**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA**

**Ocorrência e caracterização de *Giardia* e *Cryptosporidium*
em águas captadas para abastecimento público no
município de Cajamar-SP e avaliação do risco**

Marcel Oliveira Bataiero

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Saúde Ambiental

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza Pepe Razzolini

SÃO PAULO

2016

Ocorrência e caracterização de *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas captadas para abastecimento público no município de Cajamar-SP e avaliação do risco

Marcel Oliveira Bataiero

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Saúde Ambiental

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza Pepe Razzolini

Versão Original

SÃO PAULO

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

DEDICATÓRIA

Aos meus ancestrais, bravos desbravadores deste Brasil, humildes nas condições materiais, mas orgulhosos no espírito e na honra.

Aos meus queridos pais, Alcides e Maria da Luz, cujos esforços incansáveis para oferecer as melhores possibilidades de vida a seus filhos, determinaram, não só a concretização deste trabalho, mas também o desgaste de seus próprios corpos.

Ao meu irmão, Rafael, sangue do meu sangue: não escolheria qualquer outra pessoa para partilhar do laço que nos une.

O amor que sinto por vocês é a força motriz por trás de todas as minhas ações.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que tivesse a saúde e os recursos necessários para ser um instrumento da Sua vontade.

À Professora Maria Tereza Pepe Razzolini, por me acolher nos momentos em que mais precisava e por me instigar a superar minhas próprias limitações. Para sempre serei grato por apontar os caminhos e se dispor a trilhá-los comigo, tornando-se mais do que uma orientadora acadêmica: uma verdadeira parceira para todas as horas e situações.

Às professoras Adelaide Cassia Nardocci e Maria Inês Zanolli Sato e ao professor Marcelo de Souza Lauretto, pela enorme capacidade de provocar reflexões e estimular o desenvolvimento do conhecimento, assim como pelos preciosos ensinamentos, tão necessários à conclusão deste estudo.

À Dra. Ronalda Silva de Araújo, pela paciência e apoio incondicional (e imprescindível) em todos os momentos, desde o primeiro dia em que discutimos este projeto.

Ao Luís Sérgio Ozório Valentim, meu amigo e diretor (nesta ordem), não apenas por ser parte imprescindível durante a realização deste estudo, mas por ter me propiciado as melhores condições imagináveis para concluí-lo.

Aos amigos “vigilantes ambientais”, Arnaldo Mauro Elmec, Cristiane Maria Tranquillini Rezende, Francisco Carlos de Campos e Rubens José Mário Junior, por ensinarem através do exemplo, pelo apoio e incentivo constantes.

A todos os profissionais da Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do CVE, da Vigilância Epidemiológica e da Estação de Tratamento de Água de Cajamar-SP e do departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública, pela amizade, carinho e confiança.

Peço a Deus que este trabalho esteja à sua altura.

***Existir é uma dádiva,
viver é uma conquista.***

***Todo o aprendizado da vida
objetiva passar do risco à segurança.***

Bataiero, MO. **Ocorrência e caracterização de *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas captadas para abastecimento público no município de Cajamar-SP e avaliação do risco.** [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2016.

RESUMO

Introdução: O risco à saúde humana ocasionado pela contaminação biológica de águas captadas para abastecimento público é realçado pela ocorrência de surtos de doenças associadas aos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*, que possuem baixas doses infecciosas e alta capacidade de sobrevivência no ambiente, além de serem capazes de resistir ao processo tradicional de desinfecção da água (cloração). Partindo-se da hipótese de que há um risco elevado de infecção por estes protozoários pela ingestão de água tratada por métodos convencionais e que fazem uso de mananciais superficiais impactados por contaminação biológica, resultando num possível incremento da incidência de diarreias, este estudo se propôs a verificar a ocorrência destes protozoários em águas captadas para abastecimento público no município de Cajamar-SP, caracterizar sua patogenicidade e avaliar o risco associado ao seu consumo através da água tratada. **Métodos:** Foram coletadas 48 amostras do ribeirão dos Cristais no ponto de captação da estação de tratamento de água, semanalmente, durante 12 meses (de 16/05/2013 a 21/05/2014). A detecção e a análise da concentração dos protozoários foram realizadas de acordo com Método 1623.1 da *United States Environmental Protection Agency* e a extração e caracterização dos espécies/genótipos de *Giardia* e *Cryptosporidium* foi realizada através metodologias moleculares e seqüenciamento. O risco de infecção pela ingestão de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* presentes na água tratada foi calculado usando a ferramenta da Avaliação Quantitativa do Risco Microbiológico, a partir dos dados de concentração dos patógenos obtidos pelo Método 1623.1, eficiência de remoção dos (oo)cistos durante o processo convencional de tratamento da água, modelo dose-resposta e taxa de ingestão diária de água para indivíduos menores de 5 anos e maiores de 21 anos. **Resultados:** Cistos de *Giardia* foram detectados em 83,3% das amostras (40/48), com concentrações variando desde o limite de detecção (<0,1) até 8,6 cistos/L.

Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em 37,5% das amostras (18/48), com concentrações variando desde o limite de detecção ($<0,1$) até 2 oocistos/L. As espécies/genótipos encontrados (*Giardia intestinalis* A e B e *Cryptosporidium parvum* e *hominis*) são característicos de contaminação antrópica e são frequentemente identificados em estudos epidemiológicos como responsáveis por surtos. A estimativa do risco anual de infecção por *Giardia* foi de $3,3 \times 10^{-3}$ (IC95% $4,6 \times 10^{-3}$) para crianças e de $11,5 \times 10^{-3}$ (IC95% $13,3 \times 10^{-3}$) para adultos, enquanto o risco por *Cryptosporidium* foi de $1,1 \times 10^{-3}$ (IC95% $1,7 \times 10^{-3}$) para crianças e de $3,9 \times 10^{-3}$ (IC95% $5,0 \times 10^{-3}$) para adultos. O incremento da incidência de diarreias foi observado no cenário de estudo após um acidente que resultou em transbordamento de esgotos não tratados no manancial, coincidindo com o aumento na detecção de (oo)cistos. **Conclusão:** Os resultados evidenciaram que a vulnerabilidade do ribeirão dos Cristais a contaminações biológicas pode culminar em um risco elevado de infecção e adoecimento por *Giardia* e *Cryptosporidium* através da ingestão de água tratada. Portanto, o caso é preocupante, tanto do ponto de vista do tratamento e abastecimento de água potável, quanto da degradação e contaminação do manancial, evidenciando a necessidade de se estabelecer medidas de intervenção direcionadas a promover a qualidade da água e garantir sua segurança.

Descritores: Água de Consumo Humano, *Giardia*, *Cryptosporidium*, Genotipagem, Avaliação Quantitativa do Risco Microbiológico

Bataiero, MO. **Occurrence and characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water collected for public supply in the municipality of Cajamar-SP and risk assessment.** [Doctoral thesis]. Sao Paulo: School of Public Health, University of São Paulo; 2016.

ABSTRACT

Introduction: The risk to human health caused by biological contamination of source water from public water supply is highlighted by the occurrence of outbreaks associated with the protozoa *Giardia* and *Cryptosporidium*, which have low infectious doses and high capacity of survival in the environment, besides being capable of withstanding traditional process for water disinfection (chlorination). Considering that there is a high risk of infection by these protozoa through drinking water treated with conventional methods uptaken from surface waters impacted by biological contamination, resulting in a possible increase in the incidence of diarrhea, this study aimed to verify the occurrence of these protozoa in waters collected for public supply in Cajamar-SP, characterize their pathogenicity and evaluate the risk associated with its consumption. **Methods:** Forty eight samples were collected in ribeirão dos Cristais, at uptake point of the water treatment plant, weekly, for 12 months (from 05/16/2013 to 05/21/2014). The detection and quantification of protozoa were carried out according to the United States Environmental Protection Agency Method 1623.1, and the extraction and characterization of species/genotypes of *Giardia* and *Cryptosporidium* were performed through molecular methods and sequencing. The risk of infection by ingestion of *Giardia* and *Cryptosporidium* (oo)cysts present in the treated water were calculated using the Quantitative Microbial Risk Assessment tool, based on the concentration data of pathogens obtained by the Method 1623.1, removal efficiency of (oo) cysts in the conventional process of water treatment, dose-response model and rate of daily water intake for individuals under the age of 5 years and over 21 years. **Results:** *Giardia* cysts were detected in 83.3% of the samples (40/48), with concentrations ranging from the detection limit (<0.1) to 8.6 cysts/L. *Cryptosporidium* oocysts were detected in 37.5% of the samples (18/48), with concentrations ranging from the detection limit (<0.1) to 2 oocysts/L. The species/genotypes found (*Giardia intestinalis* A and B and *Cryptosporidium parvum*

and *hominis*) are characteristic of anthropogenic contamination and are often identified in epidemiological studies as being responsible for outbreaks. The estimated annual risk of infection by *Giardia* was $3,3 \times 10^{-3}$ (95% CI $4,6 \times 10^{-3}$) for children and $11,5 \times 10^{-3}$ (95% CI $13,3 \times 10^{-3}$) for adults, while the risk for *Cryptosporidium* was $1,1 \times 10^{-3}$ (95% CI $1,7 \times 10^{-3}$) for children and $3,9 \times 10^{-3}$ (95% CI $5,0 \times 10^{-3}$) for adults. The increase in the incidence of diarrhea was observed in the study scenario after an accident that resulted in an overflow of untreated sewage that reached the reservoir, coinciding with an increase in the detection of the (oo)cysts.

Conclusion: The results showed that the vulnerability of the ribeirão dos Cristais to biological contamination may result in a high risk of infection and illness by *Giardia* and *Cryptosporidium* through the drinking water consumption. Therefore, the case is of concern, both from the point of view of the treatment and supply of drinking water, as well as to the degradation and contamination of the water source, highlighting the need to establish intervention measures aimed at promoting water quality and ensure its safety.

Keywords: Drinking Water Consumption, *Giardia*, *Cryptosporidium*, Genotyping, Quantitative Microbiological Risk Assessment

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	16
1.1 – CARACTERIZAÇÃO DO PROTOZOÁRIO <i>GIARDIA</i>	20
1.2 – CARACTERIZAÇÃO DO PROTOZOÁRIO <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	24
1.3 – OCORRÊNCIA DE <i>GIARDIA</i> E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> NO AMBIENTE AQUÁTICO	28
1.4 – EPIDEMIOLOGIA DA GIARDÍASE E DA CRIPTOSPORIDIOSE	34
1.5 – REMOÇÃO DOS PROTOZOÁRIOS <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> E <i>GIARDIA</i> EM SISTEMAS DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA	43
1.6 – VIGILÂNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA E LEGISLAÇÕES RELACIONADAS A <i>GIARDIA</i> E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	47
1.7 – AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE RISCO MICROBIOLÓGICO E SEGURANÇA DA ÁGUA	51
2 - OBJETIVOS	58
3 - METODOLOGIA	60
3.1 – CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	61
3.2 – AMOSTRAGEM	66
3.3 – DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS	68
3.3.1 – DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>GIARDIA</i> E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> PELO MÉTODO EPA 1623.1	68
3.3.2 – EXTRAÇÃO DE DNA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>GIARDIA</i> E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	68
3.3.2.1 – EXTRAÇÃO DE DNA DE <i>GIARDIA</i> E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	68
3.3.2.2 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>GIARDIA</i>	68
3.3.2.3 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	68
3.3.3 – QUANTIFICAÇÃO DE CTT E <i>E. COLI</i>	69
3.4 – ESTIMATIVA DE RISCO	69
3.5 – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DE DDA NA ÁREA DE ESTUDO	73
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1 – OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE CISTOS DE <i>GIARDIA</i> E OOCISTOS DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> EM ÁGUAS CAPTADAS PARA ABASTECIMENTO PÚBLICO NO MUNICÍPIO DE CAJAMAR-SP	75
4.2 – RISCO DE INFECÇÃO POR <i>GIARDIA</i> E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> NA ÁGUA DISTRIBUÍDA E POSSÍVEIS CORRELAÇÕES COM A INCIDÊNCIA DE DDA	87
5 - CONCLUSÃO	101
6 - REFERÊNCIAS	104
7 - ANEXOS	133
8 - CURRÍCULO LATTES MARCEL OLIVEIRA BATAIERO	147
9 - CURRÍCULO LATTES MARIA TEREZA PEPE RAZZOLINI	148

