide ou elipsóide com aproximadamente 8 a 12 µm de comprimento e é revestida por uma fina parede de 0,3 a 0,5 µm de espessura, composta por filamentos de 7 a 30 nm de largura. No interior do cisto encontram-se os axonemas flagelares, vacúolos, ribossomos, grânulos de glicogênio, fragmentos do disco e quatro núcleos pequenos (KULDA; NOHÝNKOVÁ, 1995; ADAM, 2001; HERESI et al., 2000; USEPA, 2005).

A Figura 2 ilustra a *Giardia* spp. na forma de cisto.

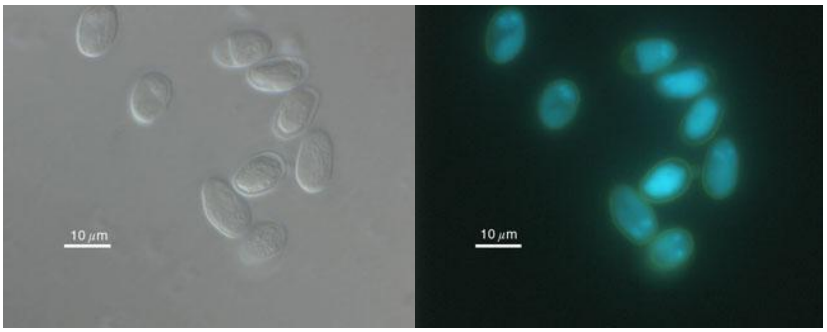


Figura 2- Cistos de *Giardia* spp. visualizado em microscopia de Contraste de fase e DAPI.
Fonte - USEPA, 2005

**c) Transmissão**

O ciclo de vida da *Giardia* spp. é monoxênico. A infecção se inicia pela ingestão do cisto por meio da água e alimentos contaminados ou pela via direta fecal-oral ou anal-oral, conforme visualizado na Figura 3.

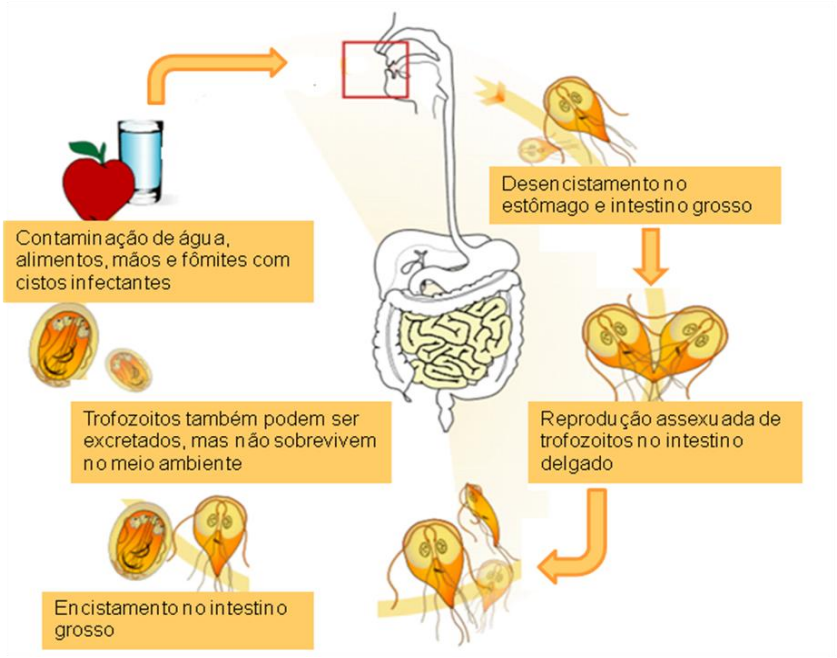


Figura 3 - Ciclo da *Giardia* spp. no ser humano
Fonte - Adaptado de: CDC, 2011

Os cistos ingeridos pelo hospedeiro, expostos às enzimas e pH ácido do estômago, desencistam nas primeiras porções do intestino delgado dando origem aos trofozoítos (BINGHAM; MEYER, 1979). Após a eclosão, o trofozoíta alonga-se e inicia-se a citocinese formando-se dois trofozoítos (BUCHEL et al., 1987). Após o desencistamento, o trofozoíto adere à mucosa intestinal e multiplica-se assexuadamente por divisão binária longitudinal. Os trofozoítos são formas muito sensíveis não conseguindo sobreviver no meio exterior e, assim, quando as condições do “habitat” sofrem alterações de pH, tensão de oxigênio e temperatura, o trofozoíto encista. O encistamento tem lugar geralmente no baixo íleo e, reproduzindo-se as condições aí existentes, foi possível seguir este processo in vitro tendo–se verificado um ótimo encistamento na presença de sais biliares, ácidos glicólico e mirístico, a pH 7,8 (GILLIN et al., 1987, 1989; ADAM, 2001; BASTOS et al., 2003; HERESI et al., 2000).

Durante o processo de encistamento, os trofozoítos tornam-se arredondados e destacam-se do substrato, perdendo a mobilidade flagelar. As células ficam refráteis, os núcleos dividem-se e forma–se uma parede resistente. A microscopia eletrônica revela que antígenos específicos dos cistos aparecem no aparelho de Golgi ao final de 5 horas

de indução do encistamento e que ao fim de 6 a 18 horas, esses antígenos aparecem armazenados em vesículas secretoras específicas (ESVs) que os transportam para a periferia de modo a integrarem a parede do cisto (GILLIN; REINER, 1996). A formação das ESVs é a primeira alteração visível ao microscópio óptico. Após 44 a 77 horas de encistamento a parede fica concluída e os dois núcleos dividem-se simultaneamente, produzindo um cisto maduro com quatro núcleos (GILLIN et al., 1987; SCHUPP et al., 1988; REINER et al., 1990). Os cistos são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro e, uma vez ingeridos por um hospedeiro susceptível, por via direta fecal-oral, ou indireta por veiculação hídrica e/ou alimentar, inicia-se um novo ciclo.

Além disso, os cistos podem ser eliminados por pessoas e animais doentes sintomáticos e também assintomáticos. O período de incubação varia de uma a duas semanas antes do aparecimento dos sintomas, entre eles: diarréia, náuseas, desconforto abdominal e perda de peso (HERESI et al., 2000; CIMERMAN; CIMERMAN, 2003).

Os sintomas da fase aguda desaparecem, normalmente, em alguns dias e a infecção pode ser suprimida em 2 a 6 semanas. Contudo, em alguns casos e independente das condições imunológicas dos hospedeiros estarem normais ou não, a fase aguda evolui para a fase crônica e a sintomatologia manifesta-se por curtos e recorrentes períodos. Os indivíduos que apresentam cistos nas fezes sem haver sintomatologia representam importantes reservatórios na disseminação da infecção (SMITH, 1985; ADAM, 2001; THOMPSON et al., 1993).

Giardiose é comum entre crianças que freqüentam creches, no mundo (HOMAN; MANK, 2001; THOMPSON, 2000). Os fatores de risco investigados são as variáveis relacionadas às características das creches, ao histórico familiar e condições sócio-econômicas das crianças (FRANCO; CORDEIRO, 1996; GUIMARÃES; SOGAYAR, 2002; MALTA et al., 2002, SCHNACK et al., 2003).

A má absorção da lactose é freqüente em crianças com giardiose sintomática (TOLBOOM et al., 1987), podendo contribuir para os distúrbios gastrointestinais (diarréia, flatulência e desconforto abdominal) comuns da infecção. Contribui significativamente para o retardo no crescimento devido à deficiência nutricional decorrente da não absorção de vitaminas lipossolúveis pelo hospedeiro infectado (ORTEGA; ADAM, 1997).

A terapêutica da giardiose tem apontado alguns problemas devido à elevada incidência de efeitos secundários e recidivas freqüentes (UPCROFT; UPCROFT, 2001).

Muitos fármacos têm sido utilizados, como os nitroimidazois, furazolidona, paramomicina (GARDNER; HILL, 2001; UPCROFT; UPCROFT, 2001). O metronidazol é recomendado pela OMS e é considerado como o fármaco de primeira escolha no tratamento da giardiose em muitos países (UPCROFT; UPCROFT, 1993).

A *Giardia* spp. é o protozoário que mais está associado a doenças diarréicas no mundo; só em 1981, 28% dos surtos reportados foram de giardiose (ADAM, 2001). A Organização Mundial de Saúde estimou 3,5 bilhões de pessoas no mundo são parasitadas, dentre elas 800 milhões têm giardiose. Nos países desenvolvidos os portadores de *Giardia* spp. são estimados entre 2 a 7% e nos países em vias de desenvolvimento as taxas de infecção podem atingir 5 a 50% da população (OMS, 2005).

### 2.2.2 *Cryptosporidium hominis*

#### a) Biologia

O gênero *Cryptosporidium* spp. foi descrito pelo parasitologista Ernest Edward Tyzzer em 1907 (TZIPORI; WIDMER, 2008), entretanto, somente após 70 anos, este protozoário foi reconhecido como um importante agente patogênico intestinal humano (NIME et al., 1976); pois, tornou-se comum em pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), ocorrendo também com maior freqüência em outros indivíduos imunocomprometidos, tais como, pacientes transplantados (CIMERMAN; CIMERMAN, 2004; FAYER et al., 2000; HUNTER; THOMPSON, 2005).

Taxonomicamente, *Cryptosporidium* spp. pertence ao Phylum Apicomplexa; Classe Sporozoa; Sub-classe Coccidiasina; Ordem Eucoccidiorida; Família *Cryptosporidiidae* (LEVINE, 1988).

#### b) Morfologia

*Cryptosporidium* spp. é um organismo diminuto, variável em seu tamanho de acordo com as diferentes formas evolutivas, entre 4 a 6 µm de diâmetro, apresentadas durante o seu ciclo vital monoxeno (Figura 4). O oocisto esporulado é o único estágio exógeno, consistindo-se de quatro esporozoítos livres envolvidos por uma parede de duas

camadas, e é eliminado do corpo do hospedeiro infectado pelas fezes (CURRENT, 1985; FAYER et al., 2000).

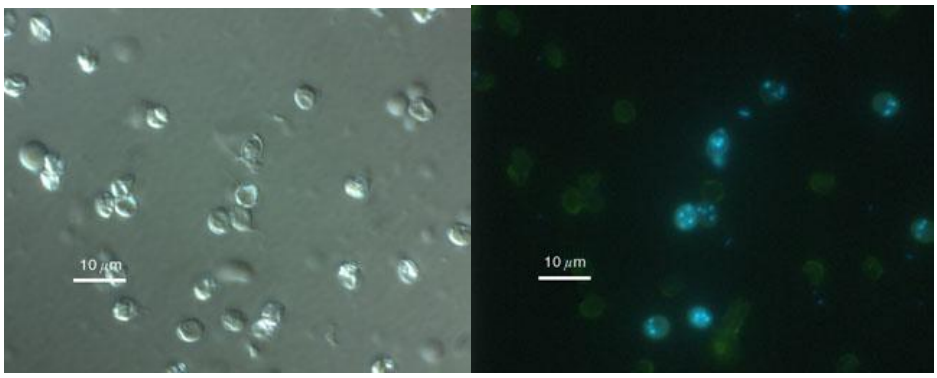


Figura 4- Oocistos de *Cryptosporidium* spp. visualizados em microscopia de Contraste de fase e DAPI.
Fonte- USEPA, 2005

**c) Transmissão**

As vias de transmissão são do tipo fecal-oral e podem ser: pessoa-pessoa por contato direto ou indireto; animal-animal; animal-homem; água e alimentos contaminados (FAYER et al., 2000).

O ciclo de vida do *Cryptosporidium* spp. é mais complexo, pois possui estágios de reprodução assexuada e sexuada para se ter a formação do oocisto, como pode ser visualizado na Figura 5.

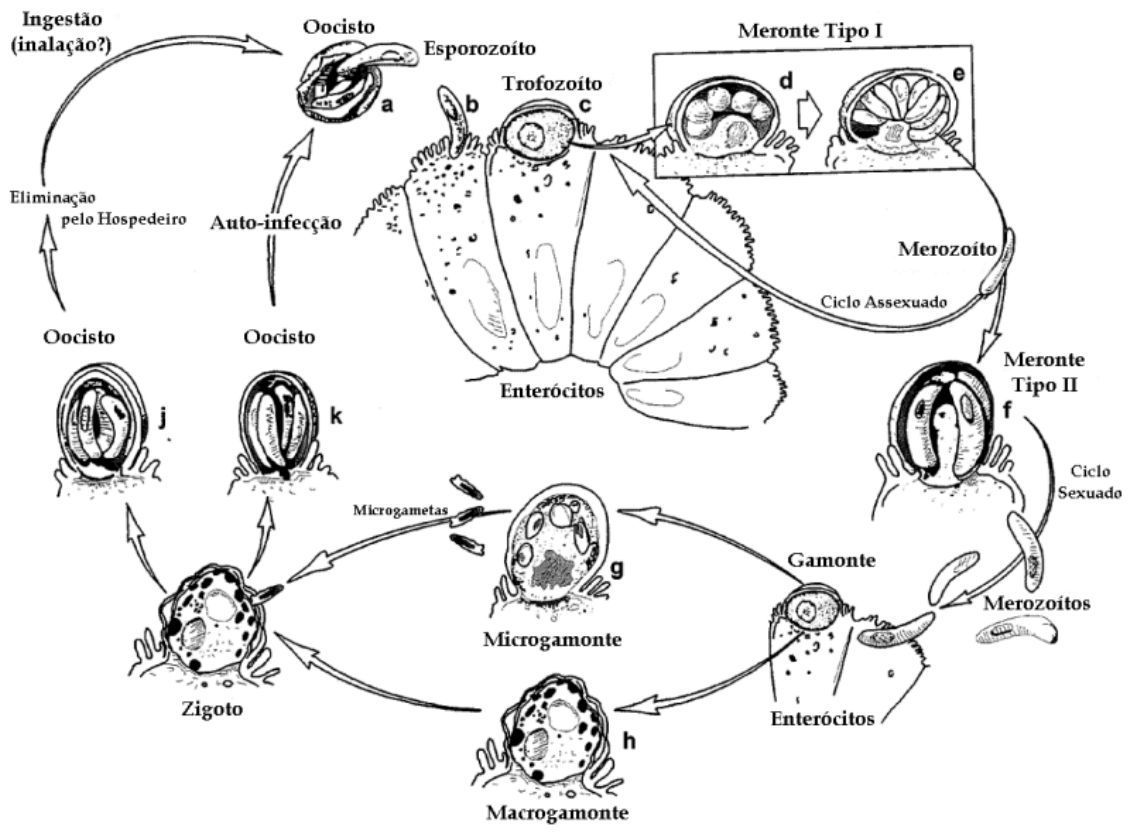


Figura 5 - Ciclo biológico do *Cryptosporidium* spp..
Fonte - CDC, 2011

Após serem ingeridos os oocistos liberam esporozoítos no intestino delgado, os quais penetram nas células epiteliais e se transformam em trofozoítos. Após a reprodução assexuada e sexuada, são formados dois tipos de oocistos: um de parede espessa (80%) que é liberado no ambiente junto com as fezes; e outro de parede mais fina (20%) que talvez seja o responsável por casos de auto-infecção (BASTOS et al., 2003; HUNTER; THOMPSON, 2005; SANTOS, 2007).

A infeccção por *Cryptosporidium* spp. pode ser assintomática ou após um período de incubação de sete a dez dias, cerca de 90% dos indivíduos acometidos podem apresentar até 20 episódios diários de diarréia. Também pode apresentar outros sintomas como: febre, vômitos, cólica, perda de peso (CIMERMAN; CIMERMAN, 2004; DUPONT et al., 1995).

A infecção por *Cryptosporidium* spp. tem sido associada com alterações funcionais e estruturais do intestino delgado, porém a patogênese da diarréia, que é o sintoma

predominante, não é, até o presente, inteiramente compreendida. As interações iniciais de ligação, invasão e de formação do vacúolo parasitóforo são processos complexos que envolvem múltiplos ligantes do parasito e os receptores do hospedeiro. Nos pacientes imunocompetentes, a maioria das infecções é auto-limitada e pouco se sabe sobre a taxa de infecção assintomática (BERN et al., 2002).

No Brasil, estudos em comunidades pobres nas redondezas de Fortaleza (CE) revelaram que crianças em seus primeiros dois anos de vida podem sofrer influência em seu crescimento devido aos repetidos episódios diarréicos provocados pela criptosporidiose (ZU et al., 1994).

### 2.2.3 Surtos de *Giardiose e Cryptosporidiose* associados à água e alimentos

No esgoto, o número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. são bastante variáveis, em função do tamanho da população ou atividade humana. Madore et al. (1987) encontraram concentrações de até 13.700 oocistos/L em efluentes bruto e 3.960 oocistos/L em efluentes tratados, em área que sofria influência por atividade agropecuária.

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

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

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

de verificar a eficiência da remoção dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. presença de cistos e oocistos ocorreu em 83,0 e 33,0 % das amostras dos efluentes tratado da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE).

De 1984 a 2000, 56 surtos de criptosporidiose de veiculação hídrica foram relatados nos Estados Unidos afetando cerca de 434.676 pessoas (LEVINE; WILLIAM, 1990; CRAUN et al., 1998; FAYER et al., 2000). No mesmo período, países como Reino Unido, Canadá, Japão, Itália, Nova Zelândia e Irlanda do Norte registraram um total de 47 surtos (FAYER et al., 2004). As águas destinadas ao consumo humano foram responsáveis por 59,2 % de todas estas ocorrências e aquelas utilizadas para recreação, 40,7 %.

Até o momento, o surto epidêmico de veiculação hídrica identificado em Milwaukee, Wisconsin, EUA em 1993, cujo agente etiológico foi *Cryptosporidium* spp., confirmou-se como o mais expressivo dos surtos, e afetou aproximadamente 403.000 pessoas causando 100 mortes (MACKENZIE et al., 1994). Peng et al., (1997) confirmaram o *Cryptosporidium hominis* como o verdadeiro agente etiológico deste surto.

O primeiro surto epidêmico de giardiose comprovadamente de origem hídrica, foi relatado em 1965, em Aspen, Colorado (EUA), onde um levantamento realizado entre 1994 esquiadores que entravam em contato diário com esgotos domésticos (ROSE; SLIFKO, 1999). Payment et al. (2001) avaliaram uma ETE na região de Montreal, Canadá, estudando não somente a ocorrência destes protozoários, como também a presença de vários outros microrganismos. Concentrações médias de cistos de *Giardia* spp. foram de 1.165 cistos/L no esgoto público e 285 cistos/L no efluente tratado, apresentando uma variação muito pequena das concentrações no período estudado. Os valores das médias de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram de 6 oocistos/L no esgoto bruto e 4 oocistos/L no efluente tratado e várias amostras apresentaram resultados negativos.

No Brasil, as pesquisas sobre a presença destes protozoários são relativamente recentes. Dias Júnior (1999, apud CANTUSIO NETO, 2004) analisou a presença destes protozoários em amostras de esgoto na cidade de Araras-SP e observou densidades de 2.227/L e 472/L de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* spp., respectivamente.

Já Farias (2000) ao analisar amostras de esgoto na cidade de São Paulo encontrou concentrações de 1.200 oocistos/L de oocistos de *Cryptosporidium* spp., o que reforça a

importância da realização do controle de oocistos de protozoários em esgoto tratado para reuso, principalmente de cistos de *Giardia* spp., que têm sido encontrados com maior freqüência e em concentrações bem mais elevadas em relação aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. Garcia et al. (2002) confirmaram o achado e discutem que a presença de cistos de *Giardia* spp. no efluente final de tratamento terciário representa um risco potencial para programas de reuso de água.

Bastos et al. (2004) encontraram 2,0 a 140 cistos/L e de 4,0 a 510 00 cistos/L em mananciais de abastecimento da cidade de Viçosa – MG.

Hachich et al. (2004), ao avaliar 10 bacias hidrográficas no Estado de São Paulo, detectaram a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em 278 amostras de água. As concentrações variaram de não detectável a 521 cistos/L para *Giardia* spp. e de não detectável a 20 oocistos/L de *Cryptosporidium* spp.

Em 2005, Ladeia et al. encontraram 1,5 cistos de *Giardia* spp. por litro e atá 62,5 oocistos de *Cryptosporidium* spp. por litro em mananciais superficiais da cidade de Montes Claros – MG.

Várias causas foram responsáveis pelos numerosos surtos de criptosporidiose e giardiose, documentados em diferentes países (ROSE et al., 2002) como o uso e consumo de água superficial não tratada, a contaminação dos sistemas de distribuição ou tratamento inadequado (FAYER et al., 2000) e, na maioria deles, as águas incriminadas atendiam aos padrões de potabilidade exigidos pela legislação específica (SOLO-GABRIELE; NEUMEISTER, 1996).

A qualidade microbiológica da água pode ser monitorada a partir da análise de indicadores de contaminação fecal (por exemplo, bactérias do grupo coliforme). Apesar de abundantes no esgoto e em águas superficiais que receberam contaminação fecal, são eliminadas pelos desinfetantes usuais empregados nos sistemas de tratamento de água o que não ocorre com os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., justificando a recomendação de investigação direta destes organismos em águas destinadas ao consumo humano. Cistos e oocistos podem permanecer por longo tempo no ambiente (LECHEVALLIER et al., 1991), sobrevivendo por semanas em águas superficiais (RODGERS et al., 1995) e também são capazes de resistir ao tratamento com desinfetantes químicos, tradicionalmente empregados para tornar a água potável (DYKSEN et al., 1998).

Atualmente, são registrados casos de criptosporidiose em 90 países e seis continentes (FAYER et al., 2000). Nos países desenvolvidos, as taxas de positividade para *Cryptosporidium* spp. situam-se ao redor de 2% enquanto nos países em desenvolvimento foram registradas prevalências variáveis de 8% a 31,6% (ESTEBAN et al., 1998; FAYER et al., 2000).

Fatores que relacionam o parasita com o ambiente desempenham um papel potencial para essa contaminação, destacando-se a atividade humana e não humana na transmissão zoonótica, o número de hospedeiros infectados, a capacidade infectante das formas eliminadas pelos indivíduos. Ao contrário de outros parasitas, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. são eliminados já na forma infectante.

### 2.3. Doenças de transmissão hídrica causadas por vírus entéricos

Em relação às viroses; os vírus de potencial transmissão hídrica são aqueles que infectam o trato gastrintestinal e são excretados nas fezes de seres humanos, sendo denominados vírus entéricos. Também relevantes do ponto de vista ambiental, são os vírus respiratórios, transmitidos por aerossóis e objetos inanimados contaminados (MARTINS, 2006).

Sabe-se que vírus entéricos como P*oliovirus*, *Rotavirus*, *Adenovirus* e *Virus da hepatite A*, presentes no trato gastrintestinal de indivíduos infectados, são usualmente transmitidos através da via fecal-oral e replicam-se no trato gastrointestinal do hospedeiro (FONG; LIPP, 2005). A dose infectante desses agentes é extremamente baixa variando de uma a dez unidades infecciosas (APPLETON, 2000; ABBASZADEGAN, 2001; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001; LECLERC et al., 2002; ASHBOLT, 2004). Porém, são eliminados em grandes quantidades ($10^5$-$10^{11}$ partículas virais/g de fezes) pelas fezes e são capazes de contaminar direta ou indiretamente as águas destinadas ao consumo humano. A presença destes patógenos em águas ou alimentos contaminados por resíduos fecais, provenientes de descargas de esgotos, tem contribuído para a ocorrência de doenças em indivíduos susceptíveis.

Os vírus entéricos podem permanecer viáveis (potencialmente infectantes) durante vários meses na água, resistindo às condições ambientais adversas, embora não se

multipliquem por serem parasitas intracelulares obrigatórios. Eles podem ser identificados durante todas as estações do ano e alguns vírus podem resistir aos processos de tratamento de água e esgoto aplicados no controle bacteriano, inclusive cloração. Além disso, não apresentam nenhuma correlação em termos qualitativos e quantitativos com os atuais indicadores bacterianos de contaminação de águas (MARQUES, 1991; APPLETON, 2000; ABBASZADEGAN, 2001; MEHNERT et al., 2001; SCHVOERER et al., 2001; LECLERC et al., 2002).