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida da <i>Giardia</i> .	23
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>Cryptosporidium</i>	26
Figura 3 – Diagrama do processo metodológico da avaliação quantitativa de risco microbiológico.	54
Figura 4 – Etapas para o desenvolvimento de um Plano de Segurança da Água.	56
Figura 5 – Região Metropolitana de São Paulo e localização da área de estudo.	61
Figura 6 – Médias mensais de precipitação e temperaturas máximas e mínimas para o município de Cajamar-SP.	63
Figura 7 – Localização do ribeirão dos Cristais na Região Metropolitana de São Paulo.	65
Figura 8 – Localização da ETA Cristais e sua captação.	65
Figura 9 – Panorama do ponto de captação da ETA ribeirão dos Cristais e seu entorno.	67
Figura 10 – Diagrama de processo metodológico empregado neste trabalho.	70
Figura 11 – Comparação visual da turbidez no ponto de captação de água para abastecimento público do município de Cajamar-SP, 2013-2014.	79
Figura 12 – Relação filogenética baseada no método de <i>Neighbor-Joining</i> utilizando seqüências do gene <i>18S rRNA</i> de diferentes espécies de <i>Cryptosporidium</i> disponíveis no banco de dados <i>Genbank</i> e os valores de bootstrap após 1000 réplicas. As demais amostras identificadas com número seguido de R dos Cristais são amostras positivas oriundas deste estudo.	85
Figura 13 – Distribuições empíricas (linhas pontilhadas) e ajustadas (linha contínua) das famílias Triangular, Lognormal, Gama e Weibull para as concentrações de cistos de <i>Giardia</i> em amostras de água do ribeirão dos Cristais.	88
Figura 14 – Distribuições empíricas (linhas pontilhadas) e ajustadas (linha contínua) das famílias Triangular, Lognormal, Gama e Weibull para as concentrações de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em amostras de água do ribeirão dos Cristais.	88
Figura 15 – Distribuição do risco anual de infecção ($\log_{10}$) por <i>Giardia</i> em adultos (maiores de 21 anos) e crianças (menores de 5 anos) por ingestão direta de água tratada no município de Cajamar-SP, 2013-2014.	89
Figura 16 – Distribuição do risco anual de infecção ($\log_{10}$) por <i>Cryptosporidium</i> em adultos (maiores de 21 anos) e crianças (menores de 5 anos) por ingestão direta de água tratada no município de Cajamar-SP, 2013-2014.	89
Figura 17 – Sensibilidade da concentração do patógeno, taxa de ingestão de água e parâmetros dose-resposta sobre o risco anual de infecção <i>Giardia</i> no município de Cajamar-SP, 2013-2014.	92
Figura 18 – Sensibilidade da concentração do patógeno, taxa de ingestão de água e parâmetros dose-resposta sobre o risco anual de infecção <i>Cryptosporidium</i> no município de Cajamar-SP, 2013-2014.	92
Figura 19 – Número de casos de DDA por semana epidemiológica no município de Cajamar-SP, 2011-2015.	95
Figura 20 – Localização da ETE da Penitenciária Mário de Moura de Albuquerque.	97
Figura 21 – Alinhamento do par de iniciadores utilizados para a amplificação do genótipo A de <i>Giardia intestinalis</i> frente às seqüências dos diferentes genótipos disponíveis no banco de dados <i>Genbank</i> . O iniciador desenhado neste estudo está sublinhado.	142

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies de <i>Giardia</i> reconhecidas e seus principais hospedeiros.	21
Quadro 2 – Espécies de <i>Cryptosporidium</i> reconhecidas e seus principais hospedeiros.	25
Quadro 3 – Modelo exponencial de dose-resposta para <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> .	71
Quadro 4 – Média, mediana e IC95% de risco anual de infecção por <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> em adultos (maiores de 21 anos) e crianças (menores de 5 anos) pela ingestão de água no município de Cajamar-SP, 2013-2014.	90
Quadro 5 – Lista de iniciadores que foram empregados para amplificação e detecção de <i>Giardia intestinalis</i> genótipos A e B.	140
Quadro 6 – Descrição e sequências dos iniciadores empregados para amplificação do fragmento 18S rRNA de <i>Cryptosporidium</i> .	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura Etária da População na área de estudo, Cajamar-SP, 1991, 2000 e 2010.	62
Tabela 2 – Concentrações de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em amostras de água bruta, CTT, <i>E. coli</i> , média de turbidez e ocorrência de chuva nas 24 horas anteriores ao dia da coleta no município de Cajamar-SP, 2013-2014.	76
Tabela 3 – Resultados de PCR em tempo real para a pesquisa de genótipos A e B de <i>Giardia intestinalis</i> nas amostras de água do ribeirão dos Cristais, 2013-2014.	83
Tabela 4 – Resultados de genotipagem de <i>Cryptosporidium</i> por meio de Nested PCR e sequenciamento nas amostras de água do ribeirão dos Cristais, 2013-2014.	84
Tabela 5 – Incidência de DDA por mil habitantes e por etária em Cajamar-SP, 2011-2015.	95
Tabela 6 – Concentrações de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em amostras de água bruta e total de casos de DDA na SE seguinte no município de Cajamar-SP, 2013-2014.	96

LISTA DE SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AQRM	Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico
ARM	Avaliação de Risco Microbiológico
BLAST	<i>Basic Local Alignment and Search Tool</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CTT	Coliformes Termotolerantes
DALY	<i>Disability Adjusted Life Years</i>
DDA	Doenças Diarréicas Agudas
DIC	Microscopia Interferencial e Diferencial
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EPF	Exame Parasitológico de Fezes
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
LBA	Laboratório de Biologia Ambiental
LD	Limite de Detecção
MDDA	Monitoramento das Doenças Diarréicas Agudas
MS	Ministério da Saúde
NARA	Núcleo de Pesquisas em Avaliação de Riscos Ambientais
NMP	Número Mais Provável
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pa	Risco anual de infecção
PBST	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pi	Risco de infecção diário
PROÁGUA	Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano do Estado de São Paulo
PSA	Plano de Segurança da Água
RMSP	Região Metropolitana de São Paulo
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SE	Semana Epidemiológica
SEADE	Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados
SIVEP	Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica
SUS	Sistema Único de Saúde
TI	Taxa de Ingestão
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
uT	Unidades de Turbidez

1 - INTRODUÇÃO

O risco à saúde humana associado ao consumo de águas contaminadas torna-se, cada vez mais, foco de preocupação entre atores das áreas ambientais e de saúde, em razão do crescente número de surtos de doenças cujo agente etiológico foi transmitido em razão de falhas nos sistemas de abastecimento público, comprometendo sua potabilidade (BRASIL, 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), conhecer os fatores que influenciam a qualidade da água captada para consumo humano¹ é imprescindível à saúde pública², pois as condições do manancial determinam os esforços do tratamento para tornar potável a água bruta e, conseqüentemente, diminuir o risco à saúde associado ao seu consumo (WHO, 2011).

De maneira geral, a qualidade da água dos mananciais é influenciada tanto por fatores naturais, como a fauna e flora, o clima, a topografia e a geologia, quanto por aqueles derivados do uso humano, como as fontes de contaminação pontuais - descargas residuais domiciliares e industriais - e as fontes difusas - escoamento urbano, agrícola e criação de animais (WHO, 2011).

Aproximadamente um bilhão de pessoas (cerca de um sexto da população mundial) não tem acesso à água com qualidade adequada (UNEP, 2010) e, segundo a OMS, quase dois milhões, principalmente crianças, morrem anualmente por causa de doenças gastrointestinais propagadas por água contaminada, principalmente, pelo lançamento de esgotos não tratados ou tratados inadequadamente (WHO, 2011).

No Brasil, o desenvolvimento desordenado das cidades, sem infra-estrutura em saneamento, tem ocasionado elevados índices de contaminação dos recursos hídricos, provocando danos ambientais e impondo a necessidade de abordagem conjunta de variáveis ambientais, sanitárias e de saneamento (SNIS, 2011).

De acordo com dados da última edição do Atlas de Saneamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), embora mais de 90% dos municípios brasileiros tenham o serviço de abastecimento por rede geral de água, 30,5% deles lançam esgoto não tratado em rios, lagos ou lagoas, utilizando estes corpos receptores para vários usos a jusante, inclusive o abastecimento (IBGE, 2011).

¹ A água para consumo humano é definida como toda água destinada a ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, conforme conceito presente no artigo 5º da Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde, que dispõe sobre a potabilidade da água para consumo humano (BRASIL, 2011).

² Entende-se por saúde pública a ciência e a arte de prevenir a enfermidade, prolongar a vida, melhorar, proteger e proporcionar a saúde e o bem estar mediante os esforços organizados da sociedade. Estes esforços devem abordar tanto as políticas de saúde e as causas das enfermidades, como a provisão de serviços sanitários efetivos (OLIVER, 2005).

Estes dados evidenciam que parcela significativa dos mananciais destinados ao abastecimento público de água está comprometida pela contaminação por esgotos domésticos, que podem veicular patógenos como bactérias, vírus, protozoários e helmintos, microrganismos mais comumente associados às águas de abastecimento, sendo que sua relevância como problema de saúde pública é determinada pela gravidade, virulência e vulnerabilidade das populações em que incidem (WHO, 2011).

Em situações de falhas na segurança da rede de abastecimento (captação, tratamento e distribuição), tais fatores, agentes ou situações representam perigos e riscos à saúde humana³, podendo levar à contaminação em larga escala por tais microrganismos e ocasionar surtos de doenças diarreicas agudas⁴ (DDA) ou à infecção de baixo nível e potencialmente repetida, culminando em doença de forma isolada, situação que dificulta que os órgãos de vigilância em saúde pública identifiquem a água como fonte da contaminação (WHO, 2011).

O grupo das chamadas DDA ocupa lugar de destaque entre os indicadores de saúde pública devido à sua sensibilidade a diversas alterações nas condições de saneamento, qualidade sanitária de alimentos, hábitos higiênicos e comportamentais de uma comunidade, razão pela qual o Brasil instituiu, em 1994, por meio do Ministério da Saúde, o Programa de Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA), visando detectar a incidência das diarreias nos municípios (QUEIROZ et al., 2009).

Geralmente, as DDA são auto-limitadas (com duração de 2 a 14 dias) e podem ser de origem não infecciosa, devido à intolerância a alimentos ou drogas, ou infecciosa, causadas por bactérias, vírus e parasitas. Acerca destes últimos, a despeito dos diferentes mecanismos de transmissão, a ausência ou insuficiência de condições de saneamento e de práticas adequadas de higiene favorecem sua disseminação no ambiente (BRASIL, 2010). Em consonância, a OMS aponta que cerca de 90% dos casos de doenças diarreicas no mundo estão relacionadas ao saneamento inadequado ou insuficiente (WHO, 2011).

³ Neste contexto, a OMS (WHO, 2011) define três conceitos importantes:

a) Perigo é um agente biológico, químico, físico ou radiológico com capacidade para ocasionar danos;
b) Evento perigoso é um incidente ou situação que pode conduzir à presença de um perigo; e,
c) Risco é a probabilidade de que os perigos identificados ocasionem danos às populações expostas em um prazo temporal especificado, incluindo a magnitude do dano ou de suas consequências.

⁴ As DDA se caracterizam pelo aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência (em alguns casos, com presença de muco e sangue) e que podem ser acompanhadas de náusea, vômito, febre e dor abdominal (Brasil, 2009).

Entre os patógenos causadores de DDA, os protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* possuem alta significância como problema de saúde pública em função das seguintes características: 1) persistência nos reservatórios de água por períodos moderados ou longos (de semanas até meses); 2) alta resistência à cloração; 3) alta infectividade; 4) alta concentração excretada, podendo eliminar até 10^5 (oo)cistos por grama de fezes; 5) excretas de animais são importantes para a contaminação dos reservatórios de água (ARNONE e WALLING, 2007; WHO, 2011).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* - USEPA), soma-se a tais características o fato de que, a despeito dos protozoários serem eliminados em elevadas concentrações no material fecal, sua detecção em água é dificultada pelas limitações das técnicas de identificação, complexas e de custo considerável, especialmente para países em desenvolvimento (USEPA, 2012a).

Considerando ainda sua estreita relação com a pobreza, com a falta de saneamento básico e com a potabilidade da água, as morbidades associadas a estes patógenos foram incluídas, desde 2004, no grupo de Doenças Negligenciadas da OMS (SAVIOLI et al., 2006), evidenciando que tais doenças devem ser também interpretadas como produtos sociais, que transcendem os limites relativos às atitudes ou comportamentos dos indivíduos, relacionando-se, fundamentalmente, à falta de acesso sustentável à água potável e segura, da mesma forma que são determinadas pela organização dos setores responsáveis pela oferta e controle da água, como os de habitação, saneamento e saúde (RAZZOLINI e GÜNTHER, 2008).

Assim, partindo-se da hipótese de que há um risco elevado de infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium* pela ingestão de água tratada por estações de tratamento de água (ETA) convencionais e que fazem uso de mananciais superficiais impactados por contaminação biológica, resultando num possível incremento da incidência de DDA, este estudo se propôs a verificar a ocorrência destes protozoários em águas captadas para abastecimento público no município de Cajamar-SP, caracterizar sua patogenicidade e avaliar o risco associado ao seu consumo através da água distribuída.

Essas premissas serão aprofundadas a seguir, quando abordaremos as características dos protozoários e seu impacto ao meio ambiente e à saúde pública.

1.1 – Caracterização do protozoário *Giardia*

Descrito em 1681 por Anton van Leeuwenhock, *Giardia* foi, possivelmente, o primeiro protozoário intestinal humano conhecido, caracterizando-se por ser flagelado e habitar o trato intestinal de várias espécies de vertebrados (MORRISON et al., 2007; PLUTZER et al., 2010).

Em 1879, Grassi descobriu a forma cística, e a nomeação atual deste protozoário foi empregada em 1915, como homenagem ao professor Alfred Giard (ADAM, 2001). Durante o período de 1920 e 1930, mais de 50 espécies de *Giardia* foram descritas e, em 1952, Filice propôs uma reavaliação destas espécies com base na morfologia e não na especificidade pelo hospedeiro (MORRISON et al., 2007; PLUTZER et al., 2010).

O gênero *Giardia* é descrito como parasita de várias espécies animais, como a *Giardia duodenalis*, capaz de infectar espécies de aves, répteis e mamíferos; *G. muris*, associada à infecção de roedores, aves e répteis; *G. agilis*, relacionada a anfíbios; *G. psittaci*, que parasita periquitos; e *G. ardeae*, que acomete as garças azuis (MORRISON et al., 2007; PLUTZER et al., 2010). A *Giardia intestinalis*, também conhecida como *G. lamblia* e *G. duodenalis*, é a única espécie reconhecidamente encontrada em humanos e outros mamíferos. É um protozoário cosmopolita e o parasita intestinal mais comum de humanos em países desenvolvidos (LIM et al., 2008).

Estudos relatam a ocorrência de significativa variedade genética em populações de *Giardia duodenalis*, caracterizando a espécie em sete grupos genotípicos distintos, também denominados *assemblages*. Os mesmos são classificados de A a H, sendo os grupos A e B ainda subdivididos em AI, AII, BIII e BIV. Apenas esses genótipos (A e B), isolados em diversas espécies de mamíferos domésticos e silvestres, foram detectados em humanos. Os genótipos C e D são isolados principalmente de canídeos domésticos e silvestres; o E é considerado o mais prevalente em animais de produção, sendo encontrado em ruminantes domésticos e suínos. O genótipo F somente foi isolado de gatos domésticos, até o presente momento, assim como o G, encontrado apenas em roedores. Alguns autores sugerem, ainda, a ocorrência do genótipo H, procedente de mamíferos marinhos (FENG e XIAO, 2011).

Em suma, apresenta-se o Quadro 1, contendo as seis espécies de *Giardia* reconhecidas e seus principais hospedeiros:

Quadro 1 - Espécies de *Giardia* reconhecidas e seus principais hospedeiros.

Espécie	Genótipo	Principais Hospedeiros
<i>G. intestinalis</i>	A	Humanos, primatas não humanos, ruminantes, suínos, equinos, canídeos silvestres e domésticos, felídeos, roedores e outros mamíferos.
	B	Humanos, primatas não humanos, bovinos, cães, equinos e outros mamíferos
	C	Canídeos domésticos e silvestres
	D	Canídeos domésticos e silvestres
	E	Ruminantes domésticos e porcos
	F	Felinos
	G	Ratos
	H	Focas
<i>G. agilis</i>	-	Anfíbios
<i>G. ardeae</i>	-	Aves
<i>G. microti</i>	-	Roedores
<i>G. muris</i>	-	Roedores
<i>G. psittaci</i>	-	Aves
<i>G. varani</i> ⁵	-	Lagartos

Fonte: Adaptado de FENG e XIAO (2011)

Vale ressaltar que, embora apenas os genótipos A e B de *G. duodenalis* tenham demonstrado ser potencialmente zoonóticos, o risco de transmissão dos demais genótipos e espécies do gênero *Giardia* para humanos não está clara (MORRISON et al., 2007; PLUTZER et al., 2010; ORTEGA-PIERRES et al., 2009; FENG e XIAO, 2011).

Durante seu ciclo vital, *Giardia* spp. apresenta-se em duas formas: trofozoíto e cisto. A primeira é a forma ativa, na qual o protozoário se alimenta e reproduz, possuindo dois núcleos e quatro pares de flagelos, formato de pêra e de 8 a 18 µm de comprimento e de 5 a 15 de largura. O cisto constitui a forma infecciosa e resistente, apresentando uma forma ovóide ou elipsóide, composta por filamentos (de 7 a 30 nm de largura) e de 8 a 12 µm de comprimento (revestida por uma fina parede de 0,3 a 0,5 µm de espessura). No interior do cisto encontram-se os axonemas flagelares, vacúolos, ribossomos, grânulos de glicogênio, fragmentos do disco e quatro núcleos pequenos (MORRISON et al., 2007; PLUTZER et al., 2010).

⁵ Não há suporte por caracterizações de biologia molecular.

Como causador de doença de transmissão fecal-oral, o ciclo biológico da *Giardia* é direto e bastante simples, completando-se em um único hospedeiro (ciclo monoxeno), assim como *Cryptosporidium* (PLUTZER et al., 2010; FENG e XIAO, 2011). Detalhes do ciclo do protozoário e aspectos morfológicos dos cistos e trofozoítos podem ser visualizados na Figura 1.

O período de incubação varia de uma a duas semanas antes do aparecimento dos sintomas, entre eles diarreia, náuseas, desconforto abdominal e perda de peso, podendo gerar infecções severas, com diarreia crônica e má absorção intestinal. 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, a fase aguda evolui para a fase crônica e a sintomatologia manifesta-se por curtos e recorrentes períodos (MORRISON et al., 2007; ORTEGA-PIERRES et al., 2009; PLUTZER et al., 2010; FENG e XIAO, 2011).

Vale salientar que os cistos podem ser eliminados tanto por pessoas e animais doentes (sintomáticos), quanto por assintomáticos, sendo que estes últimos representam importantes reservatórios na disseminação da infecção (MORRISON et al., 2007; ORTEGA-PIERRES et al., 2009; PLUTZER et al., 2010; FENG e XIAO, 2011). Para tratamento, existem várias drogas – secnidazol; tinidazol, metronidazol, albendazol, paramomicina - com eficácia de 55 a 97%, apresentando muitas vezes efeitos adversos e contra-indicações, principalmente para pacientes grávidas. Algumas drogas podem acarretar possível teratogenicidade (FENG e XIAO, 2011).

Portanto, a resistência ambiental e a prolongada viabilidade dos cistos de *Giardia* em águas com baixa temperatura, a natureza endêmica das infecções de *Giardia* em humanos e animais, a transmissão cruzada de espécies e a baixa dose infecciosa necessária para estabelecer colonização dentro de um novo hospedeiro, são fatores que favorecem o potencial de propagação da giardíase e que tornam o patógeno um desafio para a saúde pública (ORTEGA-PIERRES et al., 2009; FENG e XIAO, 2011).

Figura 1 – Ciclo de vida da *Giardia*. **LEGENDA**

(1) e (2) - O ciclo tem início com a infecção do hospedeiro suscetível pela ingestão de cistos, principalmente por meio de alimentos ou água contaminados;

(3) e (4) - Após exposição à acidez estomacal e ação de enzimas digestivas, ocorre fragilização da parede do cisto e consequente ruptura (processo de excistamento), liberando seu conteúdo que, rapidamente, se diferencia em dois trofozoítos. Estes se multiplicam por divisão binária (forma assexuada de reprodução) e colonizam a mucosa do intestino delgado proximal, na qual podem permanecer aderidos ao epitélio por meio do disco suatorial ventral;

(5) - Em condições favoráveis, os trofozoítos iniciam o processo de encistamento, geralmente na porção proximal do intestino grosso. Os cistos formados são então eliminados nas fezes do hospedeiro, podendo permanecer viáveis no ambiente por mais de dois meses, sob condições apropriadas de temperatura e umidade.

Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC - <http://www.cdc.gov>).

HUNTER e THOMPSON (2005) e LIM et al. (2008) sintetizam os principais fatores de risco para giardíase a partir de estudos de caso-controle, conforme segue: 1) condições sanitárias precárias; 2) baixo nível sócio-econômico; 3) ausência de água tratada; e 4) ausência de coleta e tratamento de esgotos.

Em termos de vulnerabilidade, pessoas que vivem em zonas rurais têm um risco maior de contrair giardíase do que aquelas que vivem em zonas urbanas. Crianças em idade escolar também são alvo da parasitose devido à falta de hábitos higiênicos adequados e à baixa imunidade – este último fator se estendendo aos pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), recém transplantados e idosos (HUNTER e THOMPSON, 2005; LIM et al., 2008).

1.2 – Caracterização do protozoário *Cryptosporidium*

Descrito pela primeira vez por Ernest Edward Tyzzer, o protozoário foi encontrado em glândulas gástricas de camundongos, sendo a primeira espécie observada em 1907 - *Cryptosporidium muris* - e a segunda em 1911 - *Cryptosporidium parvum* (NEVES, 2005). Após décadas sem avanços nos estudos do protozoário, em 1955, *Cryptosporidium* foi relatado como responsável por ocasionar doença e óbito em perus e, posteriormente, como agente causador de graves quadros de diarreia em bovinos (LINDSAY e BLAGBURN, 2008).

Observado em humanos pela primeira vez em 1976, sua importância clínica e epidemiológica despontou na década de 1980, com a identificação do HIV e o reconhecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), cuja patogenia é caracterizada pela imunossupressão e a mortalidade comumente associada a enfermidades oportunistas, como a criptosporidiose (BOULTER-BITZER et al., 2007; BOUZID et al., 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009). É interessante notar que a ação de terapia antiretroviral parece representar um “fator de proteção” contra a aquisição de enteroparasitas (BACHUR, 2007; FIGUEIREDO, 2007; CARDOSO, 2011).

RYAN et al. (2014) descrevem a existência de 26 espécies de *Cryptosporidium* confirmadas por dados moleculares e morfológicos, que são apresentados no Quadro 2, juntamente com seus principais hospedeiros.

Quadro 2 - Espécies de *Cryptosporidium* reconhecidas e seus principais hospedeiros.

Espécie	Hospedeiros	Espécie	Hospedeiros
<i>C. andersoni</i>	Gado	<i>C. molnari</i>	Peixes
<i>C. baileyi</i>	Aves domésticas	<i>C. muris</i>	Roedores
<i>C. bovis</i>	Gado	<i>C. parvum</i>	Gado, animais domésticos, homem.
<i>C. canis</i>	Cães	<i>C. ryanae</i>	Gado
<i>C. cuniculus</i>	Coelho	<i>C. scrofarum</i>	Porcos domésticos e javalis
<i>C. erinacei</i>	Ouriços e cavalos	<i>C. serpentis</i>	Répteis
<i>C. fayeri</i>	Marsupiais	<i>C. suis</i>	Porcos
<i>C. felis</i>	Gatos	<i>C. tyzzeri</i>	Roedores
<i>C. fragile</i>	Anfíbios	<i>C. ubiquitum</i>	Mamíferos, incluindo o homem
<i>C. galli</i>	Aves	<i>C. varanii</i>	Lagartos
<i>C. hominis</i>	Homem	<i>C. viatorum</i>	Homem
<i>C. macropodum</i>	Marsupiais	<i>C. wrairi</i>	Porcos da Guiné
<i>C. meleagridis</i>	Aves e homem	<i>C. xiaoi</i>	Ovinos e caprinos

Fonte: Adaptado de RYAN et al. (2014)

Dentre as espécies citadas, dez apresentam potencial zoonótico: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. muris*, *C. suis*, *C. ubiquitum*, *C. felis* e *C. canis*, sendo que as duas primeiras são as mais frequentemente identificadas em estudos epidemiológicos – *C. hominis* mais prevalente na América do Norte, América do Sul, Austrália e na África e *C. parvum* em países europeus (BOULTER-BITZER et al., 2007; BOUZID et al., 2008; ORTEGA-PIERRES et al., 2009; XIAO et al., 2010; ŠLAPETA, 2013; HOFSTRA et al., 2013; RYAN et al., 2014).

Quanto à morfologia, o protozoário apresenta diferentes formas estruturais durante o seu ciclo vital (monóxeno) e mede entre 4 a 6 µm de diâmetro. Nas fezes e no meio ambiente, *Cryptosporidium* apresenta-se na forma de oocisto, estrutura reprodutiva, infecciosa e de resistência; e nos tecidos dos hospedeiros, o agente infeccioso apresenta forma endógena, como esporozoítos (BOULTER-BITZER et al., 2007; BOUZID et al., 2008).

O ciclo biológico de *Cryptosporidium* é expressivamente mais complexo que o da *Giardia*, apresentando duas fases bastante distintas entre si: uma assexuada (esquizogonia) e uma sexuada (singamia). Detalhes do ciclo do protozoário e aspectos morfológicos dos oocistos e esporozoítos podem ser visualizados na Figura 2.

Figura 2 – Ciclo de vida do *Cryptosporidium*.

LEGENDA

(1), (2) e (3) - O ciclo tem início com a infecção do hospedeiro suscetível pela ingestão de oocistos, principalmente por meio de alimentos ou água contaminados;

(a), (b) e (c) - O oocisto ingerido sofre rompimento (excistamento) e libera quatro esporozoítos. Os esporozoítos são carreados até a luz intestinal, onde, em contato com a superfície do epitélio, são englobados pelas microvilosidades, formando um vacúolo parasitóforo. Em seguida, diferenciam-se em trofozoítos, dando início ao processo de reprodução assexuada;

(d), (e) e (f) - São formados os merontes (ou esquizontes) de primeira geração, com oito merozoítos cada, quando maduros. Os merozoítos liberados podem sofrer desenvolvimento cíclico e dar origem a novos merontes de primeira geração ou prosseguir o ciclo, originando merontes de segunda geração, com quatro merozoítos cada. É interessante notar que o *Cryptosporidium baileyi* apresenta, ainda, uma terceira geração de merontes, com oito merozoítos (ORTEGA-PIERRES et al., 2009);

(g), (h), (i), (j) e (k) - Os merozoítos de segunda ou terceira geração são responsáveis pelo início da fase sexuada do ciclo biológico, diferenciando-se em microgametócitos e macrogametócitos, que formam microgametas e macrogametas, respectivamente. Ocorre então a fertilização e origina-se o zigoto, que irá se diferenciar em dois possíveis tipos de oocisto: o oocisto de parede fina (cerca de 20%), que se mantém no organismo hospedeiro, sofre excistamento e é responsável pela auto-infecção; e o oocisto de parede espessa (cerca de 80%), que será eliminado nas fezes ou, menos frequentemente, nas secreções respiratórias.

Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC - <http://www.cdc.gov>).

É importante ressaltar que o oocisto de *Cryptosporidium* não necessita do contato com enzimas digestivas ou sais biliares para que ocorra o excistamento, podendo completar seu ciclo em sítios extra-intestinais, como no epitélio pulmonar, quando a infecção do hospedeiro ocorre por inalação de oocistos em suspensão (ORTEGA-PIERRES et al., 2009). Este tipo de oocisto, eliminado na forma infectante, é altamente resistente em condições ambientais e pode ser transmitido para um próximo hospedeiro por meio de água, alimentos ou fômites contaminados, e por contato direto ou indireto entre pessoas, animais ou animal-homem. A veiculação hídrica é a principal via de transmissão, com predomínio da fecal-oral (BOUZID et al., 2008).

As infecções por *Cryptosporidium* podem se caracterizar como enterites severas ou, até mesmo, assintomáticas. Após um período de incubação de sete a dez dias, cerca de 90% dos indivíduos acometidos podem apresentar até 20 episódios diários de diarreia líquida, assim como febre, vômitos, cólica, perda de peso. Com relação ao tratamento, inúmeras drogas foram testadas, entre elas: azitromicina, paramomicina, metronidazol, letrazuril, nitazoxanida; sem apresentarem sucesso na erradicação (ORTEGA-PIERRES et al., 2009; BOUZID et al., 2008).

A OMS (WHO, 2011) sintetiza as principais características que fazem do patógeno um desafio para a saúde pública: a) grande número de oocistos eliminados por hospedeiro infectado (aproximadamente 10^8 oocistos são liberados durante a fase sintomática da doença); b) baixa especificidade do hospedeiro, aumentando o potencial para a propagação ambiental e contaminação (por exemplo, há relatos de infecções por *C. parvum* em uma variedade de mamíferos, animais domésticos e selvagens); c) sobrevivência dos oocistos é aumentada em ambientes frios e úmidos (eles podem permanecer infecciosos durante mais de seis meses na água); d) resistência ambiental dos oocistos permite que eles sobrevivam a alguns processos de desinfecção devido à composição da sua parede; e) tamanho pequeno dos oocistos (3,0-8,5 μm) favorece sua passagem através dos filtros de areia das estações de tratamento de água; f) infecção depende da ingestão de poucos oocistos (existem registros de infecções em humanos com a ingestão de apenas nove e, em cordeiros, de apenas cinco) e; g) excreção de oocistos pelas fezes facilita sua difusão na ambiente (indiretamente, tanto através dos esgotos, quanto pelas excretas de animais).

1.3 – Ocorrência de *Giardia* e *Cryptosporidium* no ambiente aquático

A ocorrência de protozoários patogênicos no ambiente aquático e sua transmissão via água de consumo é conhecida e registrada por diversos estudos em todo o mundo, os quais verificaram a presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas superficiais utilizadas como fonte de abastecimento e também em águas tratadas, indicando um possível risco microbiológico à saúde da população. Sem a pretensão de esgotar o tema, apresentam-se os achados de alguns destes estudos.

LECHEVALIER et al. (1991), encontraram cistos de *Giardia* spp. em 81% e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 87% das amostras de água bruta em mananciais que abastecem 66 ETA em 14 estados e uma província no Canadá. Os autores também constataram que as maiores concentrações provinham de corpos d'água que recebiam efluentes domésticos, concluindo que, em média, bacias hidrográficas menos protegidas possuíam 10 vezes mais (oo)cistos em relação às protegidas.

KOACH et al. (1993) encontraram cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 32% e 14%, respectivamente, das amostras de água bruta, em Yukon, Canadá. Os autores apontaram como principal causa o lançamento de esgoto em águas superficiais utilizadas como mananciais de abastecimento.

Em quatro reservatórios naturais de Nova Jersey, EUA, LECHEVALLIER et al. (1997) encontraram *Giardia* spp. (0,7 a 107 cistos/100 litros) e *Cryptosporidium* spp. (0,7 a 31 oocistos/100 litros), relacionaram a contaminação com fezes de animais locais.

Em rios de Hong Kong, BELLA e TAM (1998) identificaram até 468 cistos/L de *Giardia* spp. e 3 cistos/L de *Cryptosporidium* spp., atribuíram a origem da contaminação aos esgotos não tratados e lançados ao longo dos rios.

PAYMENT et al. (2000) observaram até 38 cistos de *Giardia* spp./L e 15 oocistos de *Cryptosporidium* spp./L nas águas da bacia do rio Saint Lawrence, no Canadá, que abastecem, na região de Montreal, mais de 2 milhões de pessoas.

MEDEMA e SCHIJVEN (2001) relataram concentrações, em dois rios da Holanda, que variaram de 7,5 a 210 cistos de *Giardia* spp./L e 0,6 a 13 oocistos de *Cryptosporidium* spp./L.

No Japão, HASHIMOTO et al. (2001) avaliaram a presença de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e de *Giardia* em um sistema de abastecimento de água que operava com ciclo completo, detectando oocistos e cistos, respectivamente, em 35% e em 12% das 26 amostras analisadas. Os mesmos autores (HASHIMOTO et al., 2002), em uma avaliação de 13 amostras de outro manancial utilizado para abastecimento, observaram que 12 continham *Giardia* spp. (de 4 a 58 cistos /100L) e todas apresentavam *Cryptosporidium* spp. (de 16 a 150 oocistos/100L).

COX et al. (2003), ao avaliar, em 1998, as causas das altas concentrações de *Cryptosporidium* e *Giardia* nos sistemas de abastecimento de água de Sidney, com graves consequências à saúde da população da cidade mais populosa da Austrália, atribuíram a contaminação do manancial (Lago Burrangorang) às deficiências das estações de tratamento.

No Reino Unido, uma pesquisa realizada com 201.136 amostras de água tratada, entre 2000 e 2004, detectaram oocistos de *Cryptosporidium* em 16% das amostras, com concentração máxima de 0,49 oocistos/L (DWI, 2005).

LEE et al. (2007) examinaram a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* no rio coreano Nakdong, revelando contaminações por (oo)cistos em todos os lugares amostrados. A principal fonte de contribuição para contaminação pelos protozoários por resíduos de gado, superando os efluentes industriais e domésticos, também lançados no rio.

Em estudo sobre a qualidade de águas superficiais da região central do estado do Arizona (EUA), RYU e MORTEZA (2008) analisaram 162 amostras e verificaram que 10% estavam contaminadas com oocistos de *Cryptosporidium* e 27% por cistos de *Giardia*.

Em águas dos canais de Amsterdam, SCHETS et al. (2008) constataram concentrações de até 29 oocistos de *Cryptosporidium* spp./10L e de até 167 cistos de *Giardia* spp./10L.

Um estudo sobre a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de água para consumo humano em Portugal, verificou que oocistos de *Cryptosporidium* estavam presentes, respectivamente, em 53% (37/69) e 41% (44/106) das amostras de água bruta e tratada. Adicionalmente, cistos de *Giardia* foram detectados em 58% (40/69) e 26% (27/106) de amostras de água bruta e tratada, respectivamente (LOBO et al., 2009).

Outro estudo, realizado no Norte de Portugal, verificou que 73% das 283 amostras analisadas se revelaram positivas para ambos parasitas. Adicionalmente, os níveis de contaminação eram bastante altos, variando de 0,17 a 50 mil cistos de *Giardia* por 10L de água e 0,2 a 726 oocistos de *Cryptosporidium* por 10L (ALMEIDA et al., 2012).

XIAO et al. (2012) avaliaram pontos de captação de água para abastecimento público de 66 sistemas de tratamento em 33 cidades chinesas, encontrando concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* que variaram de 0 a 6/10L (média de 0,7/10L).

Em Luxemburgo, BURNET et al. (2014) analisaram 121 amostras de águas superficiais no intuito de se obter a distribuição espacial e temporal desses parasitas na área rural da bacia de Upper-Sûre. Os resultados gerais obtidos mostraram uma maior prevalência de *Giardia* (97%) comparado à *Cryptosporidium* (77%).

PRYSTAJECKY et al. (2014) em monitoramento de (oo)cistos realizado por dois anos na Columbia Britânica (Canadá), detectaram *Cryptosporidium* em 63% das 186 amostras de água de superfície em concentrações de até 206 oocistos/L. *Giardia* foi detectada em 86% das 134 amostras, em concentrações de até 38 cistos/L.

No Brasil, MULLER (1999) avaliou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 48 amostras de águas de abastecimento superficiais e tratadas da Região Metropolitana de São Paulo, encontrando o parasita tanto na água bruta (até 236 oocistos/L) quanto na água tratada (até 1,2 oocistos/L).

HACHICH et al. (2000) monitoraram as concentrações de *Giardia* e *Cryptosporidium* em 28 mananciais da Rede Básica de Monitoramento do Estado, detectando a ocorrência de *Giardia* em 57% e *Cryptosporidium* em 29% dos mananciais, demonstrando que esses protozoários estão disseminados nas águas superficiais do Estado. Ademais, das 162 amostras de água analisadas, 31,5% foram positivas para *Giardia* e 5% para *Cryptosporidium*.

É interessante notar que, dentre os mananciais avaliados, os mais críticos foram o rio Atibaia (em Campinas), o rio Cotia (no município homônimo) e o ribeirão dos Cristais (manancial responsável pelo abastecimento do município de Cajamar, cenário do presente estudo), com densidades máximas de 521 cistos/L, 215 cistos/L e 176 cistos/L de *Giardia*, respectivamente (HACHICH et al., 2000).

FRANCO et al. (2001) encontraram até 95 cistos de *Giardia* spp. e até 57 oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de 500 mL de água bruta do rio Atibaia, em Campinas (SP).

FARIAS et al. (2002) detectaram *Cryptosporidium* spp. (até 1400 oocistos/L) em 12 amostras de águas coletadas em água do córrego Pirajussara, no município de São Paulo, ressaltando que o córrego apresentou, algumas vezes, concentrações maiores quando comparadas ao efluente de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) também estudado.

HACHICH et al. (2004), detectaram *Giardia* em 27% e *Cryptosporidium* em 2,5% das 278 amostras de águas superficiais coletadas em 28 pontos de 10 bacias no Estado de São Paulo durante um período de 19 meses, sendo que as concentrações variaram de não detectado a 521 cistos/L e de não detectado a 20 oocistos/L.

CANTUSIO NETO (2004), em estudo sobre a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água em Campinas (SP), não detectou *Cryptosporidium*, mas verificou média de 32,8 cistos/L de *Giardia* na água bruta.

BERINO (2004), em trabalho sobre a ocorrência e detecção de *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. em águas brutas de quatro afluentes do Lago Guaíba (Rios Taquari, Caí, dos Sinos e Gravataí), que abastecem dezenas de municípios da Região Metropolitana de Porto Alegre (RS), verificaram a presença de até 605 cistos/100L de *Giardia* e até 400 oocistos/100L de *Cryptosporidium*.

HELLER et al. (2004), em estudo realizado em dois mananciais de abastecimento do município de Viçosa (MG), verificou que as concentrações médias de *Giardia* e de *Cryptosporidium* foram da ordem de 4 a 7 cistos/L e 6 a 20 oocistos/L, respectivamente. Em eventos de pico, foram encontradas concentrações de até 510 oocistos de *Cryptosporidium*/L e 140 cistos de *Giardia*/L.

No mesmo município, OLIVEIRA (2004), em trabalho sobre enteroparasitas em populações usuárias de diferentes sistemas de abastecimento de água, detectou até 30 cistos/L de *Giardia* e até 20 oocistos/L de *Cryptosporidium*.

OLIVEIRA (2005) realizou estudo sobre a ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no rio Atibaia, em Campinas (SP), em um trecho a montante e outro a jusante do ponto de encontro com outro manancial contaminado por esgoto doméstico, encontrando, a montante, de 16 a 36 cistos/L de

Giardia (*Cryptosporidium* não foi detectado) e, a jusante, foi detectado 0,8 oocistos/L de *Cryptosporidium* e de 14 a 240 cistos/L de *Giardia*.

COSTA (2006), em trabalho de identificação de patógenos humanos nas águas que margeiam a cidade de Rio Grande (RS), identificou a presença de *Cryptosporidium* em 4,2% das 48 amostras analisadas, sendo que *Giardia* não foi detectada.

Na cidade de Recife (PE), MACHADO (2006) identificou oocistos de *Cryptosporidium* em 5% das amostras analisadas de quatro mananciais da região, com concentrações variando de 16 a 40 oocistos/L.

Também na cidade do Recife (PE), SALES (2006), verificando a presença de enteroparasitas em amostras de água consumida por parte da população do Distrito Sanitário VI, detectou *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em, respectivamente, 15,55% e 3,85% das 90 amostras analisadas.