No Brasil, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com a finalidade de avaliar a qualidade microbiológica da água, nos quais são pesquisadas apenas as bactérias (ALVES et al., 2002; VIEIRA et al., 2002; MARQUES, 2003; NOGUEIRA et al., 2003). Raros são os estudos realizados sobre a presença de vírus entéricos humanos em águas para consumo e em esgotos, bem como sobre seu envolvimento em surtos de diarréias, hepatite A e conjuntivites desencadeadas por veiculação hídrica. Isso se dá em razão da disponibilidade de métodos de concentração viral de baixa eficiência de recuperação e de métodos de detecção pouco sensíveis, onerosos e de complexa implantação (MARQUES, 1991; MEHNERT, 2003).

Os vírus entéricos encontram-se distribuídos em todas as partes do mundo e são causadores de muitas doenças que afetam o ser humano tais como gastroenterites, infecções respiratórias, conjuntivites, hepatites e doenças que têm alta taxa de mortalidade como meningite, encefalite e paralisia em indivíduos imunocomprometidos (KOCWA-HALUCH, 2001). Além disso, alguns vírus entéricos têm sido ligados a doenças crônicas como miocardite e diabetes insulino-dependente (KOCWA-HALUCH, 2001; GRIFFIN et al., 2003).

### 2.3.1 *Rotavirus*:

**a) Biologia**

*Rotavirus* (RV) foi evidenciado pela primeira vez em 1943, por Jacob Light e Horace L. Holdes, que publicaram o isolamento de um agente filtrável não bacteriano que era capaz de provocar diarréia, agente este, isolado em material clínico de crianças com gastroenterite aguda (BISHOP et al. 1973).

Desde então o RV tem sido objeto de estudo por diversos pesquisadores em todo o mundo, por ser o principal agente causador de gastrenterite infantil. Quase simultaneamente Flewet et al. (1973) identificaram o vírus por método similar no Reino Unido. Esses autores verificaram por microscopia eletrônica que as partículas virais presentes em fezes de crianças com gastrenterites agudas e de bezerros com quadro clínico de diarréia eram morfologicamente indistinguíveis.

**b) Morfologia**

O termo *Rotavirus* é derivado da palavra latina “rota”, que significa roda e foi sugerido porque o esboço circular do capsídeo do vírus se assemelha à roda de uma carroça (Figura 6).

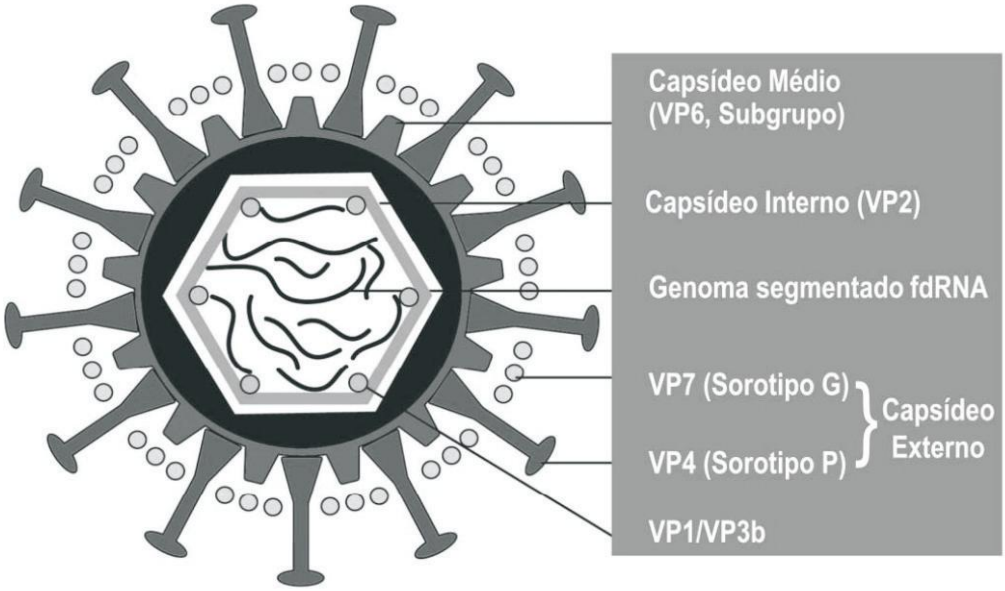


Figura 6 - Distribuição estrutural das proteínas do *Rotavirus*.
Fonte - CUNLIFFE et al., 2002

Em 2009, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) propõe a criação do gênero *Rotavirus*, dentro da Família *Reoviridae* (ICTV, 2009).

A partícula viral completa é esférica e mede entre 60 e 80 nm de diâmetro. É composta por triplo capsídeo icosaédrico, constituído por três camadas protéicas distintas

não envelopadas e tem um genoma composto de 11 segmentos de RNA dupla-fita (dsRNA) (ESTES, 1996; BORGES et al., 2009).

Os segmentos genômicos codificam para um grupo de seis proteínas estruturais (VPs, *viral proteins*), encontradas nas partículas virais, e outras cinco proteínas não-estruturais (NSPs, *non-structural proteins*) presentes somente em células infectadas e não observadas em partículas maduras (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996; SILVA et al., 2001; MASCARENHAS et al., 2002; SECRETARIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2004).

As principais proteínas estruturais (VP4, VP6 e VP7) atuam como antígenos na indução de anticorpos, provocando resposta imune protetora, e formam a base da classificação atual dos *Rotavirus* em grupos (A-G) (COSTA et al., 2004; SECRETARIA DE ESTADO DE SÃO PAULO, 2004).

O core protéico é a camada mais interna que envolve o genoma composto por 11 segmentos de RNA dupla-fita, sendo formado a partir das proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3. De maneira geral, pode-se dizer que as proteínas constituintes do core são responsáveis por atividades de transcriptase e replicase (ESTES, 2001).

Todo o conjunto de proteínas estruturais e não-estruturais é codificado por segmentos genômicos presentes no “core” protéico, os quais apresentam pesos moleculares que variam de $0,2 \times 10^6$ a $2,2 \times 10^6$ daltons e tamanhos entre 663 e 3.302 pares de bases (ESTES; COHEN 1989; KAPIKIAN; CHANOCK, 1996; VAN REGENMORTEL, 2000).

**c) Transmissão**

A transmissão ocorre predominante por via fecal-oral, por água ou alimentos. As fezes de crianças infectadas apresentam altas concentrações de *Rotavirus*, que são excretados desde dois dias antes até 21 dias após o início dos sinais e sintomas (SECRETARIA DE ESTADO DE SÃO PAULO, 2004; BORGES et al., 2009).

A transmissão de pessoa para pessoa ocorre com facilidade, e os cuidados com a higiene e saneamento básico não são suficientes para evitá-la, pois o *Rotavirus* resiste muito tempo no meio ambiente (OLIVEIRA; LINHARES, 1999; SECRETARIA DE ESTADO DE SÃO PAULO, 2004).

O principal sítio de replicação viral é o intestino delgado, no jejuno mais especificamente nas células epiteliais maduras que revestem as microvilosidades

intestinais deste local; desencadeando um fenômeno de má-absorção e diarréia (ESTES, 2001; BRASIL, 2006). O período de incubação das infecções pelo *Rotavirus* é curto, geralmente de um a três dias, o que impossibilita a proteção com a vacina após a exposição (OLIVEIRA; LINHARES, 1999; BORGES et al., 2009).

A diarréia em cem por cento dos casos é a principal manifestação clínica. As fezes são aquosas, verdes ou amareladas, raramente contêm muco e variam de oito ou mais evacuações diárias (SABRÁ, 1982).

A apresentação clínica é variável, mas os vômitos e a desidratação são características proeminentes em comparação com a gastroenterite produzida por outros vírus (LINHARES et al.,1989; CARDOSO, 1992; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001; BORGES et al., 2009).

Apesar de a doença diarréica ocorrer primariamente em crianças, também é comum em jovens e adultos, associada a surtos esporádicos de diarréia em espaços fechados como escolas, ambientes de trabalho e hospitais (LINHARES et al., 1981).

### 2.3.2 *AdenovIrus*

#### a) Biologia

Os *Adenovirus* foram descritos pela primeira vez por Rowe et al. (1953), a partir de adenóides humanas mantidas em culturas in vitro e de secreções humanas do trato respiratório superior inoculadas em cultura de células de origem humana (OLIVEIRA, 1994). Esses vírus estão classificados pelo ICTV (ICTV 2009) como pertencentes à família *Adenoviridae*, que tem quatro gêneros: os *Mastadenovirus* (bovinos, eqüinos, canídeos, murinos, suínos, símios, humanos e outros), os *Aviadenovirus* (aves), os *Atadenovirus* (ovinos, bovinos, caprinos, cervídeo, camaleão, cobra, etc) e os *Siadenovirus* (sapos e aves).

Os *Adenovirus* entéricos são do gênero *Mastadenovirus* e inclui mais de 49 sorotipos humanos classificados em seis espécies, de A a F.

A maioria dos estudos da estrutura viral foi realizada com Hepatite A e *Adenovirus* (HAdV) tipos 2 e 5 (SHENK, 1996), demonstrando que são vírus não envelopados e medem de 70 nm a 100 nm de diâmetro (Figura 7).

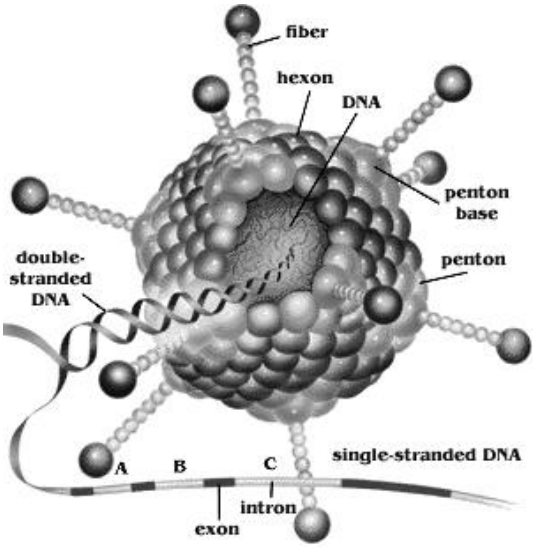


Figura 7- Fotomicrografia de partículas de *Adenovirus* humano
Fonte- ICTV, 2009

**b) Morfologia**

O capsídeo icosaédrico é constituído por 252 capsômeros, dos quais 240 hexons formam as faces do icosaedro e 12 pentons formam os vértices. O capsídeo é formado por 252 capsômeros, dos quais 240 são estruturas denominadas hexon que formam as 20 faces triangulares, e 12 são estruturas denominadas penton, que formam os vértices do icosaedro (OLIVEIRA, 1994).

O hexon é uma proteína trimérica, formada por moléculas de polipeptídeo II fortemente associadas (HORWITZ; MAIZEL; SCHARFF, 1970).

O penton consiste em duas estruturas distintas: a base, responsável por ancorar o penton ao capsídeo, e a fibra, que é uma estrutura alongada que se estende a partir do vértice da partícula viral. A fibra tem tamanho variável de 10 a 33 nm de comprimento, possuindo 2 nm de diâmetro e termina em uma esférula de 4 nm (OLIVEIRA, 1994). O core viral contém quatro proteínas (polipeptídeos V, VII, $\mu$ e proteína terminal) (SHENK, 1996).

O genoma dos *Adenovirus* é constituído de DNA dupla-fita linear, que codifica uma DNA-polimerase-DNA-dependente. Os *Adenovirus* humanos apresentam seis subgêneros, denominados de A até F, com 51 sorotipos distribuídos entre eles (MARTINS, 2006).

**c) Transmissão**

Embora as características epidemiológicas dos *Adenovirus* variam por tipo, todos são transmitidos por contato direto, a transmissão fecal-oral, e, ocasionalmente, a transmissão pela água.

Alguns tipos são capazes de estabelecer infecções persistentes assintomáticas nas amígdalas, adenóides, e os intestinos dos hospedeiros infectados, e derramando pode ocorrer por meses ou anos (WIKIPÉDIA, 2011)

Os *Adenovirus* causam infecções persistentes caracterizadas pela excreção fecal, prolongada e intermitente. Eles normalmente infectam e replicam em vários locais do trato respiratório, na cavidade ocular e no trato gastrointestinal, mas podem afetar outros órgãos como o pâncreas, miocárdio e o sistema nervoso central, o que pode ocorrer estar na meningoencefalite.

Em geral, a gastroenterite associada a *Adenovirus* é tão prevalente quanto a causada por *Rotavirus* e ocorre mais freqüentemente em crianças com menos de 4 anos, caracterizando-se como uma doença branda com diarréia e vômito. Em regiões de clima temperado, a prevalência de *Adenovirus* entéricos é maior. No entanto, em países de clima tropical, como o Brasil, *Adenovirus* veiculados pela água têm sido detectados durante todos os meses do ano (HORWITZ, 1996; MEHNERT et al., 1999).

### 2.3.3 Surtos de viroses associadas à água e alimentos

Com relação à contaminação por vírus, pesquisas foram iniciadas após a ocorrência de um surto de hepatite em Nova Délhi (Índia), na década de 1950, como conseqüência da contaminação do sistema de tratamento da água por patógenos virais provenientes do esgoto. Depois desse episódio, tiveram início os estudos na área da virologia aquática, atualmente denominada virologia ambiental, com cientistas tentando detectar *Poliovirus* em amostras de água (BOSCH, 1998).

Desde 1990, com a implementação dos métodos moleculares no estudo de vírus em amostras ambientais, vem aumentando a atenção dada à contaminação da água, do solo e dos alimentos pelos vírus. Como um fator de disseminação de doenças virais, esse problema tem implicações de longo alcance que vêm sendo extensivamente estudadas

pelos virologistas e profissionais de saúde pública (MARQUES, 1991; QUEIROZ et al., 2001; MEHNERT et al., 2001).

No Brasil, entre 1987 e 1988, Mehnert; Stewien (1993) realizaram a primeira investigação de *Rotavirus* em águas de esgotos e córregos poluídos na cidade de São Paulo, utilizando como metodologias a imunofluorêscia indireta. Entre 1988 e 1989, 1998 e 1999, Mehnert et al. (1999) identificaram *Adenovirus* em amostras de águas provenientes dos mesmos locais analisados por Mehnert; Stewien (1993), na cidade de São Paulo, através do método imunoenzimático para detecção de *Rotavirus* e *Adenovirus*.

Em algumas cidades do estado São Paulo, entre 1998 e 2003, foram realizados outros estudos na área de virologia ambiental utilizando-se métodos moleculares, nos quais foram identificadas as presenças de HAV (*Hepatite A*) (SASSAROLI et al., 2000), *Rotavirus* (QUEIROZ et al., 2001; PAULI et al., 2003) e *Adenovirus* (MARTINS et al., 2003) em águas de esgotos, córregos e poços analisados.

Segundo a Figura 8, os *Rotavirus* causam aproximadamente 111 milhões de episódios de gastroenterite por ano em média, requerendo 25 milhões de consultas e 2 milhões de hospitalizações, e gerando de 352.000 – 592.000 mortes (média 440.000 mortes) entre crianças menores de 5 anos em todo o planeta. O autor também relata que mais de 80% de todas as mortes relacionadas com o *Rotavirus* ocorrem em países de baixa renda do sul da Ásia e África Subsaariana (PARASHAR et al., 2006).

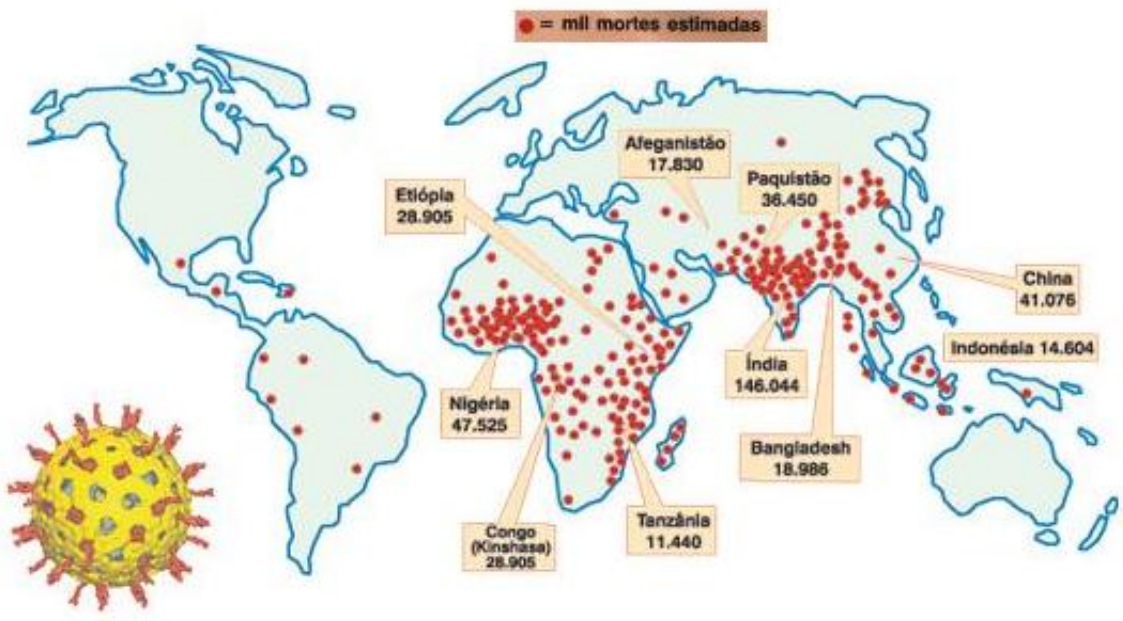


Figura 8- Distribuição global do número estimado de mortes relacionados com o *Rotavirus*. Cada ponto representa 1.000 mortes.
Fonte- PARASHAR et al., 2006.

Levantamentos epidemiológicos conduzidos em diferentes países revelam o envolvimento de vírus entéricos em surtos associados a águas contaminadas. No Canadá, em 1995, ocorreu um surto de *Hepatite A* devido à ingestão de águas contaminadas de poços (DE SERRES et al., 1999). Em 1998, um surto de gastrenterite, na Suíça, confirmou a presença de *Enterovirus* e de *Norovirus* em amostra de água de beber contaminada por esgoto (HÄFLIGER et al., 1999). Em 1999, nos Alpes Franceses, sudeste da França, ocorreu um surto de doença digestiva aguda envolvendo 19 pessoas que haviam ingerido água de torneira contaminada por *Enterovirus* e *Rotavirus* (GOFTI-LAROCHE et al., 2001).

## 2.4. Parâmetros Microbiológicos

Desde o início da bacteriologia sanitária, marcada pela observação de Escherich em 1885, de que o Bacillus coli (*Escherichia coli*) poderia ser usado como indicador na avaliação da contaminação fecal da água; as bactérias do grupo coliforme têm sido extensivamente utilizadas na avaliação da qualidade das águas, sendo até hoje o

parâmetro microbiológico básico incluído nas legislações relativas a águas para consumo humano (CETESB, 1992).

Para a avaliação das condições sanitárias de uma água, utilizam-se bactérias do grupo coliforme, que atuam como indicadores de poluição fecal, pois estão sempre presentes no trato intestinal humano e de outros animais homeotérmicos, sendo eliminadas em grande número nas fezes. A presença de coliformes na água indica poluição, com o risco potencial da presença de organismos patogênicos, uma vez que são mais resistentes na água do que as bactérias patogênicas de origem intestinal.

Coliformes totais constituem um grupo de bactérias formado por bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície (surfactantes), com propriedades similares de inibição de crescimento, e que fermentam a lactose com produção de aldeído, ácido e gás a 35ºC em 24-48 horas. O grupo inclui os seguintes gêneros: *Escherichia, Citrobacter, Enterobacter e Klebisiela* (BRASIL, 2007).

Coliformes fecais ou termotolerantes são coliformes capazes de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de 44,5 ± 0,2°C em 24 horas. O principal componente deste grupo é *Escherichia coli,* sendo que alguns coliformes do gênero *Klebisiela* também apresentam essa capacidade (BRASIL, 2007).

## 2.5. Processos de Tratamento de Esgoto

O tratamento de esgoto em geral, é descrito em função de diferentes graus de remoção de matéria orgânica e/ou inorgânica que, em ordem crescente, são classificados em: preliminar, primário, secundário e terciário ou avançado (MUJERIEGO; ASANO, 1999).

No tratamento de esgoto, processos físicos, químicos e biológicos são envolvidos. Na etapa física, realizado por meio de gradeamento, sedimentação, flutuação, flotação e filtração, apenas as substâncias que não estão dissolvidas no esgoto é que são removidas. As substâncias dissolvidas e as suspensões coloidais precisam ser eliminadas por meio de processos que transformem as moléculas em partículas, flocos, que sejam

depuradas fisicamente ou transformando-as em gases para serem liberados para atmosfera.

Uma forma de promover a floculação de substâncias dissolvidas e coloidais presentes no esgoto é através de processo biológico, realizado por bactérias anaeróbicas e aeróbicas. Exemplos destes tratamentos são: lagoas facultativas, leitos cultivados, reatores anaeróbicos de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) e o processo lodo ativado aeróbico, que podem ser utilizados de forma seqüencial, combinados ou com modificações (AIYUK et al., 2006).

O processo denominado de lodos ativados é o processo utilizado pela AMBIENT para o tratamento do esgoto sanitário do município de Ribeirão Preto - SP, sendo este o objeto do presente estudo.

### 2.5.1 Processo de lodos ativados

Processo de tratamento de esgoto denominado lodos ativados, consiste em um processo biológico onde o esgoto afluente, na presença de oxigênio dissolvido, agitação mecânica e pelo crescimento e atuação de microorganismos específicos, forma flocos denominados lodo ativado ou lodo biológico. Essa fase do tratamento objetiva a remoção de matéria orgânica biodegradável presente nos esgotos. Após essa etapa, a fase sólida é separada da fase líquida em outra unidade operacional denominada decantador e o lodo ativado separado retorna para o processo sendo o excesso retirado para tratamento específico ou destino final (CASAN, 2005).

Esse sistema é muito utilizado, mundialmente, para o tratamento de despejos domésticos e industriais (SPERLING, 1997), sendo indicado para locais onde se dispõe de pouca área para a implantação de sistemas de tratamento.

A adoção deste processo apresenta boa eficiência no tratamento e flexibilidade de operação; por outro lado, o alto custo operacional, a exigência de um controle laboratorial diário, o alto consumo de energia e a possibilidade de surgirem problemas ambientais com ruídos e formação de aerossóis (que podem carrear microorganismos patogênicos ou não) são algumas das desvantagens deste sistema (CASAN, 2005). O sistema de tratamento lodo ativado tem duas fases distintas: a fase de pré-tratamento (composta do gradeamento e da desarenação) e a fase denominada de tratamento secundário, que é

composta das unidades denominadas de seletor biológico, tanques de aeração, decantador secundário, adensadores de lodo, sistema de desidratação, prensa desaguadora e pode ainda contar com a unidade de desnitrificação (SPERLING, 1997; CASAN, 2005).

No reator ocorrem as reações bioquímicas para a remoção da matéria orgânica carbonácea e a nitrificação do nitrogênio orgânico total remanescente do afluente bruto (CASAN, 2005). As bactérias (biomassa ativa) utilizam o substrato presente no esgoto bruto para se desenvolverem e o fornecimento de oxigênio é feito por aeradores mecânicos. As bactérias envolvidas neste processo formam uma matriz gelatinosa, o que lhes confere a propriedade de flocular, ou seja, aglutinam-se entre si e também com outros microorganismos. O floco formado possui dimensões maiores, facilitando o processo de remoção de patógenos (SPERLING, 1997).

No decantador secundário se processa a sedimentação dos sólidos (biomassa). Parte da biomassa sedimentada no fundo do decantador retorna ao reator (recirculação), com a finalidade de aumentar a concentração de bactérias garantindo, assim, a elevada eficiência deste tipo de processo de tratamento de esgoto. A outra parte (excesso de lodo) é retirada do sistema e encaminhada para o adensador, cuja função é reduzir a quantidade de água contida no lodo sedimentado nos decantadores.

Posteriormente, o lodo passa por um sistema de desidratação e ao final chega à prensa desaguadora que opera com duas unidades e a “torta” produzida com teor de sólidos na faixa de 18 à 20%, é encaminhada até o local de estocagem através de correia transportadora para posterior disposição em aterro sanitário (CASAN, 2005).

No processo denominado lodo ativado, a redução de vírus entéricos ocorre principalmente por adsorção viral aos sólidos ou por inativação viral. A distribuição de partículas virais entre as fases líquida e sólida da mistura, depende da distância destas em relação aos sólidos suspensos e da capacidade adsortiva (ARRAJ et al., 2005).

A ETE-Ribeirão Preto/SP apresenta uma tecnologia de lodos ativados convencionais, aerados por tubos-compressores e difusores de membrana e sistema de digestão anaeróbica de lodos de alta carga (AMBIENT, 2009).