DIAS (2007), em estudo sobre a qualidade microbiológica da água da bacia do ribeirão São Bartolomeu, em Viçosa (MG), observou a presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* em mananciais superficiais urbanos (de 20,2 a 65,8 cistos/L e de 15,3 a 28,5 oocistos/L).

LEAL (2008), em avaliação da presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em manancial superficial no litoral norte de São Paulo, observou cistos de *Giardia* em 8 das 12 amostras de água do rio (detectando de 30,7 a 184,6 cistos/L) e oocistos de *Cryptosporidium* em uma amostra (76,9 oocistos/L).

LOPES (2009), em estudo realizado no município de Vargem das Flores (MG), detectou a ocorrência de protozoários em córregos tributários (até 82,1 cistos/L de *Giardia* e até 30 oocistos/L de *Cryptosporidium*) e na represa (até 8 cistos/L de *Giardia* e até 4 oocistos/L de *Cryptosporidium*). O estudo apontou, ainda, que a represa se comportou como barreira sanitária, ao reduzir a quantidade de (oo)cistos provenientes de seus tributários.

LEAL et al. (2009), em estudo dos padrões de ocorrência de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp. em dois mananciais superficiais (subsistemas Itapecerica e subsistema Pará) na cidade de Divinópolis (MG), verificou que o rio Itapecerica apresentou concentrações de 1 a 3 oocistos de *Cryptosporidium*/10L e de 2 a 250 cistos de *Giardia*/10L, em percentuais de 50% e 100% de ocorrência, respectivamente.

RAZZOLINI et al. (2010), em estudo sobre a detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em água bruta (13 amostras) e tratada (12 amostras) de áreas urbanas paulistas, encontraram concentrações de *Giardia* e *Cryptosporidium* na água bruta que variaram de não detectado a 3,4 cistos/L e de não detectado a 0,1 oocistos/L, respectivamente. Na água tratada dessas mesmas áreas, as concentrações de *Giardia* e *Cryptosporidium* variaram de não detectada a 0,06 cistos/L e de não detectado a 0,01 oocistos/L, respectivamente.

YAMASHIRO (2010), em monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na represa de Salto Grande, manancial eutrofizado localizado em Americana (SP), verificou a presença de até 224 cistos/L de *Giardia* e até 170 oocistos/L de *Cryptosporidium*.

BARROS JÚNIOR (2011), observaram a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de água superficial (até 162 cistos/L de *Giardia* e até 16 oocistos/L de *Cryptosporidium*) e da interface sedimento-água (até 160 cistos/L de *Giardia* e até 130 oocistos/L *Cryptosporidium*) do rio Capivari, na cidade de Campinas (SP).

OLIVEIRA (2011), em avaliação da água de torneira de 120 escolas públicas no município de Porto Alegre (RS), observou a presença de *Giardia* (0,83% das amostras) e *Cryptosporidium* (1,7% das amostras).

SATO et al. (2013), que monitoraram pontos de captação de água para abastecimento público em quatro regiões de São Paulo (Região Metropolitana de São Paulo – RMSP -, Campinas, Baixada Santista e Vale do Paraíba) durante dois anos, observaram frequência média de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* de 49,5% e 9,2%, respectivamente. As concentrações máximas encontradas foram de 97 cistos/L para *Giardia* e de 6 oocistos/L para *Cryptosporidium*.

Em síntese, os trabalhos levantados registraram que a presença de (oo)cistos nos mananciais estava associada, usualmente, ao grau e o tipo de ocupação da bacia, à existência de criação de animais próxima ao manancial, ao lançamento de efluentes domésticos (tratados e não-tratados), além da pluviosidade (usualmente associada a poluição difusa proveniente de áreas agrícolas).

Ademais, a análise destes estudos permitiu observar que, geralmente, os autores indicam, como fatores complicadores do problema, as limitações dos processos convencionais de tratamento de água na remoção/inativação de

(oo)cistos; a limitação no uso de bactérias do grupo coliforme como indicador tradicional da qualidade da água tratada; as limitações dos métodos de pesquisa de protozoários em amostras de água; a dificuldade de estimar riscos à saúde associados à presença dos protozoários em águas de consumo humano; e a influência de reservatórios animais na manutenção dessas parasitoses no meio aquático, contribuindo para que um maior e mais diversificado número de seres seja capaz de disseminar grandes quantidades dos agentes no ambiente.

1.4 – Epidemiologia da giardíase e da criptosporidiose

Doenças consideradas negligenciadas pela OMS, a giardíase e a criptosporidiose têm em comum o fato de serem subdiagnosticadas e não possuem notificação obrigatória na maior parte do mundo, inclusive no Brasil. Por consequência, a prevalência destas enfermidades é difícil de determinar; contudo, o número de pessoas infectadas na população pode ser avaliado a partir de estudos de surtos de DDA causados por estes protozoários, estando geralmente associados à contaminação de águas de abastecimento (SAVIOLI et al., 2006).

O primeiro surto de giardíase que se tem registro ocorreu entre os meses de outubro de 1954 e março de 1955 em Portland (EUA), onde aproximadamente 50 mil pessoas foram contaminadas após o consumo de água de um manancial superficial, cujo único tratamento era a cloração; o primeiro registro de surto de criptosporidiose ocorreu em 1983, em Cobham (Reino Unido), resultando em 16 casos originados, provavelmente, da contaminação da água de abastecimento (KARANIS et al., 2007).

De acordo com KARANIS et al. (2007), em estudo de revisão sobre os surtos mundiais de parasitas intestinais através da água ocorridos até 2003, pelo menos 325 surtos de transmissão hídrica foram documentados em todo o mundo e atribuídos a protozoários patogênicos, sendo que a *Giardia duodenalis* foi responsável por 132 destes surtos (40,6%) e o *Cryptosporidium parvum* por 165 (50,8%). É interessante notar que, da totalidade dos surtos levantados por estes autores, 60% foram registrados na América do Norte (52% nos EUA e 8% no Canadá) e 33% na Europa (24% no Reino Unido e 9% em outros países). Ademais, da totalidade dos surtos estudados (325), 104 (32%) e 77 (23,7%) foram associados a sistemas de abastecimento de água contaminados com *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* ou *Cryptosporidium* spp, respectivamente.

Em atualização do estudo supracitado, BALDURSSON e KARANIS (2011) observaram que, entre os anos de 2004 e 2010, cerca de 200 surtos por protozoários patogênicos foram reportados pelo mundo, sendo que a *Giardia lamblia* foi responsável por 70 destes surtos (35,2%) e o *Cryptosporidium* spp. por 120 (60,3%). Da totalidade dos surtos levantados por estes autores, 46,7% foram documentados na Austrália, 30,6% na América do Norte e 16,5% na Europa.

Embora não caracterizem, necessariamente, o real quadro epidemiológico no que diz respeito à prevalência de giardíase e criptosporidiose no mundo, os eventos notificados pelos sistemas de vigilância epidemiológica de diversos países e/ou registrados em publicações científicas exemplificam, de modo consistente, o papel da água de consumo como veículo de transmissão destes protozoários. Objetivando destacar os fatores que foram determinantes ou condicionantes para que a água de consumo humano fosse implicada como fonte da exposição, são apresentados alguns importantes surtos, que se destacam pela morbidade e, em alguns casos, pela mortalidade.

Rome, Nova Iorque (EUA): entre novembro de 1974 e Junho de 1975, cerca de cinco mil pessoas adoeceram e 500 morreram entre os moradores da cidade, em razão da presença de *Giardia lamblia* na água de abastecimento (tratada apenas com cloração), sendo a contaminação provavelmente advinda de despejos de agrupamentos humanos lançados no manancial (SHAW et al., 1977).

Berlin, New Hampshire (EUA): entre abril e maio de 1977, a cidade teve mais de sete mil ocorrências de giardíase em razão de água contaminada por fezes humanas e de animais, associadas a deficiências das duas ETA que abasteciam a população daquele município (LIPPY, 1978).

Vail, Colorado (EUA): entre março e abril de 1978, ocorreram cerca de cinco mil casos de giardíase, em razão da contaminação da água de abastecimento devido à obstrução de um cano de esgoto e consequente vazamento e contaminação da água, associado à deficiências no tratamento (CDC, 1978).

Bradford, Pennsylvania (EUA): em 1979, 3500 pessoas contraíram giardíase em função da contaminação da água de abastecimento público, associada a castores infectados com o parasita, e deficiências nas ETA (LIPPY, 1981).

San Antonio, Texas (EUA): em 1984, foi documentado um surto de Criptosporidiose, afetando cerca de duas mil pessoas que consumiram água de poço contaminada por esgoto (SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996).

Carrollton, Geórgia (EUA): em 1987, cerca de 13 mil pessoas foram diagnosticadas com criptosporidiose, primeiro surto causado pelo parasita proveniente de dejetos de bovinos e associado a falhas nas etapas de coagulação, floculação e filtração do sistema de tratamento de água (SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996).

Ayshire (Reino Unido): em 1988, em razão da infiltração de dejetos de bovinos (utilizados como fertilizantes) no reservatório de água de abastecimento, centenas de pessoas adoeceram com criptosporidiose (BARER e WRIGHT, 1990).

Jackson County, Oregon (EUA): em 1992, cerca de quinze mil pessoas adoeceram por criptosporidiose, sendo a causa do surto associada à contaminação advinda da agricultura, deficiências no tratamento da água e à seca ocorrida à época, que limitou a diluição do esgoto, lançado nos mesmos corpos d'água utilizados como fonte de abastecimento (SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996).

Milwaukee, Wisconsin (EUA): entre março e abril de 1993, o *Cryptosporidium* foi responsável pelo maior surto já registrado de uma doença veiculada pela água de consumo, afetando 403 mil pessoas, mais de quatro mil hospitalizações e 112 óbitos. O abastecimento da cidade era feito por duas ETAs (Sul e Norte), que captavam água de manancial superficial (Lago Michigan) e, na ocasião, a diminuição da efetividade do tratamento convencional de uma das ETAs permitiu a passagem dos oocistos pelos filtros e a conseqüente distribuição da água não potável à população (FOX e LYTLE, 1996).

Kitchener-Waterloo, Ontário (Canadá): em março de 1993, deficiências no tratamento da água (desinfecção por ozônio em dose insuficiente) associadas ao carregamento de contaminantes da agricultura por chuva e neve derretida, causaram o adoecimento de cerca de 24 mil pessoas por criptosporidiose (CRAUN et al., 1998).

Nova Iorque, Nova Iorque (EUA): em Dezembro de 1995, cerca de 1500 pessoas adoeceram por giardíase em função de deficiências no tratamento da água do manancial (LEVY et al., 1998).

Cranbrook e Kelowna, Columbia Britânica (Canadá): em 1996, cerca de seis mil pessoas adquiriram criptosporidiose em razão de contaminação por dejetos de bovinos em mananciais de abastecimento associado à ausência de filtração da ETA (CRAUN et al., 1998).

Saitama (Japão): em 1996, cerca de nove mil pessoas contraíram criptosporidiose e oocistos foram detectados tanto na água tratada quanto na água bruta (SMITH e ROSE, 1998).

Texas (EUA): em 1998, cerca de 1400 pessoas foram diagnosticadas com criptosporidiose devido ao vazamento de esgoto para a água subterrânea utilizada no abastecimento público (BARWICK et al., 2000).

Bergen (Noruega): entre os anos de 2004 e 2005, mais de 1500 pessoas foram diagnosticadas com giardíase. Este foi primeiro surto de grandes dimensões na Noruega, tendo como provável fonte de contaminação o lançamento de esgoto não tratado de uma área residencial no manancial (ROBERTSON et al., 2006).

País de Gales (Reino Unido): em 2005, um surto envolvendo 218 casos confirmados de criptosporidiose, teve como provável fonte de contaminação a água de abastecimento tratada, onde foi identificado *Cryptosporidium hominis*. As contagens de oocistos na água final tratada coletada na ETA e em diferentes pontos do sistema de distribuição foram consistentemente muito baixas, sendo a contagem máxima de 0,08 oocistos por 10 litros. Os dados deste monitoramento contínuo e a curva de epidemia levou os autores a inferir que os baixos números de oocistos de *C. hominis* estavam presentes na água tratada de forma contínua durante o surto e estes foram de infectividade suficiente para causar a doença (MASON et al., 2010).

Östersund (Suécia): em novembro de 2010, quase metade da população (cerca de 27 mil habitantes) foi afetada por um surto de criptosporidiose, com o *Cryptosporidium hominis* identificado em amostras humanas e ambientais, incluindo amostras de água tratada, demonstrando sua associação com deficiências no processo de tratamento da água, que não foi eficiente em remover os patógenos (WIDERSTRÖM et al., 2014).

É importante ressaltar que o monitoramento destes surtos ocorre desde a década de 1970, nos EUA, e desde a década de 1980, na Austrália e em diversos países da Europa, evidenciando que os países que tem as piores condições de saneamento e, portanto, maior risco de serem afetados por tais protozoários, não possuem sistemas de vigilância sensíveis a tais surtos (KARANIS et al., 2007; BALDURSSON e KARANIS, 2011).