# *OBJETIVOS*

## 3. OBJETIVO GERAL

- Analisar a prevalência de bioagentes patogênicos de relevância sanitária em Águas residuárias antes e depois do tratamento biológico por lodos ativados.

Constituem-se em objetivos específicos do estudo:

- Analisar a ocorrência de cistos de *Giardia* spp., no esgoto (bruto e tratado) do sistema de tratamento de esgoto da Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto – ETE/RP;

- Analisar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp., no esgoto (bruto e tratado) do sistema de tratamento de esgoto da Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto – ETE/RP;

- Analisar a ocorrência de ovos de helmintos, cistos de protozoários e larvas, no esgoto (bruto e tratado) do sistema de tratamento de esgoto da Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto – ETE/RP;

- Analisar a presença/ausência de coliformes totais e termotolerantes, assim como, quantificar esses elementos no esgoto (bruto e tratado) do sistema de tratamento de esgoto da Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto – ETE/RP;

- Analisar a ocorrência de vírus (*Adenovirus* e *Rotavirus*) no esgoto (bruto e tratado) do sistema de tratamento de esgoto da Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto – ETE/RP;

- Foi também objetivo desse trabalho à implementação no Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental – LEPA da técnica de detecção e quantificação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo Método 1623 desenvolvido pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA, 2001)

- Implementar no Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental – LEPA, o Teste de Elisa para a detecção de Adenovírus e Rotavirus em amostra de esgoto bruto e tratado.

# *MATERIAL E MÉTODOS*

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1. Cenário do Estudo:

Este estudo foi realizado no município de Ribeirão Preto, situado na região nordeste do Estado de São Paulo, com 605.114 habitantes e uma área de 651 $Km^2$ (IBGE, 2011).

A região de Ribeirão Preto é uma das mais ricas do Estado de São Paulo, apresentando elevado padrão de vida (renda, consumo, longevidade). Além disso, possui bons indicadores sociais (saúde, educação e saneamento), uma localização privilegiada, próxima a importantes centros comerciais, e acesso facilitado, devido à boa qualidade da infra-estrutura de transportes e comunicação (RIBEIRÃO PRETO, 2009).

Figura 9- Localização do Município de Ribeirão Preto
Fonte - WIKIPÉDIA, 2006

## 4.2. Local da Pesquisa

O município de Ribeirão Preto possui duas Estações Tratamento de Esgoto, a Estação de Tratamento de Esgotos Caiçara – ETE Caiçara (Figura 10), a qual entrou em funcionamento em 2000 e trata o esgoto proveniente dos bairros situados na bacia do córrego Palmeiras (bairros da zona leste de Ribeirão Preto), atendendo, portanto, cerca de 14% da população urbana do município (SERVIÇOS AMBIENTAIS DE RIBEIRÃO PRETO. AMBIENT, 2009; RIBEIRÃO PRETO, 2009).

Figura 10- Estação de Tratamento de Esgoto Caiçara
Ribeirão Preto/SP

E em novembro de 2002, a Estação de Tratamento de Esgoto-Ribeirão Preto (Figura 11), entrou em funcionamento, com capacidade de tratar os 84% restantes do esgoto coletado da cidade.

Figura 11- Estação de Tratamento de esgoto Ribeirão Preto/SP

O presente estudo foi desenvolvido na Estação de Tratamento de Ribeirão Preto (ETE-RP), devido ao volume de esgoto que é tratado, pois seria necessário um estudo mais aprofundado para a comparação das duas estações, devendo incluir os mesmos números de amostras e análises.

A localização do município e da ETE-Ribeirão Preto/SP, pode ser observada no mapa do enquadramento geográfico regional, na Figura 12.

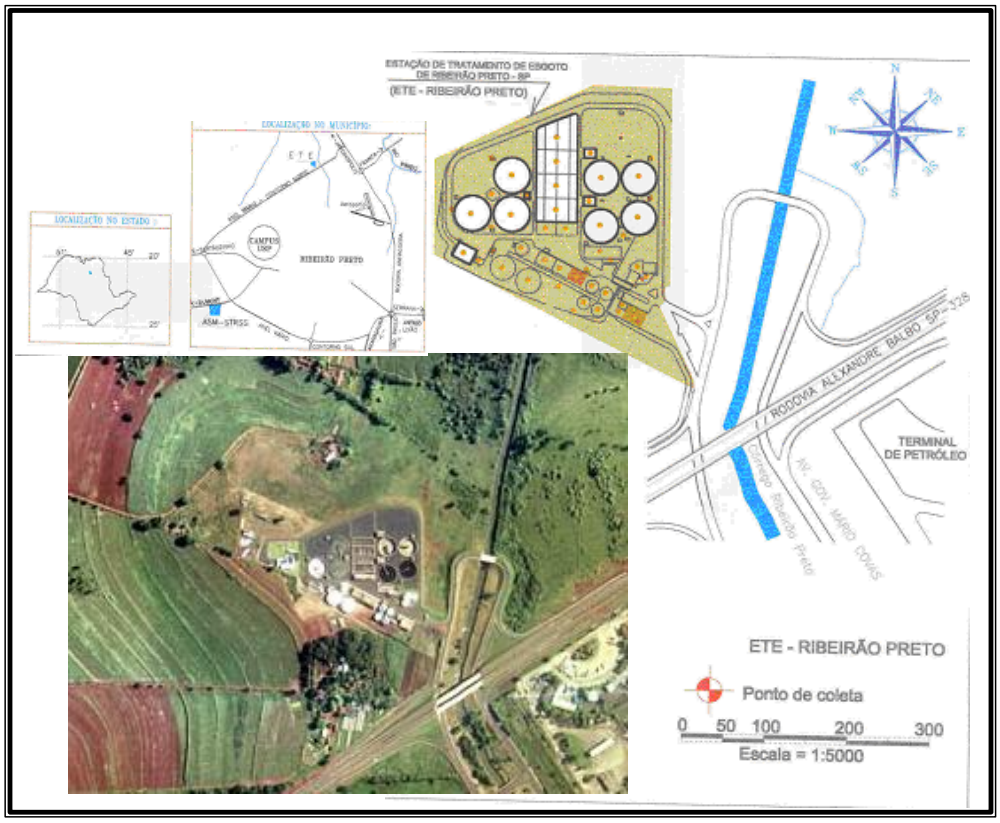


Figura 12- Localização e fotografia aérea da Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto.
Fonte- SECRETARIA DE PLANEJAMENTO E GESTÃO PÚBLICA

### 4.3. Coleta de amostras

As coletas de esgoto foram realizadas no ponto de entrada e no ponto de saída da Estação de Tratamento de Esgoto (Figura 13).

Figura 13- Coleta de esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP.
Foto- JULIÃO, 2010

Para a análise de *Giardia* spp. e de *Cryptosporidium* spp. foi coletado 500 mL de esgoto bruto e 20L de esgoto tratado, utilizando frascos previamente limpos, descontaminados e lavados com solução de eluição contendo Tween 80 a 0,01 %.

Para a análise de ovos, cistos e larvas de helmintos e protozoários no esgoto, a coleta de amostras foi efetuada conforme o antigo Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB, 1987), o qual recomendava o volume mínimo de 1000 mL.

As amostras de coliformes totais e *E. coli* (termotolerantes), foram coletadas em frascos de vidro esterilizados, com aproximadamente 100 mL.

Para análise de vírus, as amostras foram coletadas em frascos limpos, descontaminados, esterilizados, com aproximadamente 2L, preferencialmente, no período da manhã, entre 8 h e 9 h e durante os dias da semana, a fim de minimizar os efeitos de variações diurnas refletidas por condições ambientais como temperatura, percentual de irradiação por luz UV e precipitação (GRIFFIN et al., 2003; QUEIROZ et al., 2001).

Todo material identificado foi transportado para o Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental – LEPA em caixa isotérmica contendo gelo a uma temperatura de 4°C, observando-se que o tempo de coleta e análise não excedesse 24 horas. Se isso não fosse possível, era mantido entre 2º e 10ºC até 48 horas e após esse período as amostras de vírus eram mantidas a -70°C ou menos (CLESCERI et al., 1998).

A análise de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB – SP) (Anexo A), as demais amostras foram realizadas no

Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental (LEPA) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP.

### 4.4.Métodos de Análise do esgoto

#### 4.4.1 Turbidez

As análises de Turbidez foram realizadas em turbidímetro de bancada Tecnopon, modelo TB 1000.

#### 4.4.2 Preparação da amostra para análise de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em esgoto bruto (McCuin & Clancy - 2005)

Para análise de oocistos de *Cryptosporidium* spp foi utilizado 450 mL de esgoto bruto. e para análise de cistos de *Giardia* spp. 50 mL de esgoto bruto e em ambos foi adicionado solução Tween 80 a 20 % (concentração final de 1 %). A suspensão foi então transferida para tubos de centrífuga cônicos (250 mL).

#### 4.4.3 Preparação da amostra para análise de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em esgoto tratado (Método 1623 -EPA)

Para a realização da análise de *Giardia* spp*. e Cryptosporidium* spp. em esgoto tratado, foram necessários 20 L de amostra, onde a mesma passou por um sistema de filtração (Filta Max) para a concentração do material.

**a) Filtração:**

A técnica baseia-se na filtração da amostra com um fluxo de 1 a 4 L/min (Figura 14).

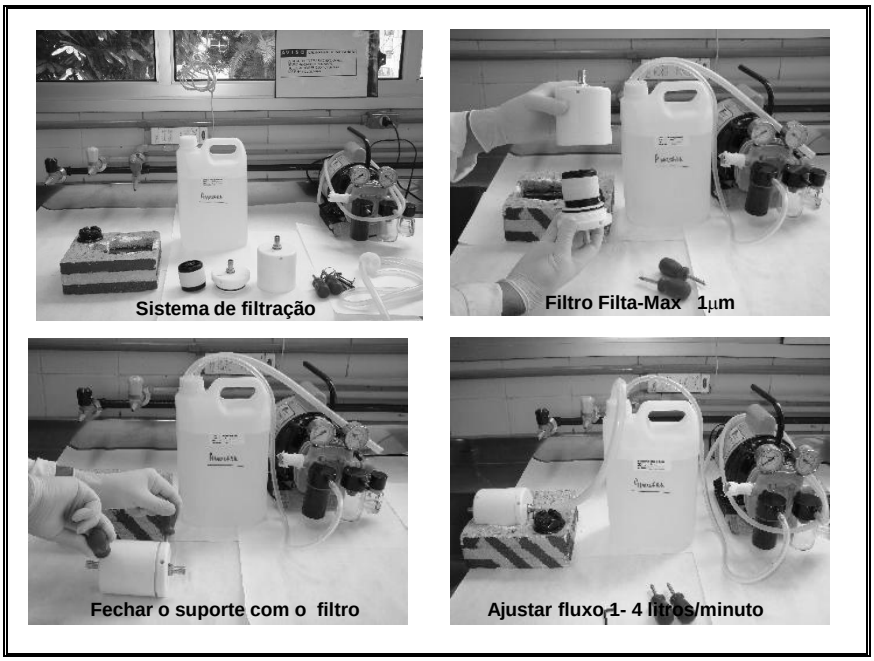


Figura 14 – Etapas da Filtração para concentração da amostra
Foto- CETESB, 2009

**b) Eluição:**

Em seguida, a esponja foi colocada em um saco plástico estéril e foi adicionado 400 mL de PBST (Figura 15).

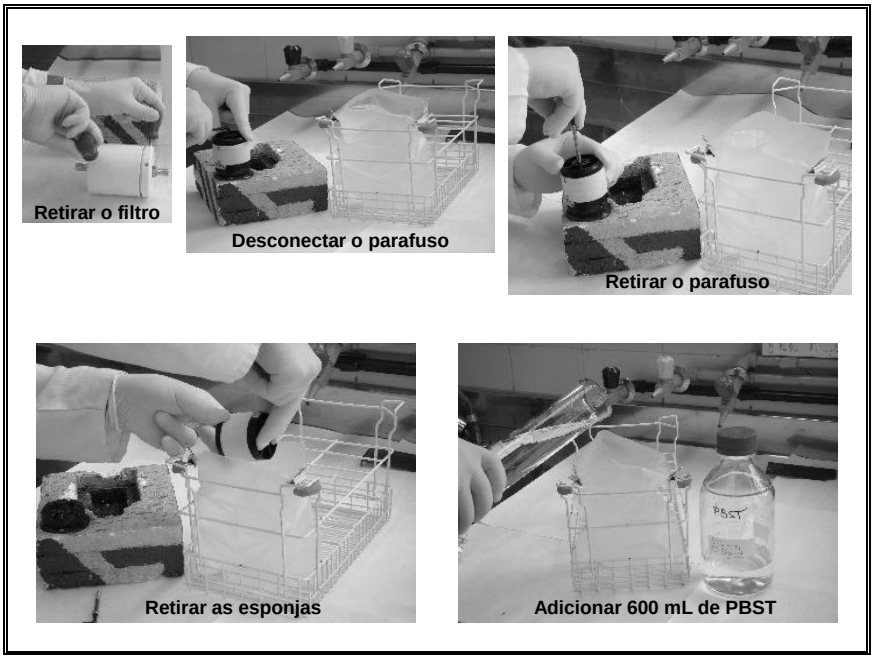


Figura 15 – Preparação da esponja para homogeneização
Foto- CETESB, 2009

A suspensão foi homogeneizada durante 5 minutos e após a homogeneização, o material foi decantado em um béquer de 2000 mL. Em seguida, foram adicionados 400 mL de PBST, homogeneizado novamente durante 5 minutos e decantado no béquer (Figura 16).

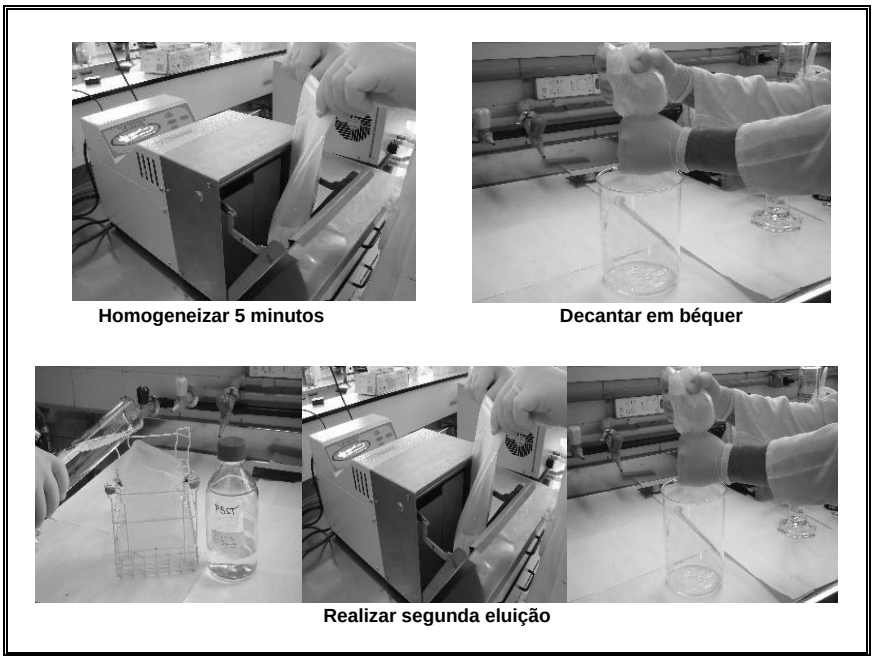


Figura 16 – Etapa de homogeneização e decantação da amostra no béquer
Foto- CETESB, 2009

Todo material obtido no béquer foi transferido para tubos de centrífuga cônicos (250 mL).

**c) Concentração das amostras de esgoto bruto e tratado:**

Em seguida, todos os tubos de esgoto bruto, quanto os tubos de esgoto tratado, foram centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado por um sistema a vácuo, permanecendo um volume final de aproximadamente 10 mL (Figura 17).

Todo o sedimento foi homogeneizado no vortex e em seguida foi transferido para um tubo de 50 mL. Em seguida, foi centrifugado a 2500 rpm durante 15 minutos. Após a centrifugação, foi registrado o volume do pellet e o sobrenadante foi aspirado por sistema a vácuo, permanecendo um volume final de aproximadamente 5 mL.

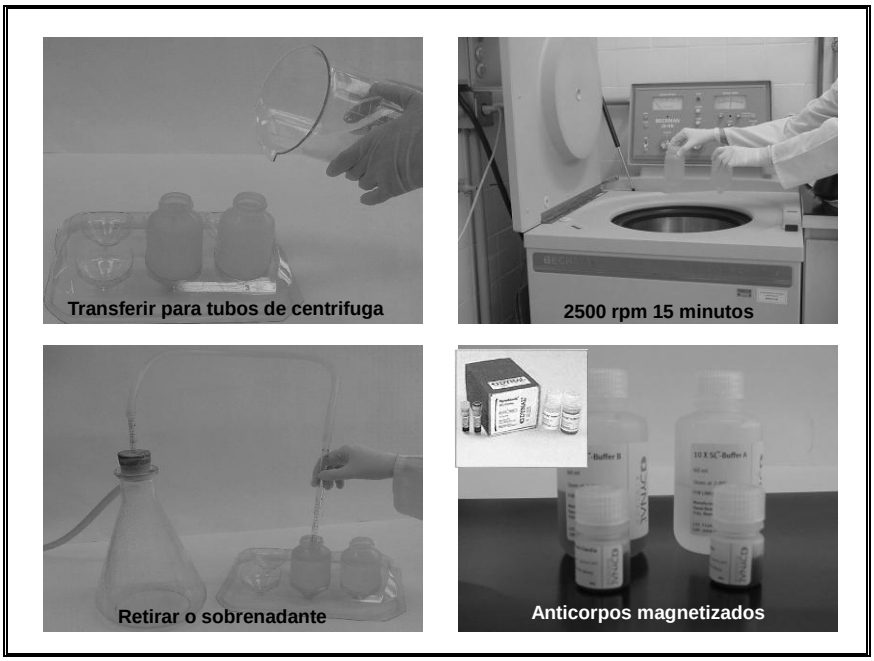


Figura 17 – Centrifugação e separação imunomagnética das amostras
Foto- CETESB, 2009

**d) Separação Imunomagnética das amostras de esgoto bruto e tratado:**

Para realizar a separação imunomagnética, a amostra concentrada foi transferida para o tubo de Leigton individual, contendo 1,0 mL de cada tampão, SL-A 10x e SL-B 10x (Dynabeads C-Combo). Em seguida, os tubos cônicos foram lavados com 2 mL de PBS contendo 0,01 % de Tween 20 (PBST) e foram transferidos para o tubo de Leighton contendo a respectiva amostra.

Para a amostra de esgoto bruto foi adicionado 0,75 g de Kaolin.

Em cada tubo de Leighton foi adicionado 100 µL de Crypto/Giardia Dynabeads e foram colocados no agitador rotatório (Sample Mixer) durante 1 hora, a 18 rpm e em temperatura ambiente (Figura 18).

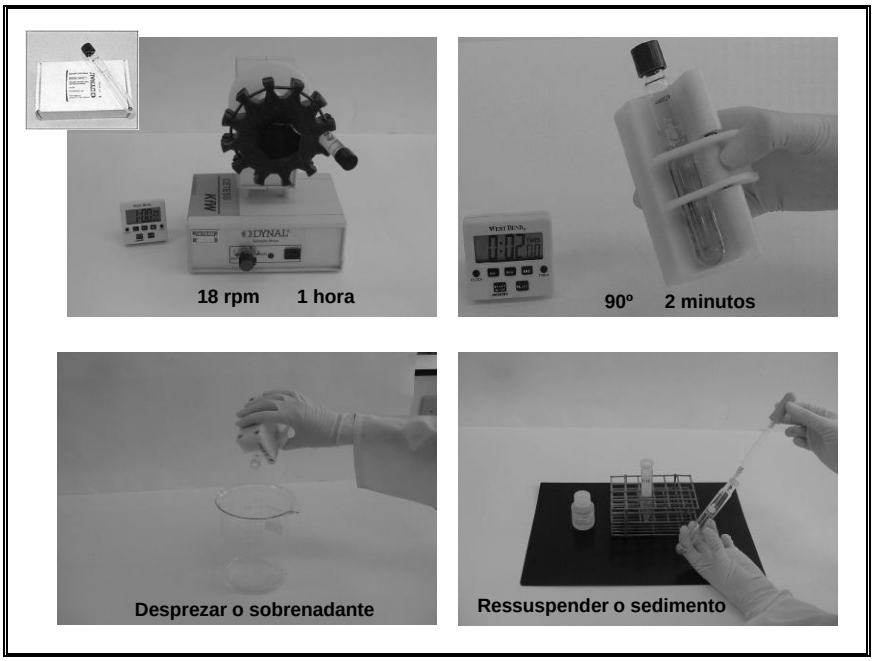


Figura 18 – Visualização do processo de agitação e homogeneização da amostra
Fonte- CETESB, 2009

Após esse período, os tubos foram transferidos para o concentrador magnético de partículas (MPC-1) e homogeneizados procedendo à agitação manual do tubo longitudinalmente num ângulo de 90º por 1 minuto e em seguida, ficou em repouso durante 3 minutos. Passados 3 minutos, a amostra foi homogeneizada suavemente em um ângulo de 90° durante 30 segundos.

Passados os 30 segundos, foi descartado cuidadosamente o sobrenadante, sem retirar o tubo do MPC-1. Em seguida, o tubo foi retirado do MPC-1 e adicionado 10 mL de PBS, do lado oposto dos beads. Gentilmente, a amostra foi homogeneizada (5 vezes) para ressuspender os beads.

Em seguida, o tubo foi recolocado no MPC-1 e homogeneizado suavemente em um ângulo de 90° durante 1 minuto e em seguida, ficou em repouso durante 3 minutos. Passados 3 minutos, a amostra foi homogeneizada suavemente em um ângulo de 90° durante 30 segundos. Em seguida, foi descartado cuidadosamente o sobrenadante, sem retirar o tubo do MPC-1.

Para o esgoto tratado os tubos foram homogeneizados gentilmente em um ângulo de 90° durante 2 minutos e descartado o sobrenadante.

Após a última lavagem, os beads foram ressuspendidos em 1 mL de buffer SL-A1X utilizando pipeta Pasteur e transferido para um tubo de microcentrifuga tipo Eppendorff. O mesmo foi colocado em outro concentrador magnético (MPC-M), efetuando-se nova agitação manual durante 2 minutos em um ângulo de 180°.

Em seguida, foi adicionado mais 300 µL de tampão SL-A 1X ao tubo de Leighton, transferido para o tubo eppendorff. Este, por sua vez, foi colocado MPC-M e homogeneizado em um ângulo de 180° durante 2 minutos (Figura 19).

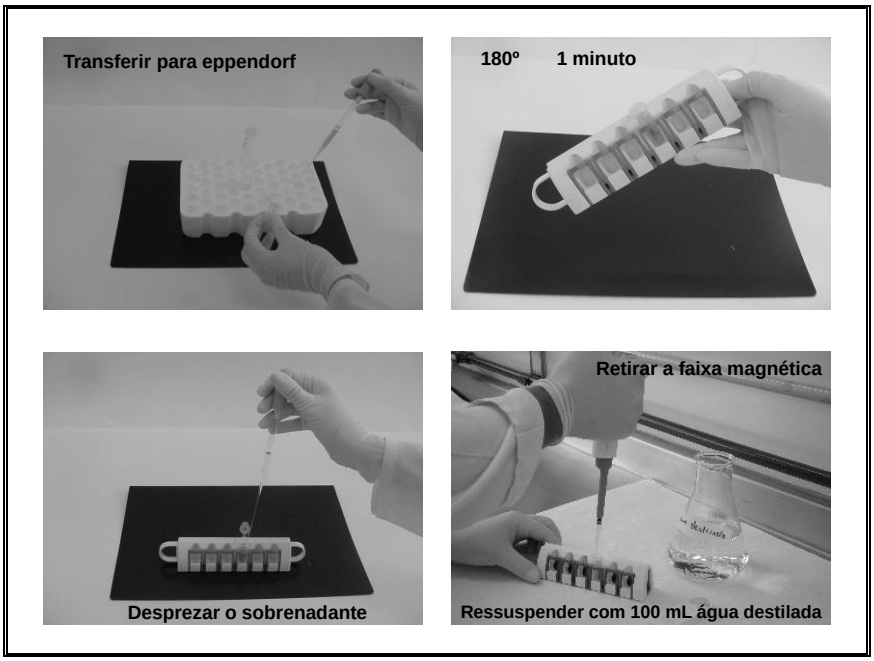


Figura 19 – Homogeneização da amostra a 180° e ressuspenção com água destilada
Foto- CETESB, 2009

Em seguida, o sobrenadante foi descartado, sem ser retirado do MPC-M, adicionado 100 µL de água destilada e agitado suavemente no vortex. O eppendorff foi transferido para o banho seco a $80^0$C por 10 minutos e após agitado suavemente no vortex e assegurar-se que toda amostra está no fundo do tubo (Figura 20).