No Brasil, os dados epidemiológicos disponíveis provêm, em sua maioria, de pesquisas acadêmicas de identificação de *Cryptosporidium* e *Giardia* a partir de amostras clínicas de fezes humanas em surtos diarreicos, portadores de HIV e,

principalmente, em crianças de até cinco anos (FRANCO e CORDEIRO, 1996; CARVALHO-ALMEIDA et al. 2006; GONÇALVES et al., 2006), faixa etária considerada ideal para verificação da prevalência de parasitoses intestinais, pois apresenta baixa mobilidade, retratando melhor a condição higiênico-sanitária do local onde habitam, comportamento ligado à fase oral e imaturidade do sistema imunológico (BERNE, 2007; DIAS, 2007; SANTOS, 2008).

Dentre os diversos estudos epidemiológicos desses parasitas em cidades brasileiras, observa-se que a maioria foi realizada em estados do Sudeste (dez em São Paulo, nove em Minas Gerais, um no Espírito Santo e um no Rio de Janeiro), seguida das regiões Sul (cinco do Rio Grande do Sul), Nordeste (três do Ceará e dois do Rio Grande do Norte), Norte (um do Acre, um do Amazonas e um de Roraima) e um da Região Centro-Oeste (realizado em Goiás). Apresenta-se abaixo uma síntese destes estudos, por região geográfica.

SUDESTE:

No Estado de São Paulo, LOMAZI (1990), em estudo de identificação de agentes enteropatogênicos em 288 amostras de fezes de crianças de até 12 anos com diarreia aguda na cidade de Paulínia (SP), identificou a presença de *Giardia* em 14,3% das amostras e *Cryptosporidium* em 0,5%.

FRANCO (1996), investigando infecções parasitárias em 13 creches urbanas no município de Campinas (SP), analisou 307 amostras de fezes de crianças de 2 a 42 meses (10,1% com presença de *Giardia* 5,5% de *Cryptosporidium*) e 134 amostras de funcionários de creche (3,7% com *Giardia* identificada nas amostras).

RIBEIRO JUNIOR (2002), em estudo transversal de base populacional no município de Pedro de Toledo (SP), apontou que foi detectada *Giardia* em 8% das 224 amostras coletadas na população em geral, com prevalência do parasita em menores de 15 anos.

ANTUNES (2004), em estudo sobre a influência da qualidade da água destinada ao consumo humano na incidência de parasitas e no estado nutricional de crianças entre 03 e 06 anos em Ouro Preto (MG), observou a presença de *Giardia* em 2,4% das 84 amostras coprológicas. Embora tenha identificado água fora dos padrões de potabilidade, não encontrou relação estatística com a prevalência de parasitas.

FERREIRA (2004) encontrou *Giardia* em 5% das 900 amostras de fezes coletadas em crianças de Estiva Gerbi (SP) e OLIVEIRA (2004) detectou a presença

deste parasita em 8,4% de 222 amostras coprológicas de crianças de Viçosa (MG), sendo que ambos apontaram as condições precárias de vida como uma vulnerabilidade para a infecção pelo parasita.

HELLER et al. (2004), avaliando resultados de rotina de exames parasitológicos em Viçosa (MG), verificaram cerca de 3500 exames parasitológicos de fezes, encontraram 10,6% de exames positivos para *Giardia lamblia*, resultando em uma prevalência de 2,8%. Segundo a pesquisa, a prevalência de enteroparasitas concentrava-se na faixa etária de 1 a 14 anos e em bairros com precária qualidade de vida e de infraestrutura de saneamento, onde se concentra a população de mais baixa renda.

LADEIA (2004) em um levantamento da ocorrência de *Giardia lamblia* em amostra da população de Montes Claros (MG), verificou a presença do protozoário em 3,62% dos 3.450 exames de fezes.

MALTA (2005), em estudo epidemiológico de parasitas intestinais em quatro creches no município de Votuporanga (SP), verificou que a taxa de prevalência de protozoários foi inversamente proporcional à faixa etária do hospedeiro e ao grau de instrução dos pais, encontrando *Giardia* em 23,9% das 314 amostras de crianças até 7 anos e em 17% das 12 amostras coprológicas de merendeiras.

SADOVSKY (2005), em estudo de agentes infecciosos associados à diarreia aguda em crianças até três anos de idade em um hospital de referência de Vitória (ES), observou a presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* em, respectivamente, 14,8% e 11,4% das 88 amostras coletadas.

SOUZA (2005), em estudo sobre enteroparasitoses em uma localidade com baixo padrão de saneamento e higiene de São Gonçalo (RJ), coletou 188 amostras de fezes da população em geral identificando *Giardia* em 5% das amostras, com destaque para a alta prevalência do parasita em crianças com até 10 anos.

DIAS (2007), em análise epidemiológica em menores de 10 anos de Viçosa (MG), observou *Giardia* em 6,1% das 51 amostras coletadas.

MASCARINI (2007), em trabalho acerca da epidemiologia das enteroparasitoses em creches de Botucatu (SP), analisou *Giardia* em 23,7% e *Cryptosporidium* em 15,6% das 1029 amostras de fezes crianças menores de sete anos. Nos funcionários das creches, o autor detectou *Giardia* em 18,5% e *Cryptosporidium* em 44,4% das 114 amostras. O autor concluiu que as maiores prevalências das enteroparasitoses ocorreram em crianças com baixa renda familiar,

com mães com menos anos de estudo e que tinham animais domésticos. Quanto aos funcionários, os residentes na zona rural apresentavam maior prevalência em relação aos que residiam na zona urbana.

REIS (2007), em estudo sobre fatores de risco de diarreia humana associados às condições de saneamento básico em Ouro Preto (MG), analisou 60 amostras de fezes de crianças de até 6 anos e verificou *Giardia* em 16% delas, associando sua presença ao saneamento precário e à água servida de má qualidade.

TEIXEIRA et al., (2007) também conduziram estudo que mostrou uma prevalência de 18% de giardíase entre crianças residentes em área que apresentava precariedade de saneamento em Juiz de Fora (MG).

GONÇALVES (2008), em estudo de caso-controle sobre a etiologia da diarreia infecciosa em uma população soropositiva para o HIV /doentes pela AIDS em São José do Rio Preto (SP), apontou a positividade de 3,7% para *Giardia* e em 6,6% para *Cryptosporidium* nas 100 amostras coletadas.

SANTOS (2008), em estudo sobre prevalência de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp em crianças de até 5 anos usuárias de creches públicas de Araguari (MG), verificou, respectivamente, positividade em 51,8% e 1,2% das 245 amostras.

BELLOTO (2010), avaliando enteroparasitoses em crianças (2 a 15 anos) de Mirassol (SP), observou prevalência de *Giardia* em 15,2% das 310 amostras coletadas, com o consumo de água mineral se mostrando fator de proteção às infecções por enteroparasitas.

CARVALHO (2011), em trabalho sobre a prevalência de enteroparasitas em duas mil crianças indígenas de até 12 anos no município de São João das Missões (MG), detectou *Giardia* em 18,4% das crianças e poliparasitismo em 39,7% das amostras, apontando como causa as condições sanitárias inadequadas na terra indígena Xakriabá.

RIBEIRO (2011), em inquérito epidemiológico de infecções parasitárias intestinais em trabalhadores rurais canavieiros na regiões de Campinas e ribeirão Preto (SP), analisou amostras de 617 trabalhadores cortadores de cana, detectando *Giardia* em 3,4% e *Cryptosporidium* em 3,2% das amostras.

SUL:

DIAS (2005), em trabalho sobre a prevalência de enteroparasitoses do bairro COHAB Tablada, em Pelotas (RS), encontrou *Giardia* em 5% das 1140 amostras

coletadas em crianças de até quatorze anos, destacando que, quanto mais próxima a moradia da criança em relação à fonte de contaminação (esgoto a céu aberto), maior o risco de infecção (até 153 vezes maior a menos de 300 metros). Resultado semelhante foi encontrado por PEREIRA (2003), que detectou *Giardia* em 13,1% de 1233 amostras de fezes de crianças de 9 a 11 anos de Uruguaiana (RS).

BERNE (2007) estudou a prevalência de enteroparasitoses em crianças de uma creche pública do Rio Grande (RS) e verificou a presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* em, respectivamente, 30,3% e 2,4% das 165 amostras.

RECUERO (2007) observou *Giardia* em 13,6% das 22 amostras de crianças até 12 anos de Capão do Leão (RS).

KRAUSE (2009), avaliando a prevalência e os fatores associados a parasitas intestinais em pacientes atendidos em serviço de assistência especializada de Pelotas (RS), analisou 682 amostras de pessoas portadoras de HIV e detectou *Giardia* e *Cryptosporidium*, respectivamente, em 7,7% e 1,1% das amostras, observando maiores prevalências em pacientes com menor nível econômico, que possuíam animais domésticos e que não usavam antiretrovirais.

NORDESTE:

NEWMAN et al. (1993) constataram a incidência de oocistos de *Cryptosporidium* em até 15% das amostras de episódios diarréicos em uma favela de Fortaleza (CE), onde foram identificados microrganismos em 22% das 18 amostras de água de fonte de abastecimento da comunidade foram positivas para este microrganismo.

PRADO et al. (2003) estudaram a prevalência de giardíase em pré-escolares (de 2 a 45 meses) em Salvador (BA) e identificaram que 13,7% das 694 amostras coletadas estavam infectadas com *Giardia duodenalis*.

TELES (2008), avaliou amostras coprológicas de 1622 pacientes, de ambos os sexos e com idade mínima de cinco anos em três municípios do Ceará, observando positividade de 7,8% para *Giardia* (que foi mais freqüente na faixa etária de 5 a 14 anos) e relação da prevalência do parasita com a pobreza, baixa escolaridade e falta de saneamento.

ARAÚJO (2009), em estudo envolvendo 34 mães e filhos de Natal (RN), detectou a presença de *Giardia* em 19,2% das amostras de fezes das mães e em 40% das amostras dos filhos.

OLIVEIRA (2011), em estudo de prevalência de enteroparasitoses em comunidade carente de Fortaleza (CE), comparou dados anteriores (1992-1996) e posteriores (2010) à implementação de intervenções sanitárias no local, avaliando exames parasitológicos de fezes (EPF) de crianças de até 12 anos em ambos os períodos, verificando que a prevalência de *Giardia* caiu de 22,1% para 4%.

OLIVEIRA (2013), analisando a frequência de parasitas intestinais em 8456 usuários do serviço público de saúde na Mesorregião do Oeste Potiguar (RN), observou a presença de *Giardia lamblia* em 18,6% de 3407 amostras. Nesse estudo, a maior prevalência estava associada às condições de moradia e renda mensal domiciliar.

NORTE:

MAIA (2006), apesar de detectar *Giardia* em 21,5% de 451 amostras de fezes de crianças até 10 anos atendidas em serviços de saúde da cidade de Manaus (AM), não encontrou relação entre desnutrição e prevalência de parasitoses.

BATISTA (2008), em avaliação do perfil enteroparasitológico de uma comunidade de Porto Velho (RO), analisou 48 amostras de fezes de pessoas entre 1 e 53 anos, verificando a positividade de *Giardia* em 54% das amostras, indicando prevalência do parasita em 43% dos adultos e 60% das crianças pesquisadas. O autor ressalta, ainda, que 54% dos indivíduos apresentaram bi ou poliparasitismo.

GARCIA (2009), em estudo com crianças menores de dois anos em Acrelândia (AC), observou positividade de *Giardia* de 20,5% das 166 amostras coletadas.

CENTRO-OESTE:

OLIVEIRA (2012) avaliou a presença de parasitos entéricos oportunistas em crianças hemodialisadas procedentes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, detectando *Giardia Cryptosporidium* em, respectivamente, 11,5% e em 3,8% das 229 amostras fecais pesquisadas.

Em síntese, a análise destes estudos permitiu observar que os autores indicaram que a prevalência da giardíase e da criptosporidiose verificada em seus estudos, geralmente, esteve associada a um ou mais dos seguintes fatores: contaminação dos mananciais por esgoto doméstico ou água residuária proveniente de instalações de produções animais; aumento súbito da contaminação dos mananciais após intensas chuvas ou degelo; existência de assentamentos humanos a montante da captação do manancial; falhas em fases específicas do tratamento da água; tratamento por processos inadequados aos níveis de poluição dos

mananciais; contaminação da água na rede de distribuição (infiltração de esgotos/águas residuárias).

Adicionalmente, alguns estudos registram o desafio da associação inequívoca entre a ocorrência de surtos e a transmissão de patógenos específicos através da água de consumo, em razão de dificuldades para identificação laboratorial adequada de casos de doenças com quadro diarreico e das ocorrências de protozoários patogênicos nas fontes de água. No Brasil, por exemplo, não foram encontrados dados de notificação que relacionem a ocorrência de surtos de giardíase e criptosporidiose com a ingestão de água, sendo que os dados documentados advém, predominantemente, de pesquisas acadêmicas.

1.5 – Remoção dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* em sistemas de abastecimento de água

A frequência de detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em amostras ambientais (mesmo que em baixas concentrações) e os surtos de doenças de veiculação hídrica descritos anteriormente demonstram que os processos convencionais de tratamento de água para consumo humano não são completamente efetivos na remoção ou inativação de protozoários.