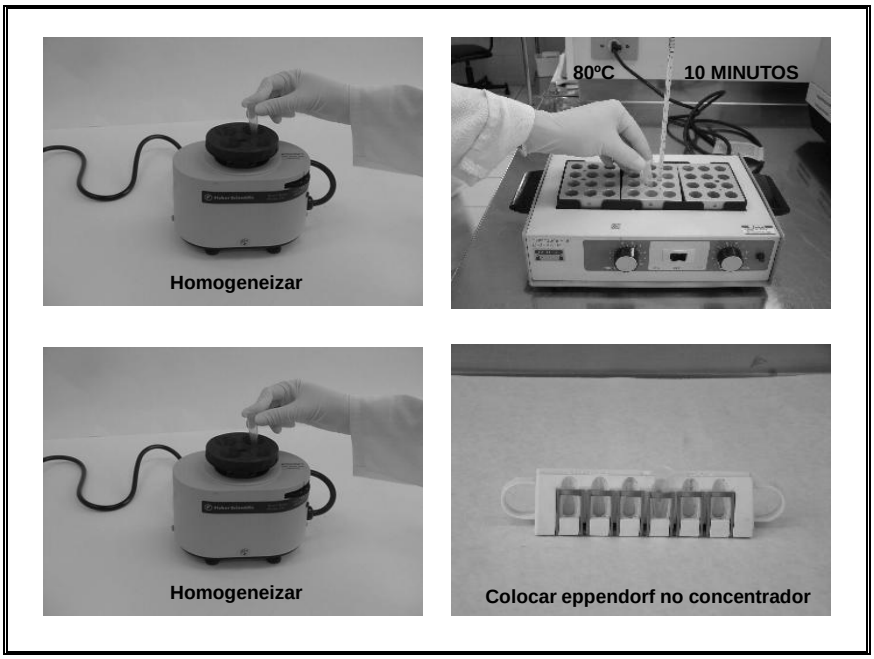


Figura 20 – Etapas de agitação e dissociação térmica da amostra
Foto- CETESB, 2009

Em seguida, o tubo foi colocado no MPC-M com a faixa magnética e o sobrenadante transferido para uma lâmina.

Uma nova dissociação térmica foi realizada, identificando a lâmina como 2ª dissociação.

As lâminas ficaram secando a 35 ou 42 ºC (aproximadamente 1h). Em seguida, o material foi fixado adicionando aproximadamente 10 µL de metanol (quantidade suficiente para cobrir o orifício) e ficou secando de 3 a 5 minutos).

Após a secagem, uma gota (aproximadamente 50 µL) de corante imunofluorescente (reagente Aqua-Glo G/C) foi adicionado em cada um dos poços e incubado durante 30 minutos no escuro em câmara úmida.

Em seguida, os poços foram lavados com 100 µL de PBS e o liquido aspirado cuidadosamente, sem tocar a área contendo o material.

Em seguida, foi adicionado 100 µL de DAPI e as laminas ficaram em repouso durante 1 minuto. Após o repouso foi aspirado o excesso de corante e adicionado 10 µL (um gota) do meio de montagem contendo glicerina (meio de montagem DABCO/glicerol), em cada poço. Para finalizar, cobriu-se a lâmina com lamínula, vedando com esmalte. As lâminas foram observadas em um microscópio Leica, Mod. DMLB, com as seguintes

objetivas: Objetivas N PLAN 20X/0.40 PH 1, OBJETIVA N PLAN 40X/0.65 PH 2 e OBJETIVA N PLAN 100X/1.25 OIL PH 3.

Também foram realizadas observações com microscopia de contraste de fase e filtro DAPI para confirmação de detalhes morfológicos (SMITH et al., 2002) (Figura 21).

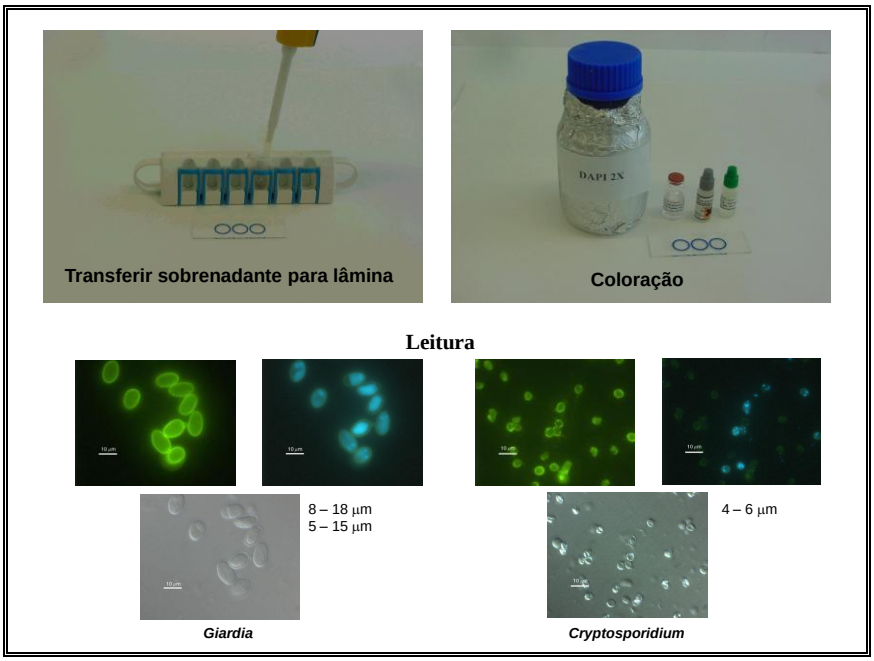


Figura 21 – Etapa de coloração e leitura da amostra
Foto- CETESB, 2009

**e) Critérios de positividade para identificação de cistos e oocistos**

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

✓ ***Imunofluorescência***

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

✓ ***Contraste de fase***

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

✓ ***Teste confirmatório utilizando DAPI***

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

Para as amostras inoculadas com Color Seed, consideraram-se as mesmas características morfológicas, porém com fluorescência vermelha.

**f) Teste de Eficiência da Separação Imunomagnética (IMS)**

Este procedimento foi aplicado como teste de eficiência para se verificar o manuseio dos equipamentos e processos na etapa de purificação com o uso da Separação Imunomagnética.

**O Easy seed TM BTF (Biotecnology Frontiers Austrália):** baseia-se em uma "suspensão teste" de cistos e oocistos contidos em um tubo de 5 mL, com número conhecido (100 oocistos e 100 cistos ± 1 DP) preservados em aproximadamente 1 mL de solução salina. Para a enumeração destes oocistos e cistos, onde o desvio padrão do número de oocistos e cistos de cada tubo é menor que 2,5 é utilizada a citometria defluxo.

Cada tubo é selado e esterilizado expondo cada lote a uma dose de radiação gama, garantido a estabilidade e inatividade dos organismos.

Os ensaios com água reagente estão sendo realizados da seguinte forma: em um frasco de Easy-Seed® adiciona-se 2 mL de solução Tween 20 0,05%, tampa-se e agita-se vigorosamente. Retira-se a tampa e o conteúdo do tubo é despejado na amostra. Esta por sua vez é mantida no agitador magnético. Adiciona-se 3 mL de água reagente no frasco, tornando a fechá-lo e agitá-lo vigorosamente. Após este procedimento, transfere-se o conteúdo total do frasco para a amostra a ser analisada, repetindo-se esse procedimento por mais uma vez.

**O Color Seed TM BTF (Biotecnology Frontiers Austrália):** é uma suspensão de oocistos e cistos marcados com corante vital vermelho fluorescente, ou seja, com sulforodamina, que constitui o corante "Texas Red" (WARNECKE et al, 2003), contidos em um frasco de 5 mL, com número aproximado de (100 oocistos e 100 cistos ± 1 DP) preservados em aproximadamente 1 mL de solução salina. Para enumerar precisamente estes cistos e oocistos, onde o desvio padrão do número de cistos e oocistos de cada tubo seja menor que 2,5, foi utilizada citometria de fluxo. Cada tubo é selado e esterilizado

expondo cada lote a uma dose de radiação gama, garantido a estabilidade e inatividade dos organismos.

Desta forma, por serem marcados com outro fluorocromo, são usados como “autocontrole interno” em amostras naturais, pelo fato da leitura microscópica ser realizada com filtros de diferentes comprimentos de onda, em relação ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Ao fazer a leitura final da lâmina que contém a amostra natural e que também foi contaminada artificialmente com o Color Seed®, observa-se inicialmente a presença de cistos ou oocistos que fluorescem em verde maçã brilhante (FITC). A seguir, muda-se o conjunto de filtros para o vermelho. Se o organismo fluoresce em vermelho, ele é contado como Color Seed®, porém, se não há fluorescência em vermelho é contado como intrínseco da amostra.

Este teste será usado nos ensaios com amostras de esgoto bruto e tratado da seguinte forma: em um frasco de Color seed® adiciona-se 2 mL de solução Tween 20 0,05%, tampa-se e agita-se vigorosamente. Retira-se a tampa e transfere-se o conteúdo do frasco para a amostra. Adiciona-se 3 mL de água reagente no frasco, tornando a fechá-lo e agitá-lo vigorosamente. Após este procedimento, transfere-se o conteúdo total do frasco para a amostra a ser analisada, repetindo-se esse procedimento por mais uma vez.

**g) Cálculo da Eficiência de Recuperação (%)**

A eficiência de recuperação dos Métodos após leitura das lâminas foi determinada de acordo com a fórmula (USEPA, 2001):

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

onde,

Y = eficiência de recuperação

N = n ° oocistos recuperados

M = n° oocistos semeados

**h) Quantificação dos cistos e oocistos**

A estimativa do número de oocistos e cistos por litro (X) foi feita com base na seguinte fórmula:

**Esgoto Bruto:**

$$\text{Cistos-oocistos/L} = \frac{\text{número cistos/oocistos} \times 1000}{\text{volume amostra (mL)}}$$

**Esgoto Tratado:**

$$\text{Cistos-oocistos/L} = \frac{\text{número cistos/oocistos}}{\text{volume amostra (L)}}$$

### 4.4.4 Análise de cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos

Para a verificação da presença de cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos patogênicos no esgoto foi realizado o método de sedimentação, proposto pela CETESB (1989).

**a) Procedimento**

As amostras foram homogeneizadas lentamente e filtradas com o auxílio de um funil e uma gaze cirúrgica, dobrada quatro vezes, para um cálice de sedimentação de 500 mL. As amostras foram deixadas em repouso para sedimentação durante um período de 2 a 24 horas. Após o período de sedimentação, foi coletada uma porção de 1 mL do material sedimentado com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o qual foi depositado sobre uma lâmina e corado com uma gota de solução lugol [Iodeto de potássio cristalizado (KI)(4,0 g); Iodo em pó (I2) (2,0 g); Água destilada q.s.p (100,0 mL)]. Em seguida, o material foi examinado ao microscópico direto para a contagem em câmara de Sedgwick – Rafter (Figura 22).

Após o preenchimento da câmara com a amostra, a lamínula foi recolocada na posição adequada e a câmara agitada com movimentos desordenados para uma distribuição homogênea do material.

Em seguida, a câmara ficou em repouso durante alguns minutos para sedimentação do material; a leitura foi efetuada percorrendo toda a área da câmara, em sentido horizontal ou vertical, utilizando-se inicialmente, ocular e objetivas de pequeno aumento e, em seguida, objetivas de aumentos maiores.

Devido à baixa densidade de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários, a leitura foi realizada em toda a área da câmara, segundo recomendado pela Norma L5.550 da CETESB (1989).

A densidade de cada espécie ou gênero identificado (nº de organismos por mL) é o próprio número de organismos de cada espécie ou gênero identificados/mL, visto que o volume da câmara é de 1 mL.

Figura 22 - Câmara de Sedgwick – Rafter
Fonte – CETESB, 1989

Para saber o número de ovos por litro foi utilizada a seguinte fórmula:

$$N = \frac{A\ X}{PV}$$

Onde: N= número de ovos por litro de amostra
A= número de ovos contados na câmara
X= volume do produto final (mL)
P= volume da câmara de Sedgwick-Rafter (1,0 mL)
V= volume da amostra original

**4.4.5 Análise microbiológica das amostras de esgoto bruto e tratado**

A coleta e análise laboratorial das amostras para avaliação de coliformes foram realizadas de acordo com os procedimentos do *"Standard Methods for the Examination of Water ands Wastewater"* (APHA, 2005) e da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB (1992). Onde foram empregadas as técnicas de tubos múltiplos e de substrato cromogênico.

**a) Procedimento:**

Com uma pipeta esterilizada foi transferido 10 mL da amostra para um frasco contendo 90 ± 2 mL de água destilada. Assim, foi preparada a primeira diluição decimal ($10^{-1}$), sendo que 1 mL da mesma corresponde a 0,1 mL da amostra; procedendo nesta seqüência de diluições até que fossem obtidas as diluições desejadas ($10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$.....) (Figura 23).

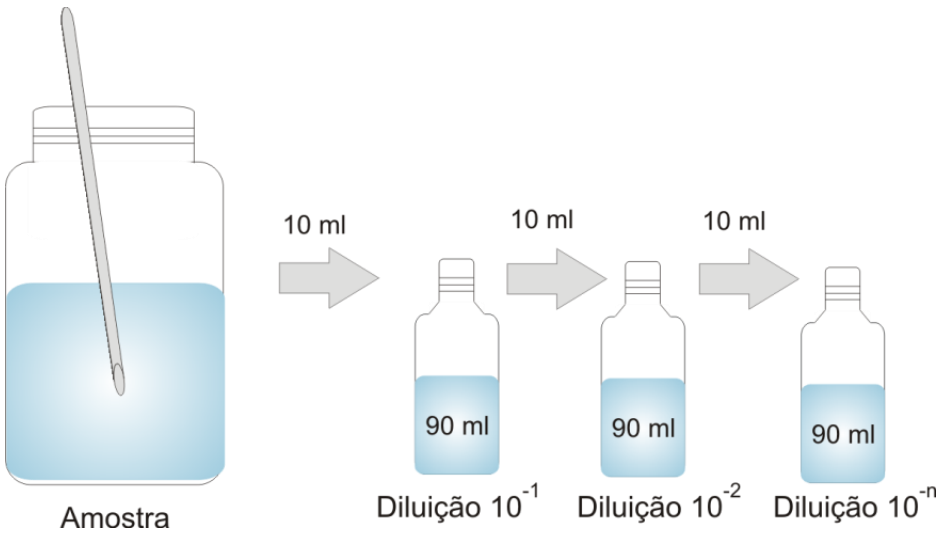


Figura 23- Preparo das diluições decimais
Fonte- CASTANIA, 2009

Com uma pipeta de 5 mL foi inoculado 1 mL da amostra em cada um dos tubos correspondentes a essa quantidade de inóculo. Após a inoculação de todos os volumes da amostra e/ou das diluições requeridas para o exame, a estante contendo os tubos inoculados foi armazenada em estufa de cultura 35 ± 0,5ºC, durante 24 ± 2 horas.

Após esse período foi realizada a leitura dos resultados, observando-se coloração amarela, indicativa do desenvolvimento de Coliformes Totais e para a observação de *Escherichia coli* foi utilizado uma lâmpada UV de 6W de potência e 365 nm de comprimento de onda para a confirmação da fluorescência (Figura 24).

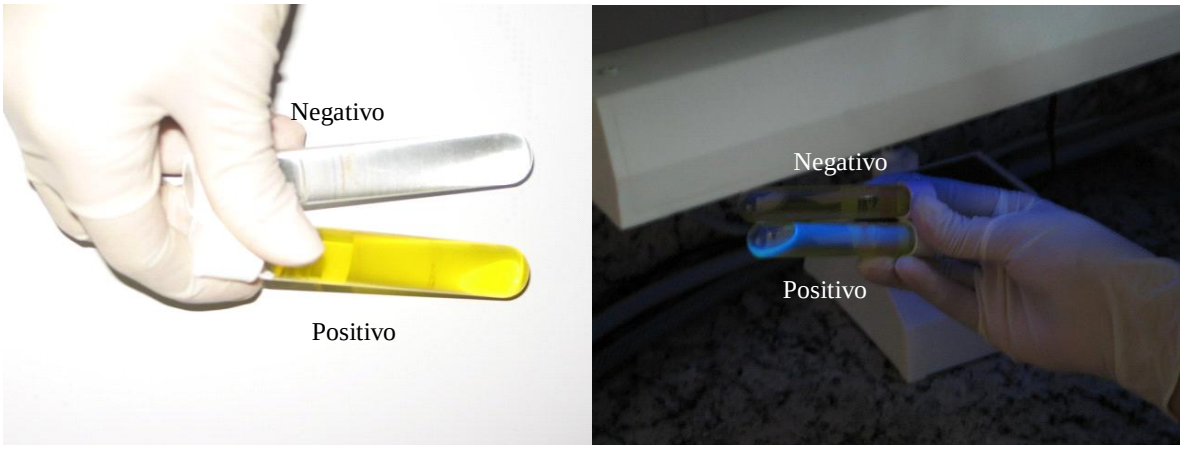


Figura 24- Leitura dos coliformes totais e fecais pelo Método Colilert® após 24 horas de incubação
Foto- TONANI, 2007

Este método é empregado para detectar as bactérias coliformes totais e *E. coli* (em águas brutas, tratadas e residuárias, ou seja, o método Colilert® (Método Substrato Cromogênio) é utilizado para determinar a presença de poluição fecal.

Seu princípio baseia-se na Tecnologia do Substrato Definido, no qual, o produto possui nutrientes indicadores que desenvolvem coloração e/ou fluorescência quando o meio de cultura é metabolizado pelas bactérias.

À medida que os coliformes se reproduzem no Colilert®, eles utilizam ß-galactosidase para metabolizar o indicador de nutriente ONPG (o-nitrofenil) e alterá-lo de incolor para coloração amarela.

A *Escherichia coli* utiliza ß-glucuronidase para metabolizar MUG (4- metil-umbeliferil) e criar fluorescência, sendo que a maioria dos não coliforme não apresenta estas enzimas, portanto, não podem se reproduzir e interferir.

### 4.4.6 Análise de vírus

**a) Concentração do esgoto bruto e tratado através da Célula de Agitação (Millipore®)**

Dois litros de esgoto tratado foram filtrados em uma membrana carregada negativamente (Millipore®), com 0,45 µm de tamanho dos poros e 90 mm de diâmetro, através de um sistema de bomba de vácuo.

Após a filtração, toda a amostra filtrada foi adicionada em uma célula de agitação, ficando um volume residual de 200 mL. Após a remoção do filtrado, o concentrado foi lavado duas vezes com 10 mL de água MilliQ pelo mesmo procedimento (KATAYMA, 2002), conforme visualizado na Figura 25.

Com relação ao esgoto bruto, 50 mL da amostra foi centrifugada a 3500 rpm durante 15 minutos. Após a centrifugação o sedimento foi encaminhado para análise.

Figura 25 – Célula de Agitação
Foto - Millipore

**b) Método de detecção do vírus**

O método que foi utilizado para a detecção do vírus é o Teste de Elisa (Enzyme-linked immuno sorbent assay); onde foi utilizado o KIT da RIDASCREEN® Enzimaimunoensaio da marca r-biopharm (RIDASCREEN® *Adenovirus*, RIDASCREEN® *Rotavirus*), que se baseia na detecção de antígeno; ou seja, dentre os diversos tipos de ELISA, destaca-se o ELISA SANDUÍCHE (Figura 26). Nesse método, o anticorpo de um antígeno particular é, inicialmente, adsorvido no poço. Depois, a amostra contendo o antígeno é adicionada e se liga ao anticorpo. Finalmente, um novo anticorpo ligado à enzima é adicionado. Nesse caso, a intensidade da reação é proporcional à quantidade de antígeno presente. Logo, permite mensurar até pequenas quantidades de antígeno.

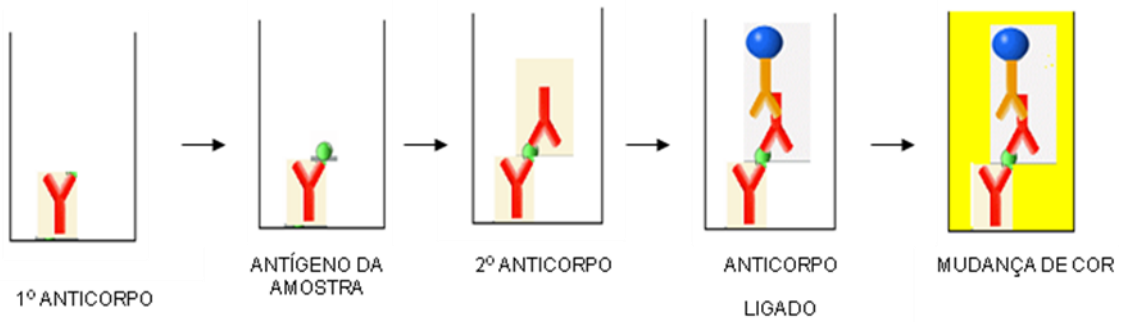


Figura 26 - Procedimento realizado no Elisa Sanduíche
Fonte – Adaptado de AFTER; GOLDSBY; KINDT, 2000

**c) Procedimento**

Os reagentes foram deixados fora da geladeira até atingirem a temperatura ambiente (18-25°C) antes do uso.

Foi colocado o número necessário de poços na moldura da microplaca e preparar a folha de protocolo, onde será reservado um poço livre para o branco (branco do substrato). Em seguida, foram adicionados 100 µL de amostras concentrada ou de controles prontos a utilizar nos poços apropriados das tiras do microteste, deixando um poço livre para o branco do substrato [ex.: poço A1 Branco (branco do substrato), poço B1 Tampão da amostra, poço C1 Controle Negativo, poço D1 Controlo Positivo, poço E1 amostra a ser analisada].

Em seguida, foi adicionada uma gota do Conjugado a cada cavidade e incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente (18 - 25°).

Após a incubação, os poços da placa foram lavados duas vezes com a solução de lavagem (solução salina com fosfatos).

Após, foi adicionado 2 gotas do Substrato a cada cavidade e incubado a temperatura ambiente (18 - 25°) durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 2 gotas da Solução de Bloqueio a cada cavidade e misturado gentilmente até que a coloração mudasse do azul para o amarelo.

Em seguida, a parte superior da placa foi secada e foi verificado se não havia a presença de bolhas.

A absorbância foi lida em comprimento de onda único (450 nm) utilizando um leitor de placas zerando contra o ar.

**d) Interpretação dos resultados da análise viral**

- ***Validação do teste***

O teste lido no equipamento foi considerado válido se:

a) A absorbância do Controle positivo foi maior que 0,6

b) A média das absorbâncias dos controles negativos (Diluente de Amostra) foi menor que 0,15.

O valor de cut-off foi definido como 3 x a média das absorbâncias do Controle Negativo (Diluente de Amostra) mais 0,1.

Amostras com valores entre 10% do cut-off foram retestadas. Se na repetição o resultado ainda foi duvidoso, uma nova amostra foi obtida e retestada.

Um resultado positivo foi indicado quando a absorbância da amostra foi maior que o valor do cut-off.

Um resultado negativo foi indicativo, quando a absorbância da amostra foi menor que o valor do cut-off.

# *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a disseminação de microrganismos patogênicos em águas residuais torna-se necessário o monitoramento e controle rigoroso dos efluentes finais e o estabelecimento de padrões de qualidade para essas águas após o tratamento, tendo em vista o potencial uso dos corpos receptores do esgoto tratado à jusante das estações de tratamento de esgoto para diversos fins.

Neste estudo foram analisados oocistos de *Cryptosporidium* spp., cistos de *Giardia* spp., assim como cistos, ovos e larvas de outros protozoários e helmintos; coliformes totais e termotolerantes, *Rotavirus* e *Adenovirus* em amostras de esgoto bruto e tratado da Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto – SP. A seguir, são apresentados os resultados complementados com a discussão.