De acordo com LIBÂNIO (2010), a denominação “tratamento convencional” surgiu em 1890 no estado de Ohio (EUA), quando foi recomendada por George Fuller a etapa de clarificação precedendo a filtração para as águas turvas do rio Ohio. A partir daí, a tecnologia que abarcasse aplicação de coagulante na unidade de mistura rápida e as etapas de floculação, sedimentação e filtração passaria a ser denominada “convencional”.

Neste tipo de tratamento (também chamado de ciclo completo), composto das etapas de coagulação, floculação, decantação ou flotação, filtração e desinfecção, a água bruta é coagulada pelo processo de mistura rápida, geralmente com sais de alumínio ou de ferro no mecanismo de varredura, no qual ocorre formação de precipitados do metal coagulante, aprisionando as impurezas. Em seguida, a água coagulada é submetida à agitação lenta para a formação dos flocos com tamanho e massa específica suficiente para que sejam removidos por sedimentação nos decantadores, ou por flotação com ar dissolvido. A água clarificada, produzida nos

decantadores é finalmente filtrada em unidades com escoamento descendente, e posteriormente clorada no processo de desinfecção (LIBÂNIO, 2010).

O tratamento convencional é recomendado para água bruta que apresenta turbidez e cor verdadeira com valores elevados, a qual não seria possível ser tratada pelos tratamentos mais simples. Neste contexto, dados como a turbidez (e, por consequência, a dosagem ótima do coagulante químico) em diversas etapas do tratamento, indicam a quantidade de matéria orgânica e inorgânica em suspensão e podem sinalizar a presença de oocistos e cistos na saída dos filtros (FRICKER e CRABB, 1998).

Os protozoários são bem mais resistentes que bactérias aos efeitos dos agentes desinfetantes e não são inativados com as doses usualmente praticadas no tratamento da água. Todavia, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* apresentam, respectivamente, diâmetros de aproximadamente 8-15µm e 4-6µm, portanto, potencial e significativamente removíveis por processos de separação, ou seja, decantação e filtração (BRASIL, 2006). Em consonância, de acordo com RISEBRO et al. (2007), 20 dos 23 surtos estudados causados por esses protozoários em diferentes locais da Europa foram associados a deficiências na etapa da filtração.

De acordo com o manual “Inspeção sanitária em abastecimento de água” do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), os seguintes critérios são recomendados como indicadores da remoção de protozoários: a) remoção/inativação conjunta, por meio da filtração-desinfecção, de 99,9% (3 log) de cistos de *Giardia*: turbidez da água filtrada inferior a 0,5 uT (unidades de turbidez) para a filtração rápida e 1,0 uT para a filtração lenta (2,5 log de remoção), complementada por desinfecção adequada para inativação equivalente a 0,5 log, controlada pelo tempo de contato, residual de cloro livre e temperatura; b) remoção de 99% (2,0 log) de oocistos de *Cryptosporidium*: turbidez da água filtrada inferior a 0,3 uT para a filtração rápida e 1,0 uT para a filtração lenta.

Estudos têm sido realizados com a finalidade de verificar a eficiência da remoção de cistos e oocistos nesta etapa, dentre os quais, destaca-se o de NIEMINSKI (1997), que testou a remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em sistema por filtração direta e convencional de tratamento de água e obteve médias de remoção de 3,26 log e 3,87 log para *Giardia* no tratamento convencional e filtração direta, respectivamente. As taxas de remoção de

Cryptosporidium foram menores em ambos os sistemas estudados, com 2,25 log de remoção no tratamento convencional e 2,79 log na filtração direta. Segundo a autora, houve correlação da remoção da turbidez e dos protozoários no sistema convencional e no de filtração direta, observando que a redução da turbidez no efluente final foi acompanhada pela redução da concentração dos protozoários.

DUGAN et al. (2001), elaboraram um estudo em sistemas pilotos, com adição de oocistos aos afluentes, em concentrações altas (10^6 oocistos/L). A remoção de *Cryptosporidium* mostrou correlação com a redução de turbidez, apresentando resultados de remoção total entre 1,4 a 2,5 log. Os autores sugeriram, ainda, que o pré-tratamento por coagulação aumenta a remoção no sistema de tratamento convencional.

BASTOS et al. (2002) avaliaram a remoção de *Giardia* e *Cryptosporidium* em três ETA, duas que operam por tratamento convencional e uma por filtração direta. Uma das ETA por tratamento convencional e a outra por filtração direta são abastecidas pelo mesmo manancial, e apresentaram protozoários nos seus efluentes filtrados. No tratamento convencional a remoção de *Giardia* foi de 0,84 a 2,79 log, e *Cryptosporidium* 0,08 a 3,23 log. Na filtração direta a *Giardia* foi encontrada somente em uma amostra, com remoção de 1,39 log, e o *Cryptosporidium* em apenas duas amostras, com taxa de remoção de 0,94 e 1,38 log. Na outra ETA, por tratamento convencional, abastecida por um manancial diferente, não foram detectados protozoários no seu efluente filtrado, mesmo quando a água captada apresentou altos níveis de contaminação de *Giardia* (130 cistos/L) e *Cryptosporidium* (330 oocistos/L).

HELLER et al. (2004) estudaram três ETAs por tratamento convencional, e detectaram protozoários em duas delas, apresentando taxas de remoção que variaram de 1 a 4 log. No que tange a remoção de (oo)cistos por filtração, os autores argumentam que: a) sistemas de tratamento com filtração rápida (ciclo completo ou filtração direta), bem operados e produzindo um efluente com valor $< 0,5$ uT, e sua complementação por desinfecção, podem alcançar um resultado conjunto de remoção e inativação de 3,0 log (99,9%) de cistos de *Giardia*; b) sistemas de tratamento com filtração lenta, bem operados e produzindo um efluente com $< 1,0$ uT, e sua complementação por desinfecção, podem alcançar um resultado conjunto de remoção e inativação de 3,0 log (99,9%) de cistos de *Giardia*; c) sistemas de filtração rápida (ciclo completo ou filtração direta), bem operados e produzindo um

efluente com valor $<0,3$ uT, podem alcançar um resultado de remoção de 2,0 log (99%) de oocistos de *Cryptosporidium*; d) sistemas de tratamento com filtração lenta, bem operados e produzindo um efluente com valor $<1,0$ uT, podem alcançar um resultado de remoção de 2,0 log (99 %) de oocistos de *Cryptosporidium*.

FAGUNDES (2006), em trabalho sobre a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* por meio do tratamento por filtração direta descendente em experimentos de escala de bancada e em instalação piloto, inoculou águas provenientes do lago Paranoá e do córrego do Torto (DF) com oocistos de *Cryptosporidium* (na ordem de 10^2 a 10^3 oocistos/L) e verificou que a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* foi inferior a 2,0 log, sendo que o fator operacional que influenciou de forma mais determinante a remoção desse protozoário foi a utilização de subdosagem de coagulante.

FERNANDES (2007), em estudo sobre a influência do pH de coagulação e dosagem de sulfato de alumínio na remoção de oocistos por filtração direta descendente, verificou de 1,2 a 3,2 log de remoção de *Cryptosporidium*, sendo que o período de amadurecimento do filtro⁶ determinou de 0,1 a 1 log de remoção. Ademais, mesmo com turbidez menor que 0,2 uT, foram encontrados oocistos na água filtrada. Em consonância, FAGUNDES (2006) e NASCIMENTO (2009) alertam para baixas remoções e transpasse de oocistos quando o filtro está em fase de amadurecimento.

FREITAS (2007), avaliando a recirculação de água de lavagem de filtros (ALF) em uma ETA em escala piloto, identificou que a concentração média de (oo)cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. na ALF foi de 1,3 a 4,5 vezes maior do que a da água bruta, sendo verificados de 2,55 a 14,4 cistos/L de *Giardia* e de 1,6 a 15,9 oocistos/L de *Cryptosporidium* na água bruta e de 1,1 a 66 cistos/L de *Giardia* e de 7,28 a 44,2 oocistos/L de *Cryptosporidium* na água de lavagem de Filtro, concluindo que a água de lavagem de filtro pode ser vista como a introdução de perigo na ETA e que a turbidez não apresentou associação com presença de (oo)cistos.

CERQUEIRA (2008), avaliando a remoção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* e de indicadores no tratamento de água por ciclo completo, filtração direta

⁶ Quando um filtro é colocado em operação pela primeira vez, os organismos responsáveis pela remoção efetiva ainda não estão presentes. As duas ou três primeiras semanas de operação do filtro são consideradas período de amadurecimento, e é quando esta camada está se desenvolvendo (Libânio, 2010).

descendente e dupla filtração, em escala piloto, observou remoções semelhantes pelas três técnicas (aproximadamente 2,7 log).

LOPES (2008) em avaliação de parâmetros indicadores da remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas etapas de clarificação no tratamento de água em ciclo completo, verificou uma média de 0,65 log de remoção na decantação e média de 0,85 log de remoção na filtração rápida. Neste estudo, a remoção de oocistos foi influenciada pela turbidez da água, período de amadurecimento do filtro, coagulação e pela concentração inicial de oocistos.

SILVA (2008), em estudo em escala piloto, observou a remoção de 1 a 2 log de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em águas de abastecimento por meio da decantação.

NASCIMENTO (2009), em avaliação em escala piloto, verificou a remoção de 3,0 a 3,5 log de oocistos de *Cryptosporidium* por meio da filtração direta ascendente em areia, não encontrando correlação entre oocistos e turbidez e *E. coli*.

ANDRADE (2010), em trabalho sobre a aplicação de dióxido de cloro para controle de oocistos de *Cryptosporidium* em ETA piloto, observou de 1 a 4,0 log de inativação em diferentes concentrações e tempos de contato do desinfetante.

1.6 – Vigilância da qualidade da água e legislações relacionadas a *Giardia* e *Cryptosporidium*

As primeiras iniciativas de diretrizes relacionadas à potabilidade da água foram promovidas pela OMS na década de 1950 (e revisadas nas décadas de 1960 e 1970), elegendo padrões mínimos que poderiam ser alcançados por todos os países, denominadas "*International Standards for Drinking-Water*" (WHO, 1958). No Brasil, o controle da qualidade da água para consumo humano tornou-se uma questão de saúde pública a partir da década de 70, com o decreto federal nº 79.367 de 09/03/1977, que estabelecia como competência do Ministério da Saúde (MS) a definição do padrão de potabilidade da água para consumo humano. As normas e o padrão de potabilidade da água foram instituídos pela portaria nº 56/Bsb/1977, que se constituiu na primeira legislação federal sobre a potabilidade de água para consumo humano editada pelo MS (BRASIL, 1977).

Na década de 1980, a OMS publicou a primeira edição dos seus "*Guidelines for Drinking-Water Quality*" (WHO, 1984), documento que norteou fortemente a revisão da Portaria 56, resultando na publicação, pelo Ministério da Saúde, das novas Normas e o Padrão de Potabilidade de água para consumo humano, a Portaria 36 GM, de 10 de janeiro de 1990 (BRASIL, 1990a).

Contudo, antes mesmo da promulgação da Constituição Federal de 1988, o Ministério da Saúde havia institucionalizado, em 1986, o “Programa Nacional de Vigilância de Qualidade de Água para Consumo Humano”, aprovado pelo Decreto Federal 92752/1986, tendo constatado que apenas o estado do Paraná desenvolvia uma programa de vigilância de forma sistematizada. Os demais estados da federação apenas agiam na questão da qualidade da água em casos de surto por doenças de transmissão hídrica. Na época o programa era então coordenado pela Divisão de Ecologia Humana e Saúde Ambiental da extinta Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 1986).

A partir da promulgação da Constituição Federal de 1988, a fiscalização das águas destinadas ao consumo humano foi atribuída aos órgãos vinculados ao Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 1988). Neste contexto, a lei no. 8.080 (Lei Orgânica da Saúde), de 19 de setembro de 1990, definiu que os órgãos de vigilância sanitária, nos níveis federal, estadual e municipal, são responsáveis pelo conjunto de “*ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde*”, abrangendo, inclusive, o monitoramento da qualidade da água oferecida pelos sistemas de abastecimento (BRASIL, 1990b).

Embora as normas federais passassem a dar atenção diferenciada à potabilidade da água há apenas cerca de 40 anos, a legislação sanitária paulista reconhece a água como elemento essencial à vida e como fator de risco à saúde há, ao menos, 120 anos, sendo que o Decreto Estadual 233, de 1894, que instituiu o primeiro Código Sanitário Paulista, é ilustrativo das relações entre a ciência, o estado regulador e os riscos sanitários associados à água destinada ao consumo humano (VALENTIM, 2015).

Em consonância com tais definições, o Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano do Estado de São Paulo (PROÁGUA) foi criado em 1992, por meio da Resolução Estadual SS 45 (ESP, 1992). As ações do PROÁGUA

consistem no monitoramento da qualidade da água consumida pela população, por meio da avaliação e intervenção nos perigos que as diversas formas de abastecimento oferecem. Para isto, dentre outras medidas, são feitas coletas de amostras de água pelos municípios (a serem submetidas a análises bacteriológicas e físico-químicas para fins de vigilância) e analisados relatórios mensais de controle de qualidade da água, encaminhados às vigilâncias locais pelos responsáveis pelos sistemas de abastecimento de água (POCOL, 2006).