## 5.1. Cistos de *Giardia* spp. e Oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo Método McCuin & Clancy (2005) e 1623 (EPA, 2005)

Dentre os protozoários patogênicos que foram avaliados no presente estudo, os cistos de *Giardia* spp. e os oocistos de *Cryptosporidium* spp. mereceram destaque, considerando a escassez de dados disponíveis sobre a inativação desses protozoários por meio de tratamento de esgoto (ROBERTSON et al., 2000; CARDOSO et al., 2003; HELLER et al., 2004; WEN et al., 2009; MEDEIROS, 2010).

Devido à importância da água na transmissão dos protozoários entéricos os cistos de *Giardia* spp. e os oocistos *Cryptosporidium* spp. e a constatação de surtos decorrentes da infecção pelos referidos protozoários diversas pesquisas foram realizadas sobre métodos para detecção simultânea de cistos e oocistos viáveis em águas destinadas ao consumo humano e águas superficiais. Esses métodos foram significativamente aperfeiçoados com novos formatos de filtros e a integração da etapa de purificação por IMS para separação dos organismos alvos das interferências não específicas.

Na última década, produto desse esforço, resultou o Método 1623 (EPA, 2005) que é recomendado para detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos

*Cryptosporidium* spp. e que permite a identificação estrutural dos cistos e oocistos mediante o uso do microscópio de imunofluorescência e contraste de fase.

Na Figura 27 apresentam-se as imagens captadas de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.,durante a análise laboratorial de amostras de esgoto bruto e tratado, com uso de microscópio de imunoflorescência e contraste de fase.

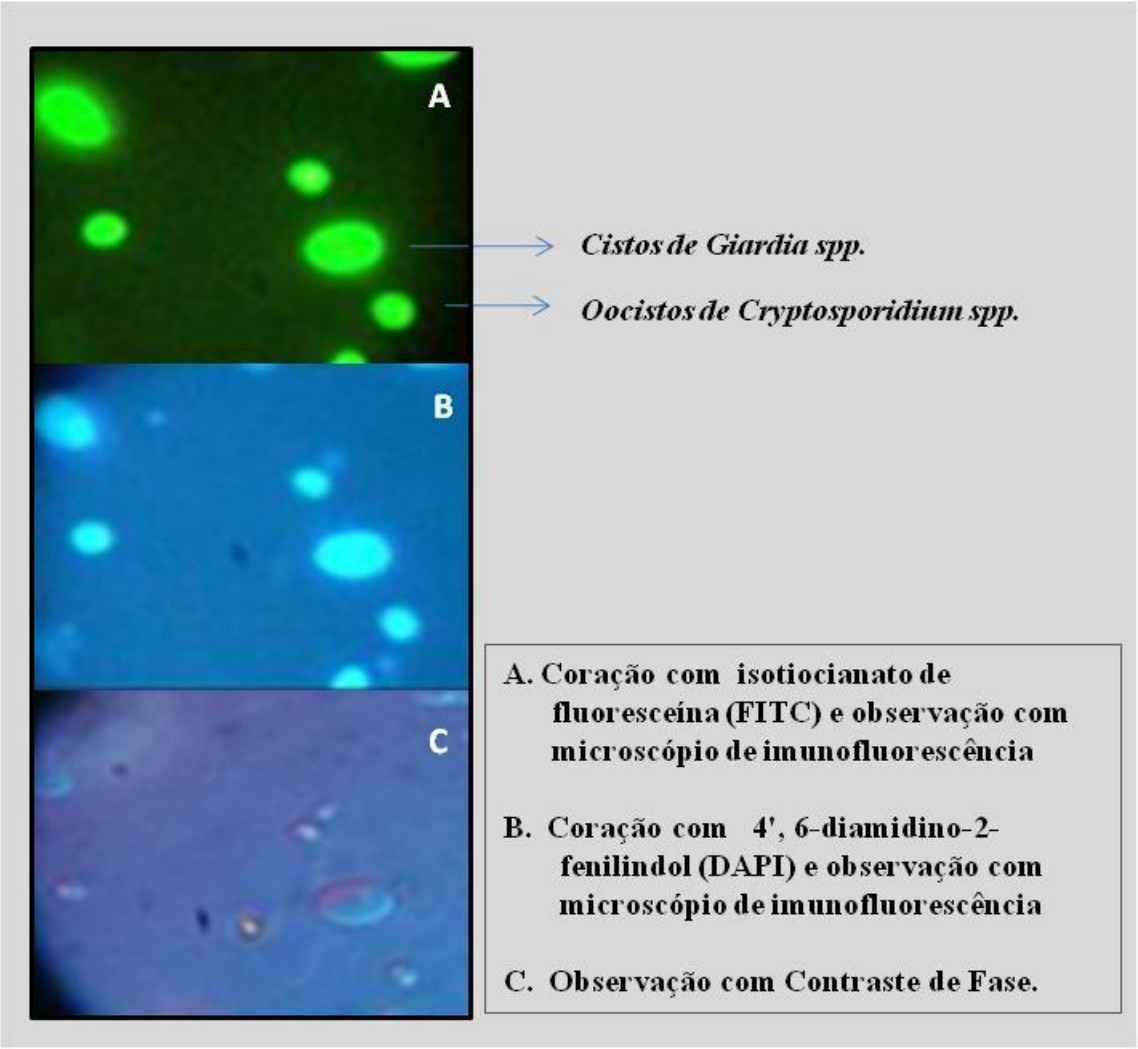


Figura 27 – Imagens de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. capturadas durante a análise de amostras de esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP.
Foto – PADULA, 2010

Como pode ser evidenciado na Figura 27, os cistos de *Giardia* spp. e os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são corados pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. apresentam-se como estruturas

esféricas ou ligeiramente ovóides com um diâmetro de 4 a 6 µm, enquanto que, os cistos de *Giardia* spp. apresentam-se com uma forma ovalada e com diâmetro de 8–12 µm. Ambos com uma fluorescência verde maçã brilhando mais intensamente na periferia, o que vem ao encontro do descrito por DWI (1998); EPA (1999) e Fricker (2000).

A determinação até nível de gênero foi confirmada pela utilização do filtro de UV e para confirmação foi utilizado o 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), através da visualização dos ácidos nucléicos (ROBERTSON; CAMPBELL; SMITH, 1992; BUKHARI et al., 1998; DWI, 1998; EPA, 1999; FRICKER, 2000). As estruturas visualizadas foram identificadas como (oo) cistos porque apresentaram as seguintes características: quatro núcleos azul céu distintos dentro de um único (oo) cisto; coloração azul intensa interna, com núcleo aparente e leve coloração azul interna (DWI, 1998; EPA, 1999).

Perante a observação de características morfológicas atípicas, o exame de microscopia de contraste de fase permitiu a visualização de estruturas internas típicas. Para os cistos a presença de axonema e núcleos e para os oocistos até quatro esporozoitos e corpo residual citoplasmático retrátil, dentro de uma parede lisa intacta (DWI, 1998).

Nesta pesquisa, apesar do pequeno número de amostras, constatou que o Método McCuin; Clancy (2005) e 1623 (EPA, 2005) foi eficiente quanto à detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.

A relação da concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. encontrada no esgoto bruto e tratado é apresentada nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Concentração de cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto e tratado ETE - Ribeirão Preto/SP: valores individuais, média aritmética, valores mínimos e máximos

| Data das coletas | Esgoto Bruto *Giardia* ssp. (cistos/L) | Esgoto Tratado *Giardia* ssp. (cistos/L) |
|---|---|---|
| **01/mar** | NR* | NR* |
| **02/abr** | 1075 | 0,45 |
| **03/abr** | 540 | 2,7 |
| **04/mai** | 1060 | 3,4 |
| **05/jun** | NR* | NR* |
| **06/jun** | 2200 | 3,5 |
| **07/jul** | 120 | 2,75 |
| **Média aritmética** | 999,00 | 2,56 |
| **Valor Mínimo** | 120 | 0,45 |
| **Valor Máximo** | 2200 | 3,5 |

*NR – não realizado. Não foi possível realizar a contagem de cistos de *Giardia* ssp. devido a elevada concentração de matéria orgânica na lâmina, após tratamento da amostra.

Tabela 4 – Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de esgoto bruto e tratado ETE-Ribeirão Preto/SP: valores individuais, média aritmética, valores mínimos e máximos

| Data das coletas | Esgoto Bruto *Cryptosporidium* ssp. (oocistos/L) | Esgoto Tratado *Cryptosporidium* ssp. (oocistos/L) |
|---|---|---|
| **01/mar** | NR* | NR* |
| **02/abr** | 3,3 | NR |
| **03/abr** | 28,9 | 1,05 |
| **04/mai** | ND | 0,55 |
| **05/jun** | ND** | NR** |
| **06/jun** | 2,2 | 0,15 |
| **07/jul** | ND** | 0,75 |
| **Média aritmética** | 6,88 | 0,50 |
| **Valor Mínimo** | ND** | ND** |
| **Valor Máximo** | 28,9 | 1,05 |

* NR- não realizado. Não foi possível realizar a contagem de oocistos de *Cryptosporidium* ssp., devido a elevada concentração de matéria orgânica na lâmina, após tratamento da amostra.
** ND – não detectado

Através da análise das Tabelas 3 pode-se observar que a concentração de cistos de *Giardia* spp. no esgoto bruto foi de 120 a 2200 cistos/L, já no esgoto tratado essa concentração variou de 0,45 a 3,5 cistos/L. Com relação aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. no esgoto bruto variou de ND (não detectável) a 28,9 oocistos/L e no esgoto tratado as concentrações variaram de ND a 1,05 oocistos/L (Tabela 4).

A Tabela 5 apresenta a concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em esgoto, descrita em estudos desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisa.

Tabela 5 – Média da concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em esgoto doméstico tratado por diferentes sistemas de tratamento.

| ***Crytosporidium spp* (oocistos/L)** | ***Giardia* spp (cistos/L)** | **Referência** | **Técnica utilizada para análise** |
|---|---|---|---|
| 3,7 | 39 | Rose et al., 1996 | Filtração e concentração por centrifugação |
| 10,4 | 4,3 | Cardoso et al., 2003 | Filtração em membranas de acetato de celulose e eluídas com solução tampão a quente |
| $6 \times 10^4$ | $1 \times 10^5$ | Cantusio Neto et al., 2006 | Método 1623 |
| 79 a 2469 | 2 a 390 | Castro-Hermida et al., 2007 | Método 1623 |
| 158 a 230 | 26 a 82 | Wen et al., 2009 | Floculação com carbonato de cálcio e IMS |
| 1 a 80 | 2 a 14, 4 | Castro–Hermida et al., 2010 | Método 1623 |

Nos trabalhos sumarizados na Tabela 5, pode ser observado que a concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. não apresenta um padrão homogêneo, sendo que em alguns trabalhos a concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi maior que a dos cistos de *Giardia* spp., no entanto, em outros estudos a distribuição desses protozoários segue um padrão inverso.

A variabilidade na concentração desses protozoários no esgoto depende da origem e composição do efluente tratado em cada estação e de outros fatores como: fonte de captação de água para o consumo da comunidade, consumo per capita de

água, clima, hábitos e condições sócio-econômicas da população, atividades econômicas da região, presença de efluentes industriais, infiltração de águas pluviais, idade das águas residuárias, dentre outras variáveis (ROCHA et al., 2011).

A densidade de cistos de *Giardia* spp. encontrados no presente estudo é superior à densidade de oocistos de *Cryptosporidium* spp., indo ao encontro dos resultados apresentados por Cantusio Neto et al. (2006) e Rose et al. (1996).

A menor concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp., poderia ser explicada pelo fato das propriedades de adesão do parasito às superfícies sólidas, considerando que a agregação dos oocistos é um fator importante para a otimização dos processos de remoção do Método 1623 da USEPA.

Quando os oo (cistos) são expostos a estresse ambiental ou estresse pelo processamento da própria metodologia, a conformação dos epitopos dos antígenos é modificada, fazendo-os ficarem mais ou menos reativos aos anticorpos. No caso em que os anticorpos utilizados para a IMS e o corante reagirem abaixo do esperado, os oo (cistos) podem não ser detectados, causando resultados falsos negativos (SIMMONS III et al., 2001).

Evidencia-se que a concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. encontra-se no Esgoto da ETE-Ribeirão Preto/SP com densidades que se enquadram nos valores apresentados em alguns dos estudos descritos.

A separação imunomagnética representa um avanço ao selecionar os parasitos na etapa de purificação, na qual os cistos e oocistos são separados das sujidades, com desempenho superior aos procedimentos de flutuação. Na atualidade, a IMS apresenta-se como uma ferramenta diagnóstica sensível, com inúmeras vantagens na detecção de agentes patogênicos em diferentes tipos de amostras (ROBERTSON, GJERDE; 2001). No entanto, o alto custo dos reagentes necessários para a detecção e quantificação dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.; assim como a especificidade do Método e a necessidade de qualificação analítica, torna esta técnica ainda pouco acessível no Brasil.

Na Figura 28 se apresenta a comparação gráfica dos valores médios obtidos a partir das concentrações descritas anteriormente para cistos de *Giardia* spp. e

oocistos de *Cryptosporidium* spp. antes e depois do tratamento de esgoto pelo Sistema Lodos Ativados.

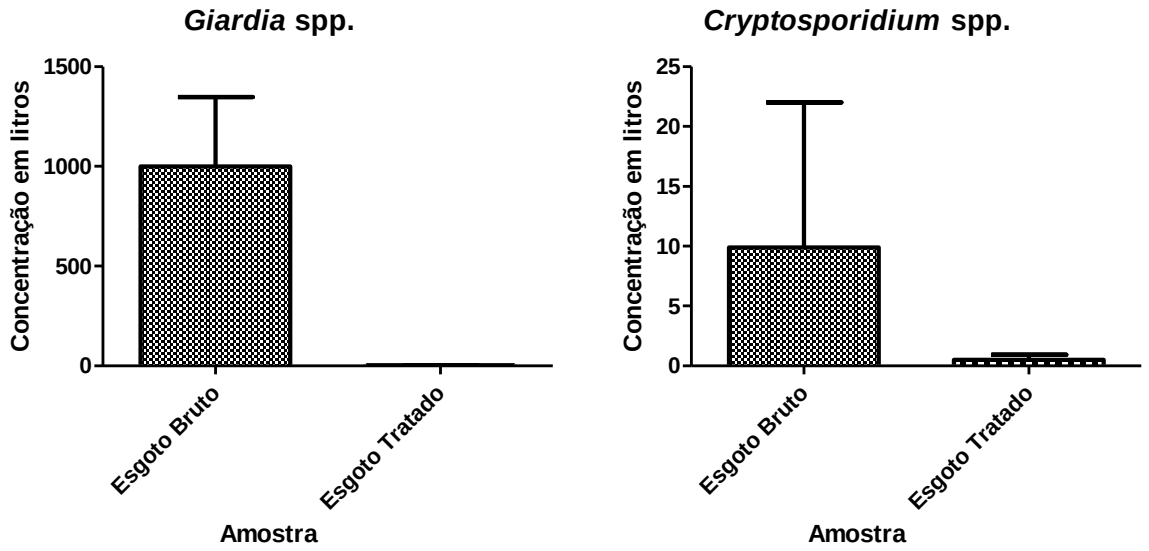


Figura 28 – Distribuição das concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos *de Giardia* spp.no esgoto bruto e tratado da ETE – Ribeirão Preto/SP.

A concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. detectados nos pontos de coleta (bruto e tratado) foram comparados utilizando-se a análise estatística não paramétrica, mediante o Teste t, com um intervalo de confiança de 95%.

Através da análise estatística dos resultados de cistos de *Giardia* spp. pode-se observar que houve uma diferença significante entre o tipo de esgoto analisado, uma vez que o valor de *p* foi menor que 0,05 (Apêndice A). Já com relação a análise estatística de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pode-se observar que não houve diferença significante entre o tipo de esgoto analisado, uma vez que o valor de *p* foi maior que 0,05, apresentando como resultado o valor de 0,1221 (Apêndice B). O que significa que mesmo havendo remoção de ambos parasitas no esgoto após o tratamento, a diminuição de cistos de *Giardia* spp. foi significativamente maior.

No presente estudo não foi calculada a porcentagem de remoção, considerando o pequeno número de amostras e a representatividade dos resultados positivos. Porém, pode-se destacar que em um estudo realizado em 11 ETEs com sistemas de tratamento por lodos ativados, foi descrita uma remoção de 90 a 100% para cistos de *Giardia* spp. no esgoto tratado (SYKORA et al., 1991). Os autores ainda ressaltam o risco da acumulação de cistos no lodo de esgoto final a ser disposto e a necessidade de cloração do efluente e do tratamento do lodo de esgoto.

Segundo Cantusio Neto et al. (2006), o efluente tratado pelo sistema lodos ativados apresentou uma remoção de 98,9% de cistos de *Giardia* spp. e 99,7% de oocistos de *Cryptosporidium* spp.. A remoção desses protozoários, também nesse caso, foi explicada pela fixação de cistos e oocistos ao lodo ativado em suspensão que posteriormente sedimenta no decantador.

Chen et al. (2009) relataram remoções de 64 a 99% de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e 98 a 100% de cistos de *Giardia* spp. em ETEs. Segundo os autores, avaliar o comportamento microbiológico de (oo) cistos permite o entendimento do grau de estabilização do efluente tratado após as diferentes etapas de tratamento do esgoto e alertam para a infectividade dos oo (cistos) encontrados nos produtos finais.

No entanto, pelas evidências apresentadas nos estudos descritos anteriormente e pelos resultados obtidos no presente trabalho, verifica-se que a porcentagem de redução de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp, foi superior a 50% em todos os casos, apontando que o sistema de tratamento de esgoto por lodos ativados da ETE-Ribeirão Preto/SP favorece a remoção desses organismos patogênicos, de maneira relativamente significativa, antes do lançamento no córrego Ribeirão Preto, corpo d'água receptor no município de Ribeirão Preto.

Protozoários como *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., podem alcançar cursos de água de diversas fontes, a partir de efluentes tratados com cargas parasitárias remanescentes, de esgotos sem tratamento lançados nos rios ou até de restos de material fecal procedente de áreas de criação de gado, cujos oo (cistos) são drenados pelas chuvas (FAYER, 2004).

Estudos de monitoramento de mananciais indicam que a contaminação também pode ocorrer via transporte superficial dos cistos e oocistos proveniente de fezes aplicadas na adubação da terra ou ainda via transporte vertical para as águas subterrâneas (ROSEN et al., 2000; CACCIÒ et al., 2005).

No Brasil, a preocupação quanto à qualidade da água levou o Ministério da Saúde a emitir a Portaria n°1469 de 29/12/2000, republicada como Portaria n° 518 em 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004) que estabelece procedimentos e responsabilidades com relação ao controle da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. A mesma Portaria recomenda pesquisas sobre cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. tendo como meta padrão à ausência desses organismos patogênicos na água potável.

Resultados de ensaios laboratoriais no controle da qualidade da água são elementos importantes para a tomada de decisão na gestão desse recurso. Resultados imprecisos nos testes podem ocasionar um equívoco na condução de medidas na área ambiental, com conseqüente impacto na Saúde Pública (BELLAMY, 2004).

O Método 1623 deve ser executado seguindo critérios para o controle de qualidade que visam minimizar erros e promover dados confiáveis na análise de protozoários de veiculação hídrica (*Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.). Dessa forma, esse programa inclui a avaliação de manuais de uso, protocolos, instrumentos e equipamentos usados (calibração), qualidade dos reagentes, desempenho e treinamento dos analistas e também cartas controle (para controle de qualidade interno e externo). Nesse contexto, para esse método é necessário executar inicialmente testes de precisão e recuperação, de inoculação em matriz, controle negativo e controle de coloração com demonstração contínua dessa capacidade.

Como parte do controle de qualidade do Método foi realizado o Teste de Eficiência (precisão inicial) e Teste de Recuperação, descritos na seção de Material e Métodos (página 68), o qual apresentou uma porcentagem de recuperação de 28% para oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apêndice C).

Com relação à inoculação em matriz de água bruta (Color Seed), o presente estudo apresentou uma porcentagem de recuperação de 23,5% para cistos de *Giardia* spp. e 15% para oocistos *Cryptosporidium* spp. (Apêndice D).

Nestes ensaios de precisão inicial, atestou-se a habilidade de execução do método, livre de interferências da matriz, como por exemplo, a turbidez da amostra de água a ser analisada.

McCuin; Clancy (2003) obtiveram porcentagens de recuperação em água reagente de 45,4 e 61,3% para cistos e oocistos, respectivamente, utilizando o método de filtração por Filta Max® para a etapa de concentração.

Cantusio Neto (2008) obteve uma porcentagem de recuperação, durante a etapa de purificação (IMS) de 71,0 % para cistos de *Giardia* spp. e para oocistos de *Cryptosporidium* spp., 79,0 %.

Grundilingh; Wet (2004) observaram recuperações variáveis em amostras inoculadas artificialmente com Color Seed®: de 0,0 a 10,0% para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de 0,0 a 30,0% para cistos de *Giardia* spp..

Devemos destacar que os oocistos de *Cryptosporidium* spp. aderem às partículas e exibem baixa hidrofobicidade; portanto, quanto maior a turbidez, maior a adesão a elas, prejudicando a eficiência de captura destes organismos. Com relação aos cistos de *Giardia* spp., ressalta-se uma “tendência” hidrofóbica que propicia uma maior recuperação (DAI et al., 2004; HSU; HUANG, 2002).

Vale ressaltar que, duas amostras avaliadas nesse estudo apresentaram altos níveis de turbidez (409 e 949 NTU). Fato que devemos destacar, pois no momento da coleta estava sendo realizado o despejo do chorume coletado no Aterro Sanitário de Ribeirão Preto, o qual é levado, em dias alternados, para tratamento na ETE.

Considera-se que a turbidez pode ter exercido uma influencia negativa na recuperação, uma vez que altos níveis de turbidez geram maior volume do sedimento no final do processamento de centrífugo-concentração, o que pode ter promovido uma queda no desempenho do IMS, dificultando não só a recuperação como a visualização dos oocistos durante a leitura de IFA. Diversos estudos analisaram a influência do volume do sedimento na eficiência de captura dos organismos pela separação imunomagnética e, este se revelou um fator crítico, pois à medida que

aumenta o volume do sedimento, cai o valor de captura (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2003; USEPA, 2005); embora valores de até 2,5 mL do sedimento possam ser processados para cada 100 µL de esferas magnetizadas, os fabricantes recomendam que não seja ultrapassada a proporção de 500 µL do sedimento: 100 µL de esferas ou "beads". Consequentemente, quanto maior o sedimento resultante no final da eluição, maior o custo e tempo de análise, pois há a necessidade de aliquotar o sedimento e processá-lo separadamente.

Hsu et al. (2001) também demonstraram que fatores tais como a idade dos oocistos ou cistos, e a maneira como é feita a técnica de contaminação artificial das amostras de água podem desempenhar um importante papel na recuperação.

Há de se ter uma melhor compreensão da detecção e identificação de espécies de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., de forma a acoplar ao dia-a-dia mecanismos advindos do avanço tecnológico que muito ajudarão nesse monitoramento.

### 5.2. Cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos identificados por métodos analíticos tradicionais.

No presente estudo, a identificação de parasitas foi complementada mediante a realização de técnicas analíticas tradicionais, descritas na metodologia. Dessa forma, além da identificação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo Método 1623, foram identificados cistos/oocistos de protozoários e ovos/larvas de helmintos de outras espécies de parasitas patogênicos nas amostras coletadas de esgoto.

A água residuária pode ser considerada como um importante habitat para a transmissão de agentes parasitários devido à capacidade de sobrevivência que cistos e oocistos de protozoários ou ovos e larvas de helmintos apresentam em condições extremas de poluição da água. De fato, o estudo desses parasitas não só é interessante devido à sua patogênese, mas também devido à sua persistência na maioria dos processos utilizados no tratamento de esgoto (BEN AYED et al., 2009).

Diversos estudos assinalam a presença de parasitas em águas residuárias. Jimènez-Cisneros et al. (2001) encontraram uma concentração de 23-27 ovos de helmintos/L em uma amostra de esgoto doméstico bruto, no México. No Brasil, na cidade de Curitiba, foram encontrados ovos de helmintos em esgoto bruto, com concentrações de 85% de *Ascaris* sp., 5,5% de *Toxocara* sp., 4,5% de *Trichuris* sp., 4,7 de *Hymenolepis* spp. e 0,4% de *Taenia* spp. (PAULINO et al., 2001).

Os valores médios obtidos do total de parasitas observados durante o período do estudo constam na Tabela 6.

Tabela 6 – Remoção de parasitas no esgoto durante o tratamento da ETE-Ribeirão Preto/SP.

| Parasitas | Esgoto Bruto (Densidade Parasitária/L) | Esgoto Tratado (Densidade Parasitária/L) | Remoção (%) |
|---|---|---|---|
| Cistos de protozoários | | | |
| *Endolimax nana* | $8.33 \times 10^2$ | $6.66 \times 10^2$ | 20,1 |
| *Entamoeba coli* | $1.83 \times 10^3$ | $1.50 \times 10^3$ | 18,2 |
| *Entamoeba hystolitica* | $1.17 \times 10^3$ | $5.01 \times 10^2$ | 57,2 |
| Ovos de Helmintos | | | |
| *Ancilostoma* sp. | $2.67 \times 10^3$ | $1.17 \times 10^3$ | 56,3 |
| *Ascaris* sp. | $6.17 \times 10^3$ | $4.50 \times 10^3$ | 27,0 |
| *Fasciola hepatica* | $1.16 \times 10^3$ | 0 | 100 |
| *Strongyloides stercoralis* | $5.78 \times 10^4$ | $7.01 \times 10^3$ | 87,9 |

Os dados apontam que, o processo de lodos ativados na ETE-Ribeirão Preto/SP promoveu uma remoção parcial de parasitas considerados como possíveis indicadores de acordo com as orientações da OMS (1999). O fator de redução variou entre 18,2 e 100%, para parasitas como *Endolimax nana*, *Entamoeba coli, Entamoeba hystolítica*, *Ancylostoma* spp., *Ascaris* spp., *Fasciola hepática* e *Strongyloides stercoralis* (TONANI et al., 2010).

A remoção dos protozoários e helmintos no sistema de lodo ativado ocorre basicamente por meio da adesão e sedimentação do biofloco formado durante a decantação secundária (BEN AYED, 2009; GASPARD; SCHWARTZBROD, 2003; WEN et al., 2009). De acordo com Amahmid et al. (2002) e Stott et al. (2003), a eficiência para a remoção de parasitas depende do tempo de detenção hidráulica do sistema tratamento, nesse caso as lagoas de estabilização, parecem ser adequadas opções considerando o elevado tempo de detenção. A ETE-Ribeirão Preto/SP

apresenta um tempo de detenção hidráulica de esgoto que varia de 6 a 8 h. Esse tempo de detenção parece ser suficiente para transferir parasitas e ovos da fase líquida para o lodo primário e secundário gerado durante o tratamento do esgoto.

A elevada incidência de doenças parasitárias é um permanente problema para a saúde pública pelo fato de apresentarem uma ampla distribuição geográfica em todo o mundo, mas principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. Consequentemente, sistemas eficientes e alternativos para o tratamento do lodo devem ser implementados para a inativação dos parasitas resistentes a fim de minimizar os riscos inerentes à exposição humana, tendo em conta que os oocistos e cistos de protozoários são ambientalmente resistentes e podem sobreviver no solo úmido a baixas temperaturas; por sua parte, os ovos de helmintos podem ser infecciosos por períodos prolongados de tempo.

Frequentemente, os programas de controle de helmintos buscam interferir no ciclo parasitário com medidas de saneamento e higiene, para reduzir ou impedir a transmissão. Porém, os parasitos desenvolveram mecanismos adaptativos, como, por exemplo, o número elevado de ovos produzidos pelas fêmeas (*Ascaris* sp.), a espessa casca dos ovos (*Ascaris* sp. e T*richuris* sp.), a penetração cutânea dos ancilostomídeos, além dos hábitos e comportamento dos hospedeiros (disseminação fecal), que possibilitam sua prevalência no ambiente (KONING, 2000).

### 5.3. Parâmetros Microbiológicos

Os principais microrganismos utilizados como indicadores de poluição de origem fecal são: coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, colifagos (ASHBOLT et al., 2001; BASTOS et al., 2003; HACHICH et al., 2004; SAVICHTCHEVA; OKABE, 2006).

O grupo de bactérias coliformes é empregado universalmente no estabelecimento do padrão de qualidade de água e na determinação da presença ou ausência de agentes patogênicos na água.

Na Tabela 7, podem-se observar as concentrações de coliformes totais e termotolerantes encontrados no esgoto bruto e tratado da ETE - Ribeirão Preto/SP.

Tabela 7- Concentração de coliformes totais e termotolerantes no esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP, expresso em NMP/100 mL.

| Amostra/Mês | Esgoto Bruto coliformes totais | Esgoto Tratado coliformes totais | Esgoto Bruto coliformes termotolerantes | Esgoto Tratado coliformes termotolerantes |
|---|---|---|---|---|
| **01/mar** | $1,3 \times 10^7$ | $2,0 \times 10^4$ | $3,3 \times 10^6$ | $2,0 \times 10^4$ |
| **02/abr** | $2,3 \times 10^7$ | $7,9 \times 10^5$ | $2,3 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^5$ |
| **03/abr** | $1,3 \times 10^7$ | $3,3 \times 10^5$ | $7,9 \times 10^6$ | $1,3 \times 10^5$ |
| **04/mai** | $5,4 \times 10^7$ | $3,3 \times 10^4$ | $4,9 \times 10^6$ | $1,3 \times 10^5$ |
| **05/jun** | $3.3 \times 10^7$ | $3,3 \times 10^5$ | $3,3 \times 10^6$ | < 1,8 |
| **06/jun** | $7,9 \times 10^6$ | $4,9 \times 10^5$ | $3,3 \times 10^6$ | $4,5 \times 10^4$ |
| **07/jun** | $2,3 \times 10^7$ | $4,5 \times 10^4$ | $7,9 \times 10^6$ | < 1,8 |
| **Máximo** | $5,4 \times 10^7$ | $7,9 \times 10^5$ | $2,3 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^5$ |
| **Mínimo** | $7,9 \times 10^6$ | $2,0 \times 10^4$ | $3,3 \times 10^6$ | < 1,8 |

Através da análise da Tabela 7, pode-se verificar que houve uma remoção parcial de coliformes totais e termotolerantes, o que pode estar relacionado com a presença de outros protozoários como *Endolimax nana*, *E. coli/hystolitica* e *Giardia* spp., levando em conta que o maior mecanismo de remoção de bactérias no esgoto é a predação exercida por outros protozoários (TYAGI et al., 2008; TONANI et al., 2010).

Na Figura 29, se apresenta esquematicamente a redução de coliformes totais e termotolerantes nas amostras analisadas (esgoto bruto e tratado).

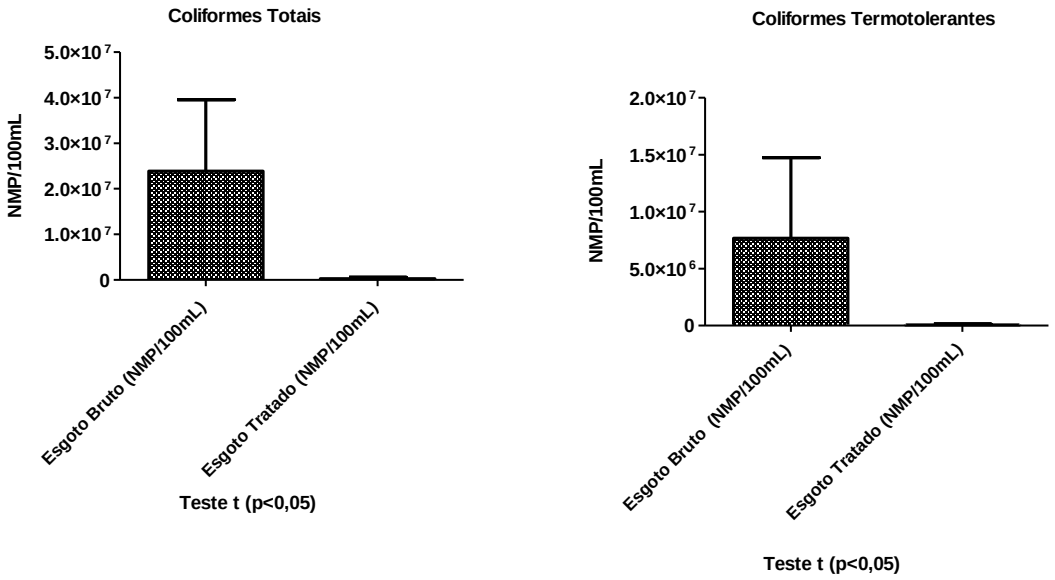


Figura 29 - Distribuição das concentrações de coliformes totais e termotolerantes detectados nas amostras de esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP.

Os resultados obtidos na análise microbiológica foram avaliados segundo as legislações vigentes do tratamento Decreto Estadual nº 8468 (SP), de 8 de setembro de 1976 e pela Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 do CONAMA (SÃO PAULO. CETESB, 1974; BRASIL. CONAMA, 2005).

O Decreto Estadual n° 8468 (SP) aprova o Regulamento da Lei nº 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a Prevenção e o Controle da Poluição do Meio Ambiente. Já a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005 do CONAMA, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

Ambas as legislações classificam as águas situadas no território do Estado, seguindo os seguintes usos preponderantes:

I - Classe 1: águas destinadas ao abastecimento doméstico, sem tratamento prévio ou com simples desinfecção;

II - Classe 2: águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional, à irrigação de hortaliças ou plantas frutíferas e à recreação de contato primário (natação, esquiaquático e mergulho);

III - Classe 3: águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional, à preservação de peixes em geral e de outros elementos da fauna e da flora e à dessedentação de animais;

IV - Classe 4: águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento avançado, ou à navegação, à harmonia paisagística, ao abastecimento industrial, à irrigação e a usos menos exigentes.

Observa-se que as legislações vigentes, Decreto Estadual nº 8468 (SP), de 8 de setembro de 1976 e pela Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 do CONAMA (SÃO PAULO. CETESB, 1974; BRASIL. CONAMA, 2005) não estabelecem limites para coliformes totais e termotolerantes. O esgoto tratado pela ETE-Ribeirão Preto/SP é lançado no Ribeirão Preto, este considerado de Classe 4, o mesmo poderá ser utilizado para o abastecimento público, somente se métodos especiais de tratamento forem utilizados, a fim de garantir a sua potabilização (TONANI et al., 2010).

Mediante ao teste estatístico Teste t não paramétrico, pode-se observar que houve diferença significante entre o número mais provável de coliformes totais e termotolerantes no esgoto bruto e esgoto tratado, pois o valor de $p$ foi de 0,0019 para coliformes totais e 0,0149 para coliformes termotolerantes (Apêndice E). Pelo teste de correlação de Pearson ($p<0,05$), pode-se observar que não houve correlação significativa entre as concentrações de coliformes totais e termotolerantes com cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apêndice F).

Muller (1999), utilizando o teste de correlação de Pearson também não obteve correlações significativas entre as concentrações de oocistos de C*ryptosporidium* spp. e coliformes totais e *E. coli* ($p<0,05$), em 12 amostras de água bruta na cidade de São Paulo, onde (coeficiente de correlação) variou de 0,100 a 0,360. Hachich et al. (2004) encontraram correlação de cistos de *Giardia* spp. com os indicadores de poluição fecal (coliformes termotolerantes, *Streptococcus faecalis* e *Clostridium perfringens*).

Devemos ressaltar que o uso do grupo “coliformes” como indicadores da qualidade da água para consumo humano, no que tange a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., tem sido muito questionado devido ao fato de que as bactérias desse grupo são menos resistentes do que os protozoários em questão. Por esse motivo outros organismos têm sido sugeridos como indicadores

para a avaliação da qualidade da água, como o *Clostridium perfringens*. Estes microrganismos se mostram mais promissores, por apresentarem similaridade com os cistos de *Giardia* spp. e os oocistos de *Cryptosporidium* spp. na resistência à desinfecção. Porém, a substituição dos coliformes como indicadores requer estudos mais aprofundados (STANDRIDGE, 2008).

### 5.4. Parâmetros Virológicos

A remoção de patógenos virais no tratamento de esgoto convencional resulta da adsorção dos vírus ao material particulado, permanecendo concentrado no lodo (GERBA; SMITH, 2005).

Na Tabela 8, podem ser observados os valores obtidos para o controle-positivo e negativo, o ponto de corte (cut-off) e a absorbância obtida durante a condução do Teste de Elisa - RIDASCREEN® para *Rotavirus* e *Adenovirus* no esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP. Pode-se observar que 100% das amostras de esgoto bruto e tratado apresentaram reação positiva para *Rotavirus* e *Adenovirus*.

Tabela 8– Valores da Absorbância (A) obtidos na técnica de Elisa - RIDASCREEN® durante a análise de *Rotavirus* e *Adenovirus* no esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP

| ***Rotavirus*** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Amostra** | **Controle Negativo** | **Controle Positivo** | **Ponto de Corte** | **Esgoto Bruto** | **Esgoto Tratado** |
| **01/mar** | 0,050 | 0,65 | 0,25 | 0,964(+) | 0,382(+) |
| **02/abr** | 0,054 | 0,70 | 0,26 | 0,929(+) | 0,289(+) |
| **03/abr** | 0,030 | 0,60 | 0,19 | 0,729(+) | 0,283(+) |
| **04/mai** | 0,035 | 0,70 | 0,21 | 0,714(+) | 0,335(+) |
| **05/jun** | 0,044 | 0,65 | 0,23 | 2,986(+) | 1,182(+) |
| **06/jun** | 0,047 | 0,75 | 0,24 | 0,988(+) | 0,303(+) |
| **07/jun** | 0,024 | 0,66 | 0,17 | 0,845(+) | 0,416(+) |
| ***Adenovirus*** | | | | | |
| **Amostra** | **Controle Negativo** | **Controle Positivo** | **Ponto de Corte** | **Esgoto Bruto** | **Esgoto Tratado** |
| **01/mar** | 0,025 | 0,680 | 0,175 | 0,528(+) | 0,434(+) |
| **02/abr** | 0,058 | 0,780 | 0,274 | 0,521(+) | 0,430(+) |
| **03/abr** | 0,015 | 0,650 | 0,145 | 0,731(+) | 0,480(+) |
| **04/mai** | 0,018 | 0,650 | 0,154 | 0,500(+) | 0,420(+) |
| **05/jun** | 0,033 | 0,720 | 0,199 | 0,789(+) | 0,500(+) |
| **06/jun** | 0,023 | 0,680 | 0,169 | 0,410(+) | 0,400(+) |
| **07/jun** | 0,043 | 0,630 | 0,229 | 0,972(+) | 0,500(+) |

(+): Reação Positiva

Considerando que o valor da Absorbância reflete a coloração produzida durante a reação com o cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) e que essa coloração por sua vez está relacionada com a quantidade de antígeno do *Rotavirus* e *Adenovirus* presente na amostra, verifica-se que houve uma redução dos vírus após tratamento do esgoto por lodos ativados (Figura 30). A remoção de patógenos virais no tratamento de esgoto convencional resulta da adsorção dos vírus ao material particulado, permanecendo concentrado no lodo (GERBA, SMITH, 2005).

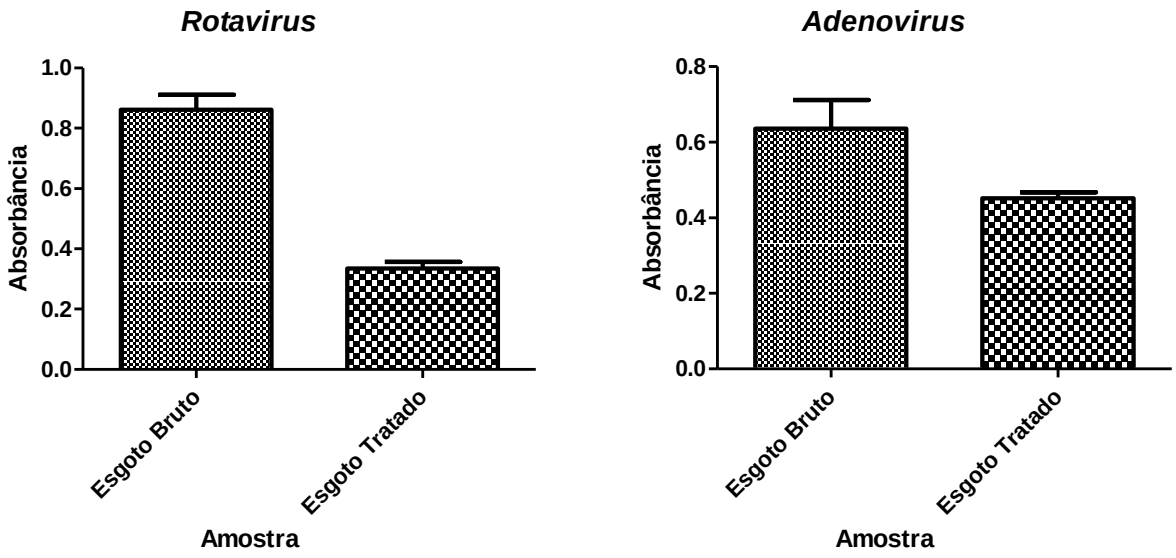


Figura 30- Visualização da variação da Absorbância durante o Teste de Elisa - RIDASCREEN® para *Rotavirus* e *Adenovirus* no esgoto bruto e tratado da ETE-Ribeirão Preto/SP.

Embora os vírus analisados no presente estudo tenham potencial patogênico, muitos deles, são encontrados no ambiente em concentrações baixas antes do tratamento de esgoto, portanto, não são capazes de causar infecções em seus hospedeiros (METCALF, MELNICK, ESTES, 1995). Para a realização da análise de vírus foi necessário coletar aproximadamente 2L de amostra (esgoto bruto e tratado) passando por um sistema de filtração para a concentração da mesma.

A escolha do método de análise baseou-se na padronização de uma técnica que permitisse a redução do tempo de análise, a simplificação do trabalho laboratorial e a redução dos custos. O método utiliza anticorpos policlonais em um imunoensaio enzimático tipo sanduíche em fase sólida para detectar somente a presença do antígeno específico. De acordo com os resultados apresentados pode-se dizer que o volume da amostra e a metodologia utilizada foram adequados para a verificação da reatividade dos antígenos virais nas amostras de esgoto.

A presença de patógenos virais no esgoto tratado revela o potencial dessas águas em disseminar esses agentes no meio ambiente (RUSIN et al., 2000). Contudo,

o risco real à saúde pública só pode ser avaliado com base em dados de infectividade e número de partículas virais por volume em face à modalidade de aplicação da água de reuso.

Atualmente, apesar da Resolução n°54, de Novembro de 2005 do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH), ter estabelecido as modalidades, diretrizes e critérios gerais para a prática do reuso direto não potável de água, há necessidade de regulamentação complementar de padrões de qualidade e códigos de práticas para as diversas modalidades de reuso (BRASIL, 2006, PROSAB, 2006).

De maneira geral, o controle da contaminação por vírus, protozoários e helmintos ainda não tem parâmetros definidos (SANTAMARÍA; TORANZOS, 2003) e correlações entre a detecção de coliformes e a contaminação por vírus patogênicos para o homem não foram estabelecidas (SALGOT et al., 2001). Por outro lado, mais de 140 tipos de vírus patogênicos para o homem podem ser veiculados pelo ambiente aquático (SCHWARTZBROD, 1995), o que representa um risco à saúde pública causando doenças diarréicas por *Rotavirus, Astrovirus, Calicivirus, Norovirus* e *Adenovirus*, ou mesmo as hepatites causadas por *Enterovirus* (GERBA, ROSE, SINGH, 1985; ROSE, GERBA, 1991; SCHWARTZBROD, 1995).

# *CONCLUSÕES*

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos traçados para o presente estudo e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

A concentração de *Giardia* spp. no esgoto bruto variou de 120 a 2200 cistos por litro, já no esgoto tratado essa concentração variou de 0,45 a 3,5 cistos por litro. Com relação aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. a concentração no esgoto bruto variou de não detectável a 28,9 oocistos por litro e no esgoto tratado as concentrações variaram de não detectável a 1,05 oocistos por litro, evidenciando diminuição após o tratamento do esgoto na ETE-Ribeirão Preto/SP.

O processo de lodos ativados na ETE-Ribeirão Preto/SP promoveu uma remoção parcial de parasitas. O fator de redução variou entre 18,2 e 100% para parasitas tais como *Endolimax nana, Entamoeba coli, Entamoeba hystolitica, Ancylostoma* sp., *Ascaris* sp. *Fasciola hepatica* e *Strongyloides stercoralis*.

Pode-se observar que houve diferença significativa entre o número mais provável de coliformes totais e termotolerantes no esgoto bruto e esgoto tratado, mostrando uma redução na concentração desses indicadores após o tratamento do esgoto na ETE-Ribeirão Preto/SP.

Não houve correlação significativa entre as concentrações de coliformes totais e termotolerantes em relação à concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., confirmando a necessidade de futuros estudos para a substituição do grupo Coliformes como indicadores por microrganismos mais resistentes.

Em relação as análise de vírus, a presença dos mesmos pela Técnica de Elisa no esgoto bruto e tratado foi comprovada, revelando a capacidade do *Adenovirus* e *Rotavirus* se disseminar no meio ambiente. A quantidade de antígeno para ambos os vírus, refletindo na leitura da absorbância, diminuiu após o tratamento por lodos ativados.

O desenvolvimento do presente estudo, possibilitou a implementação da metodologia 1623 para análise de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. e do Teste de Elisa para análise de vírus no Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP, ampliando a capacidade analítica desse laboratório e viabilizando a projeção de novos estudos que permitam avaliar a prevalência dos referidos protozoários no ambiente.

# *CONSIDERAÇÕES FINAIS*

# 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o controle de doenças infecciosas prevalentes e emergentes torna-se necessário o combate à pobreza e o fortalecimento de uma adequada utilização dos recursos públicos, com priorização para a aplicação dos mesmos em atividades que beneficiem a maioria da população, principalmente nas áreas da educação, saúde pública e saneamento.

A proteção contra surtos de doenças de transmissão hídrica precisa de aprofundamento das pesquisas sobre processos de desinfecção, monitoramento da qualidade de fontes de água e desenvolvimento de novas tecnologias para detecção de bioagentes patogênicos emergentes e re-emergentes de importância sanitária (ROCHELLE et al., 1999).

Um sistema de esgotamento sanitário devidamente planejado constitui uma estrutura de extrema importância para a prevenção de doenças transmissíveis, quando a coleta, transporte e tratamento das águas residuárias domésticas atende toda a população.

No Brasil, aproximadamente 55% dos municípios conta atualmente com rede coletora de esgoto já implantada em quase toda a extensão de sua área urbana, necessitando, no entanto de obras para o transporte e tratamento do esgoto doméstico. Esse fato aponta para uma situação que agride o meio ambiente, pois cursos d'água que cruzam as cidades são atingidos diretamente por lançamentos "in natura" de esgoto bruto, causando além dos danos diretos ao corpo d'água, sérios focos de proliferação de doenças de veiculação hídrica.

O planejamento e a construção de um sistema de esgotamento sanitário eficiente, numa cidade seja ela de pequeno, médio ou grande porte é um desafio para administradores públicos, considerando o elevado impacto social desses empreendimentos.

A disposição de efluentes de esgoto tem sido uma constante preocupação por parte de ETEs e dos órgãos ambientais, sendo que a avaliação prévia antes do seu lançamento é vista como uma importante ferramenta para um maior e melhor controle da contaminação dos mananciais em todo o mundo. Esse fato se confirma, uma vez que dois milhões de toneladas de esgoto são lançados diariamente em corpos d'água no planeta

(COFIE et al., 2006), fazendo desses processos de avaliação um importante instrumento de monitoramento do impacto desses efluentes no ambiente.

Assim, as análises realizadas no presente estudo estão sendo cada vez mais indicadas por especialistas das áreas de Microbiologia Ambiental, Saneamento e Saúde Pública, como importantes instrumentos para o conhecimento da persistência de bioagentes patogênicos e do grau de contaminação dos recursos hídricos.

Dessa forma, vem sendo abordada a necessidade de que patógenos virais, protozoários e helmintos, também devam ser utilizados como indicadores da qualidade microbiológica da água potável, da água utilizada para fins recreacionais e da água de reuso (BOSCH et al., 1998).

A necessidade de monitoramento desses patógenos se deve ao fato de oferecerem elevado risco à saúde pública, por causarem infecção em baixas doses, especialmente em pessoas imunodeprimidas, idosos e crianças. Além disso, por apresentar difícil remoção e inativação por processos convencionais de tratamento e pela sua persistência no meio ambiente (CROCKETT, 2007).

Durante a realização do presente estudo foi possível evidenciar que para a implementação de técnicas analíticas especializadas como as utilizadas nesta pesquisa, é necessário um alto investimento de recursos financeiros para aquisição dos materiais e equipamentos, assim como, profissionais especializados em técnicas específicas, fatores que devem ser considerados para fortalecer a implementação dessas técnicas em regiões do país, menos favorecidas economicamente.

Dessa forma, percebe-se que maiores investimentos em programas de monitoramento da qualidade da água, tanto potável quanto residuária, são necessários para avançar na identificação de bioagentes patogênicos de relevância sanitária no Brasil.

# *Referências*

## 8. REFERÊNCIAS

ABBASZADEGAN, M. Advanced detection of viruses and protozoan parasites in water. **Reviews in Biology and Biotechnology,** Victoria Island, v. 1, p. 1-26, 2001.

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lambia*. **Clinical Microbiology Reviews,** Washington, v. 14, n. 4, p. 447- 475, 2001.

AFTER, R. A.; GOLDSBY, T. J.; KINDT, B. A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4th ed. (W. H. Freeman and Company, 2000), p. 162.

AIYUK, S.; FORREZ, I.; LIEVEN, D. E. K.; HAANDEL, A.; VERSTRAETE, A. Abaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates – A review. **Bioresource Technology**, Maryland Heights, v. 97, p. 2225-2241, 2006.

ALI, S. A.; HILL D. R. Giardia intestinalis. **Current Opinion in Infectious Diseases,** London, v. 16, n.5, p. 453-460, 2003.

ALVES, N. C.; ODORIZZI, A. C.; GOULART, F. C. Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília, SP. **Revista de Saúde Pública,** São Paulo, v. 36, p. 749-751, 2002.

AMAHMID, O.; ASMAMA, S.; BOUHOUM, K. Urban wastewater treatment in stabilization ponds: occurrence and removal of pathogens. **Urban Water**, Oxford, n. 4, p. 255-262, 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Microbiological Examination (APHA). In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 21ed., Washington DC, 2005.

APPLETON H. Control of food-borne viruses. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 56, p. 172-183, 2000.

ARRAJ, A.; BOHATIER, J.; LAVERAN, H.; TRAORE, O. Comparison of bacteriophage and enteric virus removal in pilot scale activated sludge plants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford**,** v. 98, p. 516-524, 2005.

ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and diseases outcomes in developing regions. **Toxicology,** Maryland Heights, v. 198, p. 229-238, 2004.

ASHBOLT, N. J.; GRABOW, W. O. K.;SNOZZI, M. “Indicators of microbial water quality.”In: FEWTRELL, L. (ed.) **Water Quality: Guidelines, Standards and Health**. World Health Organization, Londres, Inglaterra, p. 289-316, 2001.

BASTOS, R. K. X.; BEVILACQUA, P. D.; KELLER, R. Organismos Patogênicos e Efeitos sobre a Saúde Humana. In: GONÇALVES, R. F. **Desinfecção de Efluentes Sanitários**. Rio de Janeiro: PROSAB 3, 2003. p.27-88.

BASTOS, R. K. X.; HELLER, L.; VIEIRA, M. B. C. M.; BRITO, L. L. A.; BEVILACQUA, P. D.; NASCIMENTO, L. E. Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts dynamics in Southeast Brazil. Occurance in Surface water and removal in water treatment processes. **Water Science and Technology**, Oxford, v.14, n.2, p.15-22, 2004.

BELLAMY, J.E.C. Quality assurance considerations for detection of waterborne zoonotic parasites using *Cryptosporidium* oocyst detection as the main example. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.126, p.235-248, 2004.

BEN AYED, L. B.; SCHIJVEN, J.; ALOUINI, Z.; JEMLI, M.; SABBAHI, S. Presence of parasitic protozoa and helminth in sewage and efficiency of sewage treatment in Tunisia. **Parasitology Research**, Berlin, n.105, p. 393-406, 2009.

BERN, C.; ORTEGA, Y.; CHECKLEY, W.; ROBERTS, M.; LESCANO, A. G.; CABRERA, L.; VERASTEGUI, M.; BLACK, R. E.; STERLING, C.; GILMAN, R. H. Epidemiologic Differences Between Cyclosporiasis and Cryptosporidiasis in Peruvian Children. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.8, n.6, p.581-585, 2002.

BERTRAND, I.; SCHWARTZBROD, J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and faecal contamination origin. **Water Research**, Oxford, v. 41, n. 16, p. 3675-3682, 2007.

BINGHAM, A. K.; MEYER, E. A. *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. **Nature**, London, v. 277, p. 301-302, 1979.

BISHOP, R. F.; DAVI DSON, G. P.; HOLMES, I. H.; RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **The Lancet,** London, v. 2, n. 841, p. 1281-1283, 1973.

BITTON, D. Pathogens and parasites in domestic wastewater. In: _____.**Wastewater microbiology.** 2nd. ed. New York: Wiley-Liss, 1997.

BORGES, W. W.; CORRÊA, J. O. A.; MESQUITA, H. L. Rotavírus e as perspectivas para seu controle por terapia vacinal. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, Juiz de Fora, v. 1, n. 2, p. 75 - 81, 2009.

BOSCH, A. Human enteric viruses in water environment: a minireview. **International Microbiology**, Barcelona, v. 1, p. 191-196, 1998.

BOUZID, M.; STEVERDING, D.; TYLER, K.M. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.19, p. 1-5, 2008.

BRASIL. **Plano Nacional de Recursos Hídricos**. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos Hídricos. Brasília, Março de 2006

_____. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Saneamento.** 3 ed., p. 408, 2007.

_____. Ministério da Saúde. **Doença diarréica por rotavírus: Vigilância epidemiológica e prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano – VORH**. Disponível em: portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_rotavirus_02_03_2006.pdf- Acesso em: 06 maio 2007.

_____. MINISTERIO DA SAÚDE. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 estabelece os procedimentos relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências . **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, seção I, p.266, Brasília, 26 março 2004.

_____. CONAMA. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e das outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 de março de 2005.

BRICKS, L. F. Rotavírus: atualização sobre doenças e vacinas. **Pediatria**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 252-66, 2005.

BUCHEL, L. A.; GORENFLOT, A.; SAVEL, C.; GOBERT, J. G. In vitro excystation of Giardia from humans: A scanning electron microscopy study. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 73, p.487- 493, 1987.

BUKHARI, Z.; McCUTN, R. M.; FRICKER, C. R.; CLANCY, J.L. Immunomagnetic Separation of *Cryptosporidium parvum* from Source Water Samples of Various Turbidities, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 64, n. 11, p. 4495-4499, 1998.

BUKHARI, Z.; SMITH, H. V.; SKYES, N.; HUMPHREYS, S. W.; PATON, C. A.; GIRDWOOD, R. W. A.; FRICKER, C. R. Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* sp cysts in sewage influents and effluents from plants in England. **Water Science andTechnology,** Oxford, v. 35, n. 11-12, p. 385-390, 1997.

CACCIÓ, S.M.; THOMPSON, R.C.A.; McLAUCHLIN, J.; SMITH, H.V. Unrevelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005.

CANTUSIO NETO, R. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium spp*. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos de processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil.** 2004. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CANTUSIO NETO, R. **Estudo dos métodos: floculação em carbonato de cálcio e adaptação das técnicas de filtração em membrana e separação imunomagnética para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras hídricas.** 2008. 127 f. Tese de Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CANTUSIO NETO, R.; SANTOS, L. U.; FRANCO, R. M. B. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. **Water Science and Technology**, v. 54, n. 3, p**.** 89-94, 2006.

CARDOSO, D. D.; MARTINS, R. M.; KITAJIMA, E. W.; BARBOSA, A. J.; CAMAROTA, S. C.; AZEVEDO, M. S. Rotavírus e adenovírus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiânia-GO, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, n. 34, p. 433-439, 1992.

CARDOSO, L. S.; CARLI, G. A.; de LUCA, S. J. *Cryptosporidium* e *Giardia* em efluentes biologicamente tratados e desinfetados. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 8, n.4, p.285-290, 2003.

CASTANIA, J. **Qualidade da água utilizada para consumo em escolas públicas e municipais de ensino infantil de Ribeirão Preto – SP.** 2009. 146 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M. et al. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. **Parasitology Research**, Berlin, v.101, p.1443-1448, 2007.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; MEZO, M. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spin. **Water Research,** Oxford, v. 44, n. 20, p. 5887-5896, 2010.

CAVALIER-SMITH. The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, *Carpediemonas*, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, *Malawimonas*: their evolutionary affinities and new higher taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1741-1758, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Giardiasis Surveillance. United States, 1992-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.49, n. SS-7, 2000.

_____.**Cryptosporidiosis**. Disponivel em: http://www.dpd.cdc.gov/DPDX/HTML/Cryptosporidiosis.htm. Acesso em: 03 fev. 2011

_____. **Giardioses**. Disponivel em: http://www.dpd.cdc.gov/DPDX/HTML/Giardioses.htm. Acesso em: 03 fev. 2011

CHAURET, C.; ARMSTRONG, N.; FISHER, J.; SHARMA, R.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. **Journal of the American Water Works Association**, Denver,v. 87, p. 76-84, 1995.

CHEN, R.Z.; CRAIK, S.A.; BOLTON, J.R. Comparison of the action spectra and relative DNA absorbance spectra of microorganisms: Information important for the determination of germicidal fluence (UV dose) in an ultraviolet disinfection of water. **Water Research**, Oxford, v. 43, p. 5087-5096, 2009.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. Giardíase. In: **Medicina Tropical**. Sérgio Cimerman e Benjamin Cimerman (Org.). 1ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. v.1, p.41-48.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. Parasitoses Intestianis. In: **Condutas em Infectologia.** Sérgio Cimerman e Benjamin Cimerman (Org.). 1ª edição. São Paulo: Editora Atheneu. 2004. v.1, p.329-342.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. Microbiological Examination – Detection of enteric viruses. In: **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**, p. 9-131. American Public Health American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF). Washington, 20th Ed., 1998.

COFIE, O.O.; AGBOTTAH, S.; STRAUSS, M.; ESSEKU, H.; MONTANGERO, A.; AWUAH, E.; KONE, D. Solid-liquid separation of faecal sludge using drying beds in Ghana: Implications for nutrients recycling in urban agriculture. **Water Research**, Oxford, v. 40, p. 75-82, 2006.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo: CETESB, 1987.

_____. **Helmintos e Protozoários Patogênicos – Contagem de Ovos e Cistos em amostras ambientais**. São Paulo: CETESB (NTL5 550), 1989.

_____. **Coliformes Totais e Fecais em amostras de água pela técnica de tubos múltiplos.** São Paulo: CETESB, (NT L5.202),1992.

COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO (CASAN). **ETE - Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários**, 2005. Disponível em: <www.casan.com.br>. Acesso em: 10 jun. 2009.

COSTA, P. S. S.; CARDOSO, D. D. P.; GRISI, S. J. F. E.; SILVA, P. A.; FIACCADORI, F.; SOUZA, M. B. L. D; SANTOS, R. A. T. Infecções e reinfeçcões por Rotavirus: A genotipagem e implicações vacinais. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 80, n. 2, p. 119-122, 2004.

CRAUN, M. F.; CRAUN, G. F.; CALDERON, R. L.; BEACH, M. J. Waterborne outbreaks reported in the United States. **Journal of Water and Health**, London, n. 04, Suppl 2, 2006.

CRAUN, G. F.; HUBBS, S. A.; FROST, F.; CALDERON, R. L.; VIA, S. H. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v.90, n. 9, p. 81-91, 1998.

CROCKETT, C.S. The role of wastewater treatment in protecting water supplies against emerging pathogens. **Water Environment Research**, Alexandria VA, v.79, p.221-232, 2007.
CUNLIFFE, N.; BRESEE, J.; GENTSCH, J.; GLASS, R. The expanding diversity of rotaviruses. **The Lance**t, London, v. 359, p. 640-642, 2002.

DAI, X.; BOLL, J; HAYES, M.E.; ASTON, D.E. Adhesion of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to solid surfaces: the role of surfaces charge and hidrophobicity. **Colloids and Surfaces B:** Biointerfaces, Oxford, n. 34, p. 259 – 263, 2004.

DE SERRES, G.; CROMEANS, T. L.; LEVESQUE, B.; BRASSARD, N.; BARTHE, C.; DIONNE, M.; PRUD'HOMME, H.; PARADIS, D.; SHAPIRO, C. N.; NAINAN, O. V.; MARGOLIS, H. S. Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 179, p. 37-43, 1999.

DIAS JUNIOR, O. **Ocorrência de cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas superficiaias e esgoto no município de Araras – SP**. 1999. 110f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Mackenzie. São Paulo, 1999.
DUPONT, H.; CHAPPEL, C.; STERLING, C. R.; OKHUYSEN, P. C.; ROSE, .J. B.; JAKOBOWSKI, W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in h ealthy volunteers. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.332, p.855, 1995.

DWI-Drinking Water Inspectorate - Standard Operating Protocol for the Monitoring of *Cryptosporidium* Oocysts in Treated Water Supplies to Satisfy **Water Supply (Water Quality) Amendment Regulations 19XX**, SI XXX (Draft). Reino Unido, 1998.

DYKSEN, J. E.; MARSHALL, M. M.; GERA, A.; CLANCY J. L. Cost of advanced UV for inactivating Crypto. **Journal of the American Water Works Association**,Denver, v. 90, p. 103-111, 1998.

ESTEBAN J. G.; AGUIRRE, C.; FLORES, A.; STRAUSS, W.; ANGLES, R.; MASCOMA, S. High *Cryptosporidium* prevalences in healthy Aymara children from the northern Bolivian Altiplano**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.58, n.1, p.50-55, 1998.

ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiological Reviews**, Bethesda, v. 53, p. 410-449, 1989.

ESTES, M. K. Rotavirus and their replication. In: FIELDS , B.N.; KNIPE .; P.M.; HOWLEY , P. M.; editors. **Fundamental Virology**, 3nd ed. Philadelphia. 1996. p. 731-754.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. **Virology.** (Ed.) Fields: 4th ed. 2001. p. 1747-1785.
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. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 41-43, 2002.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 30, p.1305-1322, 2000.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 126, p. 37-56, 2004.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, Oxford,v. 20, n. 11, p. 531-536, 2004.
FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis. **The Lancet**, London, v.2, n. 7844, p. 1497, 1973.

FONG, T. T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: heath risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington DC, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2005.

FRANCO, R. M. B.; CORDEIRO, N. DA S. Giardiose e criptosporidiose em creches no município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade. Brasileira de.Medicina Tropical**,Uberaba, v.29, p.585-591, 1996.

FRICKER, C. Waterborne Cryptosporidiosis: Current Methods and Comparision of Efficiencies for the Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts, **Culture***,* v. 21, n. 1, p. 6-8, 2000.

GAJADHAR, A. A.; ALLEN, J. R. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonootic parasites**. Journal of Veterinary Parasitology**,Bloomfield, n. 126, p. 3-4, 2004.

GARCIA, A.; YANKO, W.; BATZER, G.; WIDNER, G. *Giardia* Cysts in Tertiary-Treated Wastewater Effluents: Are they infective?. **Water Environmental Research**, Bloomfield, v. 74, n.6, p. 541-544, 2002.

GARDNER, T. B.; HILL, D. R. Treatment of giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v.14, p.114-128, 2001.

GASPARD, P. G.; SCHWARTZBROD, J.Parasite contamination (helminth eggs) in sludge treatment plants: definition of a sampling strategy. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, n.  206, p. 117-122, 2003.

GERBA, C. P., ROSE, J. B., SINGH, S. N. Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. **Critical Reviews in Environmental Control**, Dublin OH, n. 15, p. 213-236, 1985.

GERBA, C. P., SMITH, J. E. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. **Journal of Environmental Quality**, Madison, n. 34, p.42–48, 2005.

GILLIN, F. D.; REINER, D. S.; GAUT, D. S.; DOUGLAS, H.; WUNDERLICH, S.; SAUCH, J. F. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.50, p.679-705, 1987.

GILLIN, F. D.; BOUCHER, S. E.; REINER, D. S. *Giardia lamblia* : the roles of bile, lactic acid, and pH in completion of the life cycle in vitro. **Experimental Parasitology**, Oxford, v.69, p.164-174, 1989.

GILLIN, F. D.; REINER, D. S. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto v.50, p.679-705, 1996.
GLASS, R. I.; BRESEE, J. S.; TURCIOS, R.; FISCHER, T. K.; PARASHAR, U. D.; STEELE, A. D. Rotavirus vaccines: targeting the developing world. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 192, p. 160-6, 2005.

GOFTI-LAROCHE, L.; GRATACAP-CAVALLIER, B.; GENOULAZ, O.; JORET, J. C.; HARTEMAN, P. H.; SEIGNEURIN, J. M.; ZMIROU, D. A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study). **Water Science and Technology**, Oxford, v. 43, p.39-48, 2001.

GONÇALVES, R. F.; LIMA, M. R. P.; PASSAMANI, F. R. F. Características físico-químicas e microbiológicas do lodo de lagoas. In: GONÇALVES, R. F. **Gerenciamento do lodo de lagoas de estabilização não mecanizadas.** Rio de Janeiro: ABES. 1999. p. 25-37.

GRIFFIN, D. W.; DONALDSON, K. A.; PAUL, J. H.; ROSE, J. B. Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clinical Microbiological** Review, Washington DC, v. 16, p. 129–143, 2003.

GRUNDLINGH, M. and CME de WET. The search for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in source water used for purification. **Water SA**, Grahamstown, n. 5, p. 33-36, 2004.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. I. Detection of anti-*Giardia lamblia* erum antibody among children of day care centers. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n.1, p.63-68, 2002.

GUY, R. A.; XIAO, C.; HORGEN, P. A. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of Giardia lamblia in stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 42, n. 7, p. 3317-3320, 2004.

HÄFLIGER, D.; HÜBNER, P. H.; LÜTHY, J. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 54, p. 123-126, 1999.

HACHICH, E. M.; SATO, M. I. Z.; GALVANI, A. T.; MENEGON, J. R. N.; MUCCI, J. L. N. Giardia and Cryptosporidium in source water of São Paulo State, Brazil. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 50, n. 1, p.239-245, 2004.

HELLER, L.; BASTOS, R. K. X.; VIEIRA, M. B. C. M.; BEVILACQUA, P. D.; BRITO, L. L. A.; MOTA, S. M. M.; OLIVEIRA, A. A.; MACHADO, P. M.; SALVADOR, D. P.; CARDOSO, A. B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* : circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 13, n. 2, p.79-92.

HERESI, G. P.; MURPHY, J. R.; CLEARY, T. G. Giardiasis. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, Philadelphia, v.11, n.3, p.189-195, 2000.

HOMAN, W. L.; MANK, T. G. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology**. International Journal for Parasitology**, New York, v.31, p.822-6, 2001.

HORWITZ, M. S. Adenoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**. (Ed.) Philadelphia: Fields, 3th ed. 1996. p. 2163.

HSU, B.M.; HUANG, C. Influence of ionic strength and pH on hidrophobicity and zeta potencial of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Oxford, p. 201-206, 2002.

HSU, B.M.; HUANG, C.; HSU, Y.; JIANG, G.; HSU, CL. Evaluation of two concentration methods for detection *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. **Water Research**, Oxford, n. 35, p. 419-424, 2001.

HUNTER, P. R.; THOMPSON, A. R. C. The zoonotic transmission of Giardia and Cryptosporidium.**International Journal for Parasitology**, New York, v.35, p.1181-1190, 2005.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). Büchen-osmond C (Org.). **Taxonomy and Index to Virus Classification and Nomenclature: Catalogue of viruses.** Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>. Acesso em: 02 ago. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Cidades**. Ribeirão Preto. 2011. Disponível em: www.Ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm.?1. Acesso em 28 de janeiro de 2011. 2011.

JIMÉNEZ CISNEROS, B.; BARRIOS PÉREZ, J. A.; MAYA RENDÓN, C. Class B biosolids production from wastewater sludge with high pathogenic content generated in an advanced primary treatment. **Water Science and Technology**, Oxford,v. 42, p. 103-110, 2000.

JOAN, B.; ROSE, I.; LINDA, J.; DICKSON, I.; SAMUEL, R. F.; ROBERT, P. CARNAHAN. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. **Water Research**, Oxford, *v.*30, n.1, p. 2785-2797, 1996.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology.** (Ed.) Fields., 3ª ed. 1996. p. 1657-1708.

KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: Knipe , D.M.; Howley , P.M.; Griff in, D.E. (editors). **Fields Virology**, 4th. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2001, p. 1787-1833.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health,** London, v. 5, n. 1, p. 1-38, 2007.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC. v. 68, p. 1033-1039, 2002.

KOCWA-HALUCH, R. Waterborne enteroviruses as a hazard for human health. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, v. 10, p. 485–487, 2001.

KÖNIG, A. Influência do tempo de decantação na concentração de ovos de helmintos em esgoto doméstico bruto. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA APLICADA AO SANEAMENTO,1, 2000, Vitória, ES. **Anais...** Vitória/ ES: UFES/FNS (Ministério da Saúde), 2000, p. 28 – 33.

KULDA, J.; NOHÝHOVÁ, E. *Giardia* in humans and animals. In: KREIER, J. P. **Academic Press.,** 1995. p. 225-442.

LADEIA, M. M; HELLER, L.; VIEIRA, M. B. C. M. Pesquisa de (oo)cistos de protozoários em amostras de águas de mananciais superficiais de Montes Claros/MG. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23. 2005. Campo Grande In: **Anais...**, Campo Grande, 2005. 9p.

LECHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.; LEE, R. G. Ocurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in surface water samples. **Applied Environmental** Microbiology, Washington DC, v. 57, p. 2610-2616, 1991.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 28, p. 371-409, 2002.

LEVINE, N. D.The protozoan phylum apicomplexa. **CRC Press, Inc.,** Boca Raton, Florida. 1988.

LEVINE, W. C.; WILLIAM, T. Waterborne Disease Outbreaks, 1986-1988. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.39 (SS-1), p.1-9, 1990.

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; FREITAS, R. B.; GABBAY, Y. B.; SHIRLEY, J. A.; BEARDS, G. M. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South American I ndian community. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 113, n. 6, p. 703-710, 1981.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; FREITAS, R. B.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; LOUREIRO, E. C. B. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. **Epidemiology and Infectious**, London, v. 102, n. 1, p.129-145, 1989.

LUNA, S.; REYES, L.; CHINCHILLA, M.; CATARINELLA, G. Presencia de ooquistes de Cryptosporidium spp. en aguas superficiales en Costa Rica. **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago, v. 57, n. 1-2, p. 63-65, 2002.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS M. S.; BLAIR, K. A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERKZAC, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B.; DAVIS, J. P. A Massive outbreak in Milwaukee of Cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 331, p. 161-167, 1994.

MADORE, M. S.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P.; ARROWD, M. J.; STERLING, C. R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. **Journal of Parasitology**, Lawrence,v. 73, n. 4, p.702-5, 1987.

MALTA, R. C. G.; WAIB, C. M.; BRANCO, JR., A. C. Investigação epidemiológica sobre enteroparasitos em crianças em idade pré-escolar no município de Lins (SP). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.31, n1, p.109-120, 2002.

MARQUES, E. A importância do estudo da presença e detecção de vírus em água e alimentos. In: IV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, 1991, Goiânia. **Anais...**Goiânia, 1991. 1p.

MARQUES, R. G. **Ocorrência de coliformes e Salmonella em águas de irrigação de hortaliças nos municípios de Goiânia e aparecida de Goiânia, Goiás.** Goiás: UFG. 2003. 103 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) -Universidade Federal de Goiás, Institutto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia.

MARTINS, S. S. **Adenovirus e Rotavirus como indicadores biológicos em águas residuarias de esgotos sanitários apos tratamento por processo anaeróbio e disposição controlada no solo.** 2006. 75 f.Dissertação (Mestrado) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MARTINS, S. S.; TONETTO, P. A.; STEFANUTTI, R.; GATTI, M. S. V.; CORAUCCI FILHO, B.; MEHNERT, D. U. Viral particles removal from urban wastewater by anaerobic process and overland flow system treatment. **Virus Reviews and Research,** Campinas, Abstract n. EV 1, p. 99-100, 2003.

MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; LEITE, J. P. G. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p.113-117, 2002.

McCUIM, R.M.; CLANCY, J.L. Modifications to Unites States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, n. 69, p. 267 – 274, 2003.

McCUIN, R. M.; CLANCY, J. L. Methods for the recovery, isolation and detection of Cryptosporidium oocysts in wastewater. **Journal of Microbiological Methods.** Washington DC. v. 63, p. 73-88, 2005.

MEDEIROS, M. L. B.; SOCCOL, V. T.; CASTRO, E. A.; TOLEDO, E. B. S.; BORGES, J. C.; PAULINO, R. C.; SILVA, S. M. C. P.; ANDRAUS, S. Aspectos sanitários. In: ANDREOLI, C. V.; LARA, A. I.; FERNANDES, F. **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções,** Curitiba. 1999. p. 120-179.

MEDEIROS, R. C. **Comparação da resistência de protozoários patogênicos – *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. – e de microrganismos indicadores à desinfecção seqüencial Cloro-Radiação Ultravioleta e Ozônio – Radiação Ultravioleta.** 2010. 210 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

MEHNERT, D. U. Reuso de efluente doméstico na agricultura e a contaminação ambiental entéricos humanos. **O Biológico**, São Paulo, v. 65, p. 19-21, 2003.

MEHNERT, D. U.; STEWIEN, K. E. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 59, p. 140-143, 1993.

MEHNERT, D. U.; QUEIROZ, A. P. S.; SANTOS, F. M.; CANDEIAS, J. M. G.; HÁRSI, C. M. Occurrence of human enteric viruses in sewage and surface waters in the city of São Paulo. **Virus Reviews and Research**, Campinas, v. 4, n. 27, 1999.
MEHNERT, D. U; QUEIROZ, A. P. S; PAULI, V; MONEZI, T. A.; HÁRSI, C. M. Virus: a new parameter for determination of water quality. **Virus Reviews and Research**, Campinas, v.6, p. 67, 2001.

METCALF, T. G.; MELNICK, J.L., ESTES, M.K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – a trip of over 50 years. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 461-487. 1995.

MONIS; T. *Cryptosporidium* and *Giardia-zoonos*es: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, Oxford, v.3, p.233-244, 2003.

MONTGOMERY, M. A.; ELIMELECH, M. Water and sanitation in developing countries: including health in the equation. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 41, p. 17-24, 2007.

MUJERIEGO, R.; ASANO, T. The role of advanced treatment in wastewater reclamation and reuse. **Water Science and Technology**, Oxford, v.4, n. 4-5, p. 1-9, 1999.

MUNIZ, R. C.; QUEIROZ, M. I. Relação entre desnutrição energético-protéica, vitamina A, e parasitoses em crianças vivendo em Brasília. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina** Tropical, Uberaba, v. 35, p. 133-142, 2002.

MULLER, A.P.B. D**etecção de oocistos de Cryptosporidium spp em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo**.1999. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

NASCIMENTO, N. O.; HELLER, L. Ciência, tecnologia e inovação na interface entre as áreas de recursos hídricos e saneamento. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 36-48, 2005.

NIME, F. A., BUREK, J. D.; PAGE, D. L. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan Cryptosporidium. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 70, p. 592-598, 1976.

NOGUEIRA, G.; NAKAMURA, C. V.; TOGNIM, M. C. B.; ABREU FILHO, B. A.; DIAS FILHO, B. P. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, p. 232-236, 2003.

OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C. Rotavírus: Aspectos clínicos e prevenção. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 75, n. 1, p. 91-102, 1999.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **"I Seminário Estadual de Vigilância Epidemiológica das Doenças deTransmissão Hídrica e Alimentar"–** Natal, RN, Dez/2005.

_____.***The world health report 2007:*** a safer future: global public health security in the 21st century. Genebra, Suécia, 2007.

_____**.Safer water, better health :** costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health. Genebra, 2008.

OLIVEIRA, L. H. S. Virologia Humana. Rio de Janeiro, Ed. Cultura Médica, Cap. 21: **Adenoviridae,** p. 232-240, 1994.

ORTEGA, Y. R.; ADAM, R. D. *Giardia*: Overview and update. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.25, p.545-50, 1997.

O'RYAN, M.; PÉREZ-SCHAEL, I.; MAMANI, N. Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 20, p. 685-693, 2001.

PARASHAR, U. D.; GIBSON, C. J.; BRESSE, J. S.;GLASS, R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 2, p. 304-306, 2006.

PARASHAR, U. D.; HUMMELMAN, E. G.; BRESEE, J. S.; MILLER, M. A.; GLASS, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, p. 565-72, 2003.

PAULI, V.; MONEZI, T. A.; MOSCA, X.; GARRAFA.; HÁRSI, C. M.; MEHNERT, D. U. Distribution of rotavirus G1-G5 genotypes in domestic effluent and creek in São Paulo city from 2000 to 2001. **Virus Reviews and Research**, Campinas, v.8, n. 2, p.93, 2003.

PAULINO, R. C.; CASTRO EA, THOMAZ-SOCCOL V. Tratamento anaeróbico de esgoto e sua eficiência na redução da viabilidade de ovos de helmintos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, n. 34 p. 421-428, 2001.

PAYMENT, P.; PLANTE, R.; CEJKA, P. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocyst at a large wastewater primary treatment facility. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 188-193, 2001.

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 of two distinct human transmission cycles. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 30, n. 4, p. 567-573, 1997.

PROGRAMA DE PESQUISAS EM SANEAMENTO BÁSICO (PROSAB). **"Uso Racional da Água em Edificações". Tecnologias de Segregação e Tratamento de Esgotos**

**Domésticos na Origem, Visando a Redução do Consumo de Água e da Infra-Estrutura de Coleta, Especialmente nas Periferias Urbanas**". Vitória: 1ª Edição, 2006.

QUEIROZ, A. P. S; SANTOS, F. M.; SASSAROLI, A.; HÁRSI, C. M.; MONEZI, T. A.; MEHNERT, D. U. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Applied Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 67, p. 4614-4618, 2001.

QUINTERO-BETANCOURT, W.; GENNACCARO, A.L.; SCOTT, T.M.; ROSE, B. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 69, n. 9, p. 5380-5388, 2003.

REINER, D. S.; MACCAFFERY, M.; GILLIN, F. D. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia.* **European Journal Cell Biology**, Stuttgart, v.53, p.142-153, 1990.

RIBEIRÃO PRETO. Prefeitura Municipal. Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto. DAERP. Disponível em: http://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/daerp/i04principal.asp?pagina=/daerp/I04institucional.htm Acesso em: 14 maio de 2009

RIVIERA, I. N. G.; MARTINS, M. T. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, v. 17, p. 115-36, 1996.

ROBERTSON, L.J.; CAMPBELL, A.T. e SMITH, H.V. Survival of *Crysptosporidium parvum* Oocysts under Various Environmental Pressures, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 58, n. 11, p. 3494-3500, 1992.

ROBERTSON, L.J.; GJERDE, B. Ocurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, p.1793-1798, 2001.

ROBERTSON, L.J.; PATON, C.A.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, P.G.; JACKSON, M.H.; GILMOUR, R.A.; BLACK, S.E.; STEVENSON, D. A., SMITH, H.V.Giardia Cysts and Crypto sporidium oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. **Water Research**, Oxford, v.34, n.8, p.2310-2322, 2000.

ROCHELLE, P. A.; DE LEON, R.; STEWART, M. H.; WOLFE, R .L. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, n. 63, p. 106-114, 1999.

RODGERS, M. R.; FLANIGAN, D. J.; JAKUBOWSKI, W. Identification of Algae which interfere with the detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts and a Method for alleviating this Interference. **Applied Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 61, p. 3759-3763, 1995.

ROSE, J. B., GERBA, C. P. Assessing potencial health risks from viruses and parasites in reclaimed water in Arizona and Florida, USA. **Water Science and Technology**, Oxford, n. 23, p. 2091-2098, 1991.

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

ROSE, J. B.; SLIFKO, T. R. *Giardia, Cryptosporidium*, and Cyclospora and their impact on foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n.9, p.1059-1070, 1999.

ROSEN, B.**Waterborne Pathogens in Agricultural Watersheds. US. Department of Agricultural, Natural Resources Conservation Service, Watershed Science.** Institute, School of Natural Resources, University of Vermont, Burlington, Vermont, 2000.

ROWE, W. P.; HUEBNER, R. J.; GILMORE, L. K.; PARROT, R. H.; WARD, T. G. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and** Medicine, Malden, v. 84, p. 570-573, 1953.

RUSIN, P.; ENRIQUEZ, C. E.; JOHNSON, D.; GERBA, C. P. Environmentally transmitted pathogens. In: _____.**Environmental microbiology**. San Diego: Academic Press. 2000. p.447-485.

SABRÁ, A. M. C. **Diarréias Agudas na Infância**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2ª Edição. 1982. n. 9, p. 45.

SANTAMARÍA, J., TORANZOS, G. A. Enteric pathogens and soil: a short review. **International Microbiology**, Barcelona, n. 6, p. 5-9, 2003.

SALGOT, M., CAMPOS, C., GALOFRÉ, B., TAPIAS, J. C. Biological control tools for wastewater reclamation and reuse. A critical review. **Water Science and Technology**, Oxford, n. 40, p. 195-201, 2001**.**

SANTOS, A. C. P.; KRESPKY, K. **Saneamento básico.** Gazeta Mercantil, 1998.

SANTOS, L. U. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em uma Estação de Tratamento de Esgoto: avaliação das eficiências do processo de lodo ativado na remoção e de desinfecção por luz ultravioleta na inativação desses patógenos.** 2007. 150 f. Tese (Doutorado). Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SCHWARTZBROD, L. Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sludge in agriculture and aquaculture. World Health Organization, **Bull WHO/EOS/95**,1995

SÃO PAULO. Decreto Estadual Nº 8468. Aprova o regulamento da Lei N. 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente. **Diário Oficial da União,** 8 de setembro de 1976.

SASSAROLI, A.; GARRAFA, P.; SANTOS, F. M.; HÁRSI, C. M.; VIEIRA, M. J.; MONEZI, T. A.; BARARDI, C. R. M.; MEHNERT, D. U. Detection of hepatitis A in wastewater samples in São Paulo city, Brazil. **Virus Reviews and Research**, Campinas, v. 5, n. HE 1, p.100, 2000.

SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: relation with pathogens and conventional indicator, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research**, Oxford, v. 40, p. 2463-2476, 2006.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. Giardia and Cryptosporidium join the Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.

SCHNACK, F. J.; FONTANA, L. M.; BARBOSA, P. R.; DA SILVA, L. S. M.; BAILLARGEON, C. M. M.; BARICHELLO, T.; PÓVOA, M. M.; CAVASINI, C. E.; MACHADO, R. L. D.. Enteropatógenos associados com diarréia infantil (<5 anos de idade)

em amostras da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, 2003.

SCHUPP, D. G.; JANUSCHKA, M. M.; SHERLOCK, L. A. F.; STIBBS, H. H.; MEYER,E. A.; BEMRICK, W. J.;ERLANDSEN, S. L.. Production of viable Giardia cysts in vitro: determination b y fluorogenic dye staining excystation, and animal infectivity in the mouse and mongolian gerbil. **Gastroenterology**, Baltimore, v.95, p.1-10, 1988.

SCHVOERER, E.; VENTURA, M.; DUBOS, O.; CAZAUX, G.; SERCEAU, R.; GOURNIER, N.; DUBOIS, V.; CAMINADE, P.; FLEURY, H. J. A.; LAFON, M. E. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, p. 179-186, 2001.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Diarréia e rotavírus. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n.6, p. 844-845, 2004.

SERVIÇOS AMBIENTAIS DE RIBEIRÃO PRETO. AMBIENT.-. Estação de Tratamento de Esgoto Ribeirão Preto. Manual Informativo. Serviços Ambientais de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. Disponível online em: www.ambientbr.com.br. Acesso em: 08 de junho de 2009.

SHENK, T. Adenoviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds). **Fields Virology.** 3rd. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, v. 2, p. 2111-21, 1996.

SILVA, M. L. R.; NAVECA, F. G.; CARVALHO, I. P. Epidemiological aspects of rotavirus infections in Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 5, n.4, p. 215-222, 2001.

SIMONS III, O.D.; SOBSEY, M. D.; SCHAEFER III, F. W.; FRANCY, D. S.; NALLY, R. A.; HEANEY, C. D. Evaluation of USEPA Method 1622 for detection of Cryptosporidium oocysts in stream waters. **Journal of the American Water Works Association**,Denver v. 93, p. 78 – 87**,** 2001.

SMITH, P.D. Pathophysiology and immunology of giardiasis. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v.36, p.295-307, 1985.

SOCCOL, V. T.; PAULINO, R. C.; CASTRO, E. A. Metodologia de análise parasitológica em lodo de esgoto. In: ANDREOLI, C. V.; BONNET, B. R. P. **Manual de métodos para análises microbiológicas e parasitológicas em reciclagem agrícola de lodo de esgoto.** Curitiba. 1998. p. 27-35.

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

SPERLING, V. M. (ed.). **Lodos ativados: princípios do tratamento biológico de águas residuárias.** Belo Horizonte: UFMG. 1997. p. 416.

STATES, S.; STADTERMAN, K.; AMMON, L.; VOGEL, P.; BALDIZAR, J.; WRIGHT, D.; CONLEY, L.; SYKORA, J. Protozoa in river water: sources, occurrence and treatment. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 89, p. 74-83, 1997.

STOTT, R.; MAY, E.; MARA, D. D. Parasite removal by natural wastewater treatment systems: performance of waste stabilization ponds and constructed wetlands. **Water Science and Technology**, Oxford, n. 48, p. 97-104, 2003.

STRANDRIDGE, J. *E. coli* as a public health indicator of drinking water quality. **Journal of American Water Works Association**, Denver, v.100, n. 2, p.65-75, 2008.

SYKORA, JAN L; SORBER, CHARLES A; JAKUBOWSKI, WALTER; CASSON, LEONARD W; GAVAGHAN, PATRICK D; SHAPIRO, MAURICE A; SCHOTT, M. JAMES. Distribution of *Giardia* cysts wastewater. **Water Science and Technology,** Oxford, v.24, n.2, p.187-192, 1991.

THOMPSON, R. C. A.; REYNOLDSON, J. A.; MENDIS, A. H. W. Giardia and giardiasis. **Advances in Parasitology**, London, v.32, p.72-160, 1993.

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

THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of giárdia and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.126, p.15-35, 2004.

THOMPSON, R. C. A.; HOPKINS, R. M.; HOMAN, W. L. Nomenclature and genetic groupins of Giardia infecting mammals. **Parasitology Today**, Cambridge, v.16, n.5, p.210-213, 2000.

THOMPSON, R. C. A.; MONIS, P. T. Variation in Giardia: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, London, v. 58, p. 69–137, 2004.

THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY. The public healt and clinical significance of Giardia and Cryptosporidium in domestic animals. **Veterinary Journal**, London, v. 177, n.1, p. 18-25, 2007.

TOLBOOM, J. J. M.; KABIN, T.; MOLATSELL, P.; ANDERSON, J.; AREUS, T.; FERNANDES, J.. Lactose malabsorption and giardisis in Basotho school children. **Acta Paediatrica Scandinavica**, Stockholm, v. 76, p. 60-65, 1987.

TONANI, K. A. A.; JULIÃO, F. C.; TREVILATO, T. M. B.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; BOCIO, A.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Behavior of Metals, Pathogen Parasites, and Indicator Bacteria in Sewage Effluents During Biological Treatment by Activated Sludge. **Biological Trace Element Research**, Clifton, 2010. DOI 10.1007/s12011-010-8906-8.

TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundread-year retrospective on cryptosporidiosis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.24, n.4, p.184-189, 2008.

TYAGI, P.; EDWARDS, D.R.; COYNE, M. S. Use of sterol and bile acid biomarkers to identify domesticated animal sources of fecal pollution. **Chemosphere**. Geneva. v. 69, p. 1617-1624, 2008.

FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA (UNICEF).Disponível em: WWW.unicef.org/brazil. Acesso: maio de 2008.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Office of Water. Washington DC. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA.** EPA-821-R-01-025, 2005.

_____. **Method 1622: Cryptosporidium in Water by Filtration/IMS/FA**. Estados Unidos, 1999a.

_____. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual**. New York, USA, 1999b.

_____. Office of Water. Washington DC. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA.** EPA-821-R-01-025, 2001.

UPCROFT, P.; UPCROFT, J. A. Drug resistance and Giardia. **Parasitology Today**, Cambridge, v.9, p.187-190, 1993.

UPCROFT, P.; UPCROFT, J. A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v.14, p.150-164, 2001.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. (Ed.). **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** California: Academic Press, 2000.

VIEIRA, R. H. S. F.; CATTER, K. M.; SAMPAIO, S. S.; RODRIGUES, D. P.; THEOPHILO, G. N. D; FONTELES-FILHO, A. A. The stormwater drain system as a pollution vector of the seashore in Fortaleza (Ceará State, Brazil). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 294-298, 2002.

WARNECKE, M.; WEIR, C. and VESEY, G. Evaluation of an internal positive control for *Cryptosporidium* and *Giardia* testing in water samples. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 244-248, 2003.

WEN, Q.; TUTUKA, C.; KEEGAN, A., JIN, B. Fate of pathogenic microorganisms and indicators in secondary activated sludge wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Management**, London,v. 90, p.1442-1447, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report on infectious dieases removing obstacles to healthy development.** Geneva, 1999.

WIKIPÉDIA. **Mapa da localização da cidade de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo, 2006.** Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Ribeir%C3%A3o_Preto&oldid=5168690>. Acesso em 28 março de 2010.

WIKIPÉDIA. **Adenovirus.** Disponivel em : http://pt.wikipedia.org/wiki/Adenov%C3%ADrus Acesso em : 13 fevereiro de 2011.

WYN-JONES, A. P.; SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 91, p. 945-962, 2001.

ZU, S. X.; LI, J. F.; BARRETT, L. J.; FAYER, R.; SHU, S. Y.; McAULIFFE, J. F.; ROCHE, J. K.; GUERRANT, R. Seroepidemiologic study of *Cryptosporidium* infection in children from rural communities of Anhui, China and Fortaleza, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**,Baltimore, v.51, n.1, p.1-10, 1994.

# *Apêndices*

**Apêndice A.** Teste estatístico realizado na análise de cistos de *Giardia* spp.

| **Parameter** | |
|---|---|
| Table Analyzed | **Giardia** |
| Column A | Esgoto Bruto |
| vs | vs |
| Column B | Esgoto Tratado |
| | |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0213 |
| P value summary | * |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=2.856 df=8 |
| | |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 999.0 ± 348.9 N=5 |
| Mean ± SEM of column B | 2.560 ± 0.5521 N=5 |
| Difference between means | 996.4 ± 348.9 |
| 95% confidence interval | 191.8 to 1801 |
| R squared | 0,5048 |
| | |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 399400, 4, 4 |
| P value | P<0.0001 |
| P value summary | *** |
| Are variances significantly different? | Yes |

**Apêndice B.** Teste estatístico realizado na análise de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

| **Parameter** | |
|---|---|
| Table Analyzed | **Cryptosporidium** |
| Column A | Esgoto Bruto |
| vs | vs |
| Column B | Esgoto Tratado |
| | |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,1221 |
| P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1.729 df=8 |
| | |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 9.880 ± 5.422 N=5 |
| Mean ± SEM of column B | 0.5000 ± 0.1924 N=5 |
| Difference between means | 9.380 ± 5.425 |
| 95% confidence interval | -3.130 to 21.89 |
| R squared | 0,2720 |
| | |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 794.4, 4, 4 |
| P value | P<0.0001 |
| P value summary | *** |
| Are variances significantly different? | Yes |

**Apêndice C.** Resultados obtidos no Controle de Qualidade – Easy Seed

| Spike | |
|---|---|
| SPIKE 01 | 38 |
| SPIKE 02 | 19 |
| SPIKE 03 | 13 |
| SPIKE 04 | 40 |
| SPIKE 05 | 33 |
| **MÉDIA** | 28,60 |
| **DESVIO PADRÃO** | 11,97 |

**Apêndice D.** Resultados obtidos na porcentagem de recuperação durante as análises de esgoto bruto e tratado

| Color Seed | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Amostra** | **Esgoto Bruto *Cryptosporidium* ssp.** | **Esgoto Bruto *Giardia* ssp.** | **Esgoto Tratado *Cryptosporidium* ssp.** | **Esgoto Tratado *Giardia* ssp.** |
| **1** | 0 | 41 | 0 | 1 |
| **2** | 16 | 11 | 9 | 37 |
| **3** | 0 | 4 | 6 | 6 |
| **4** | 20 | 38 | 10 | 25 |
| **Média** | 9 | 23,5 | 6,25 | 17,25 |
| **D/P** | 10,52 | 18,73 | 4,5 | 16,74 |

**Apêndice E:** Teste estatístico realizado nas amostras de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de esgoto bruto e tratado

**Table Analyzed**

| | |
|---|---|
| Column C | Esgoto Bruto (NMP/100mL) |
| VS | vs |
| Column D | Esgoto Tratado (NMP/100mL) |

| | |
|---|---|
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0019 |
| P value summary | ** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, DF | t=3.961 df=12 |

| | |
|---|---|
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column C | 23840000 ± 5944000 N=7 |
| Mean ± SEM of column D | 291100 ± 108300 N=7 |
| Difference between means | 23550000 ± 5945000 |
| 95% confidence interval | 10600000 to 36510000 |
| R squared | 0,5667 |

| | |
|---|---|
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 3015, 6, 6 |
| P value | P<0.0001 |
| P value summary | *** |
| Are variances significantly different? | Yes |

**Apêndice F.** Correlação entre a concentração de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. com a concentração de coliformes totais e termotolerantes

**Esgoto bruto**

| | **Coliformes Totais** | **Cryptosporidium** | **Giardia** |
|---|---|---|---|
| **Coliformes Totais** | | 0,4943408 | 0,7363752 |
| **Cryptosporidium** | 0,4943408 | | 0,6626868 |
| **Giardia** | 0,7363752 | 0,6626868 | |

| | **Coliformes Termotolerantes** | **Cryptosporidium** | **Giardia** |
|---|---|---|---|
| **Coliformes Termotolerantes** | | 0,9611342 | 0,7646012 |
| **Cryptosporidium** | 0,9611342 | | 0,6626868 |
| **Giardia** | 0,7646012 | 0,6626868 | |

**Esgoto Tratado**

| | **Coliformes Totais** | **Cryptosporidium** | **Giardia** |
|---|---|---|---|
| **Coliformes Totais** | | 0,2078848 | 0,1755192 |
| **Cryptosporidium** | 0,2078848 | | 0,4811993 |
| **Giardia** | 0,1755192 | 0,4811993 | |

| | **Coliformes Termotolerantes** | **Cryptosporidium** | **Giardia** |
|---|---|---|---|
| **Coliformes Termotolerantes** | | 0,9076504 | 0,7250675 |
| **Cryptosporidium** | 0,9076504 | | 0,4811993 |
| **Giardia** | 0,7250675 | 0,4811993 | |

# *Anexo*

**Anexo A.** Autorização da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo para a realização das análises no Laboratório de Microbiologia.

CETESB

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SAO PAULO

**Departamento de Análises Ambientais**

Professora Doutora
***Susana Inês Segura Muñoz***
Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental
Departamento de Enfermagem Materno Infantil e Saúde Pública
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo
Avenida Bandeirantes, 3900 Campus Universitário
14040-902 Ribeirão Preto SP

**N/CÓD.:** 004/2010/TL
**DATA:** 12/01/2010

Prezada Senhora,

Com relação à sua solicitação de realização da parte prática do projeto de doutorado intitulado "Implantação de técnicas para avaliação de *Cryptosporidium* spp, *Giardia* spp e bactérias do grupo coliformes em esgoto de lodo" na CETESB, informamos o nosso aceite na execução do mesmo pela aluna do curso de Pós-Graduação em Enfermagem em Saúde Pública Karina Aparecida de Abreu Tonani.

Para maiores informações e agendamento solicitamos contatar a gerente do Setor de Microbiologia e Parasitologia, Dra. *Elayse Hachich*, Fone 11 3133-3536, responsável pelo laboratório onde serão desenvolvidos os trabalhos solicitados.

Atenciosamente,

Dra. ***Maria Inês Zanoli Sato***
Gerente
Reg. 01.2443-1

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – Sede: Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 – CEP 05459-900 – São Paulo – SP– Tel.: (0xx11) 3133 3000
Fax: (0xx11) 3133 – 3402 – Telex.: 1183053 - C.N.P.J. n.° 43 776.491/0001 – 70 – Insc. Est. n.° 109.091.375-118 – Insc. Munic. n.° 8.030.313-7 - Site.: www.cetesb.sp.gov.br

Cód.: S010V04 01/08/2009