No início da década de 1990, a OMS (WHO, 1993) também publicou a segunda edição do "*Guidelines*", fornecendo subsídios para a revisão da Portaria 36 e, posteriormente, na Portaria MS 1469/2000 (BRASIL, 2000), republicada com pequenas alterações, em março de 2004, como Portaria 518/2004 (BRASIL, 2004; HELLER et al., 2005).

Embora a terceira e quarta edição dos "*Guidelines*" não tenham trazido grandes alterações em termos de número de substâncias regulamentadas, estas edições se caracterizam pela ampliação da concepção sobre a potabilidade e pelo avanço para além de uma mera divulgação de limites para microrganismos e substâncias toleradas na água de consumo humano (WHO, 2004, 2011). Essa mudança de paradigma no controle de qualidade da água foi sistematizada pela OMS na perspectiva da avaliação e gestão de riscos e implementação de Planos de Segurança da Água (PSA), cujos elementos básicos serão descritos no próximo capítulo.

No Brasil, a Portaria 518/2004 foi a primeira legislação que ressaltou preocupações com o monitoramento de *Cryptosporidium* e *Giardia*, assumindo-se que a baixa turbidez, por um lado, propiciava maior eficiência da desinfecção na eliminação de bactérias e vírus e, por outro, era indicativa da remoção de (oo)cistos de protozoários pela filtração, sendo recomendados valores reduzidos para água filtrada (0,5 uT), “com vistas a assegurar a adequada eficiência de remoção de enterovírus, cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* sp” em instalações compostas por filtros rápidos (BRASIL, 2004).

A partir da implementação da Portaria nº 2914 (BRASIL, 2011), que substituiu a de nº 518, ficou determinado que, quando identificada média geométrica anual igual ou maior que 1000 *Escherichia coli* (*E. coli*) por 100mL, deve-se realizar o monitoramento de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nos pontos de captação de água. São ainda estabelecidos valores de turbidez em função da média

aritmética de oocistos de *Cryptosporidium* – a qual deve ser de no máximo 3,0 oocistos/L nos pontos de captação de água, considerando um número mínimo de 24 amostras, coletadas uniformemente, por um período mínimo de um ano (BRASIL, 2011).

Vale notar que a legislação relaciona a aferição da qualidade microbiológica da água com a verificação da presença/ausência de organismos indicadores de contaminação (como a *E. coli*), contudo, essa abordagem é insuficiente, haja vista que microrganismos como *Giardia* e *Cryptosporidium* são resistentes aos processos de desinfecção que eliminam tais bactérias, conforme discutido no capítulo anterior. Neste sentido, devido à facilidade de aderência dos (oo)cistos a compostos orgânicos e material particulado, sua presença tem sido associada ao grau de turbidez da amostra, de forma que, quanto maior a turbidez, maior a possibilidade de se encontrar o microrganismo, tanto na água bruta como na água tratada (STANDRIDGE, 2008).

Diante dos diversos casos relatados de giardíase e criptosporidiose relacionados com o consumo de água, as autoridades sanitárias de diversos países estabeleceram recomendações e padrões para o monitoramento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Em países desenvolvidos, por exemplo, onde os recursos são mais abundantes e há menos dificuldades relativas à implementação de métodos de detecção e identificação de protozoários em águas, as legislações vigentes são mais específicas e determinam metas claras, além do uso de programas de monitoramento para atingir o objetivo de proteção à saúde pública (HELLER et al., 2007).

Neste sentido, as legislações australiana (NHMRC, 2011) e canadense (HC, 2014) enfatizam a implementação do uso de barreiras múltiplas como forma de prevenir e controlar a transmissão desses microrganismos patogênicos, não apontando níveis de remoção.

Nos EUA, a legislação americana tem estabelecido, através da sua Agência de Proteção Ambiental, o monitoramento para esses protozoários, determinando níveis de remoção de 3 log (99,9%) para *Giardia* e 2 log (99%) para *Cryptosporidium* (USEPA, 1989, 1991, 1998), posteriormente associando “créditos” de remoção atribuíveis às diversas técnicas de filtração e que devem ser confrontados com o tratamento requerido, de acordo com a concentração de *Cryptosporidium* no mananciais de abastecimento (USEPA, 2006).

No Reino Unido, a agência *Drinking Water Inspectorate* definiu que os sistemas de abastecimento de água que apresentam fatores de vulnerabilidade para contaminação biológica são obrigados a realizar monitoramentos contínuos da água tratada, sendo o limite estabelecido de um oocisto em 10 litros de água tratada (DWI, 2005).

Em Portugal a regulação da qualidade da água para consumo humano é definida pelo Decreto-Lei 306 (PORTUGAL, 2007), que define que, caso *Clostridium perfringens* ou seus esporos sejam detectados, deve ser investigado todo o sistema de abastecimento para identificar outros microrganismos patogênicos, incluído *Cryptosporidium*.

Na Espanha, o Decreto Real 140/2003 estabelece que, na saída das estações de tratamento de água para consumo humano, deve ser pesquisada a presença de *Cryptosporidium* quando detectado *Clostridium perfringens* e o valor de turbidez for superior a 5 uT (ESPAÑA, 2003).

1.7 – Avaliação quantitativa de risco microbiológico e segurança da água

A avaliação de riscos apresenta-se como uma ferramenta importante para auxiliar e orientar o processo decisório de controle e prevenção da exposição de populações e indivíduos a diversos agentes ou situações perigosas a saúde (HAAS et al., 2014). Neste cenário, de acordo com CARMO et al. (2008), a água destinada ao consumo humano que contenha agentes patogênicos caracteriza um perigo, enquanto seu fornecimento à população traz um risco, que pode ser quantificado e expresso em termos de probabilidade de ocorrência de uma enfermidade, por exemplo, casos de DDA ou incidência de giardíase e criptosporidiose.

A função principal da avaliação de riscos é prover informações completas aos planejadores e reguladores para que possam tomar decisões baseadas na melhor informação possível. Para tanto, esta avaliação agrega os dados científicos pertinentes a um determinado risco à saúde, incluindo toxicologia, epidemiologia, degradação ambiental e exposição, não configurando uma meta por si só, mas parte de um ciclo iterativo que usa a avaliação de riscos para derivar decisões de gestão

(incluindo a definição de padrões de qualidade) que, quando implementadas, resultam num incremento da segurança e redução do risco (WHO, 2011).

A avaliação de risco microbiológico (ARM) é um processo que avalia a probabilidade de efeitos adversos à saúde humana que podem ocorrer após a exposição a microrganismos patogênicos ou a um ambiente no qual há a presença de patógenos. Na medida do possível, o processo da ARM inclui avaliação e consideração de informações quantitativas, contudo, informações qualitativas também são empregadas quando conveniente (SOLLER, 2006).

Avaliações quantitativas de risco microbiológico (AQRM) podem ser usadas para estimar o risco de infecção em decorrência da exposição a microrganismos patogênicos, assim como expressar, quantitativamente, os possíveis efeitos resultantes dessa exposição, como doença ou morte (GERBA, 2000; RAZZOLINI e NARDOCCI, 2006; PARKIN, 2007; HAAS et al., 2014). De maneira geral, a AQRM consiste de quatro etapas:

a) Identificação do perigo: segundo HAAS et al. (2014), tal etapa consiste na identificação do microrganismo, bem como suas possíveis rotas de transmissão (padrão de ocorrência dos patógenos nos mananciais, persistência e remoção pelo tratamento da água, por exemplo), entendimento do processo de adoecimento (da virulência, ciclo de vida e características do microrganismo até seus efeitos agudos e crônicos no hospedeiro) e desenvolvimento e uso de ferramentas de diagnóstico (clínico e epidemiológico) e tratamento/prevenção.

Em suma, é o processo que determina o microrganismo patogênico de interesse e seus efeitos à saúde humana, que podem variar desde uma infecção assintomática até a morte, a depender da interação das características de ambos, ou seja, da virulência do microrganismo e da resposta imunológica do hospedeiro - os quais, por sua vez, dependem de outros fatores, como a natureza e quantidade do patógeno e a existência de doenças crônicas que tornem o hospedeiro mais suscetível (WHO, 2011).

Embora não possa ser negligenciado em nenhuma população, no que tange a presença de microrganismos na água de consumo humano, a tendência tem sido considerar o perigo da infecção na população em geral, em função das dificuldades de quantificar tal perigo em populações mais suscetíveis (WHO, 2011).

b) Avaliação da Exposição: esta etapa pretende estimar a intensidade, frequência e a duração da exposição humana, bem como a rota, a distribuição e a

concentração de determinado agente presente num cenário de exposição. Particularmente, no que se refere à água de consumo humano, tal etapa se compõe a partir da estimativa dos níveis de determinados microrganismos na água bruta em comparação com a estimativa das prováveis alterações nas concentrações microbianas depois do armazenamento, tratamento e distribuição para o usuário final, bem como considera a quantidade de microrganismos ingeridos a partir de um consumo médio de água potável por pessoa por dia (HAAS et al., 2014). Outros fatores que poderiam ser levados em conta na avaliação incluem o impacto em potencial das condições ambientais e/ou a confiabilidade do tratamento da água, assim como fatores influenciando os padrões de exposição, como nível socioeconômico, etnia, sazonalidade, características demográficas da população, diferenças regionais e/ou preferências e comportamento do consumidor (SOLLER, 2006).

c) Avaliação de Dose-Resposta: utilizando dados epidemiológicos coletados em estudos de coorte, caso-controle, experimentais ou de surtos de doença, se estabelecem modelos matemáticos para a relação entre a dose recebida de determinado agente e o risco de ocorrência de consequências adversas à saúde em populações expostas (HAAS et al., 2014).

d) Caracterização do risco: combina as informações sobre a exposição e dose-resposta em uma estimativa global de risco de efeitos adversos. Desta forma, a caracterização do risco representa a integração da identificação do perigo, a avaliação de exposição e a avaliação de dose-resposta para que seja possível determinar o risco de infecção, de doença e de morte (HAAS et al., 2014).

Portanto, o processo de caracterização do risco resulta em uma estimativa qualitativa ou quantitativa da probabilidade e severidade dos efeitos adversos que podem ocorrer em dada população, incluindo as incertezas associadas a essas estimativas (SOLLER, 2006).

O risco de infecção com oocistos e cistos de protozoários em água de consumo depende, portanto, de fatores como o número de cistos e oocistos viáveis ingeridos (dose), da virulência e infectividade dos oocistos e cistos e da susceptibilidade da população hospedeira, que varia de acordo com a idade, estado imunológico, histórico de exposição anterior e outros fatores genéticos e ambientais (WHO, 2011).

Sumarizando as etapas supracitadas, apresenta-se abaixo um diagrama (Figura 3) do processo metodológico da AQRM, produzido por MARKS et al. (1998) e adaptado por RAZZOLINI e NARDOCCI (2006).

Figura 3 - Diagrama do processo metodológico da avaliação quantitativa de risco microbiológico.

Fonte: MARKS et al. (1998), adaptado por RAZZOLINI e NARDOCCI (2006)

Vale notar que a avaliação de risco não é usada de forma isolada, mas faz parte de uma abordagem maior, denominada análise de risco, a qual compreende, além da avaliação, outros dois procedimentos, descritos a seguir:

Gestão do risco: pesa alternativas de ação a partir da informação gerada pela avaliação de riscos e, se necessário, seleciona e implementa opções de controle adequadas, incluindo medidas reguladoras. A gestão de riscos é um processo de tomada de decisões que vincula considerações políticas, sociais e econômicas às informações relacionadas ao risco, a fim de desenvolver respostas apropriadas. (SOLLER, 2006).

Comunicação do risco: é a troca iterativa de informações relacionadas à gestão de um determinado risco entre os gestores e as partes interessadas, tais como agências governamentais, corporações, associações, mídia, cientistas, comunidade e cidadãos, fazendo uso desde meios de comunicação e etiquetas de perigo em produtos, até reuniões ou audiências públicas (SOLLER, 2006).

Note-se que o Plano de Segurança da Água, citado anteriormente, corresponde à tradução e à sistematização da análise de risco aplicada ao abastecimento de água para consumo humano. O PSA é definido como instrumento que identifica e prioriza perigos e riscos em um sistema de abastecimento de água, desde o manancial até o consumidor, visando estabelecer processos para verificação da eficiência da gestão dos sistemas de controle e da qualidade da água produzida (WHO, 2011).

Tais planos visam garantir a qualidade da água para consumo humano por meio da identificação e minimização do risco de contaminação dos mananciais superficiais e subterrâneos, da redução ou remoção da contaminação pelo tratamento da água e da prevenção da contaminação durante a reservação e a distribuição da água (VALENTIM, 2015).

Em síntese, o PSA estabelece medidas para eliminar ou reduzir esses riscos por meio de planos preventivos que propõem barreiras para proteção do manancial, otimização do processo de tratamento e proteção do sistema de abastecimento contra recontaminação (WHO, 2011).

Através da Portaria 2914/2011, o Brasil incorporou o PSA na legislação nacional, impondo-o como tema de debate no país, dando relevo aos seus princípios, dos quais se destaca a abordagem sistêmica e ampliada do processo de produção da água, para além da avaliação rotineira, muitas vezes fragmentária, da potabilidade da água (VALENTIM, 2015).

Dentre as etapas do PSA, a identificação de perigos e caracterização de riscos são atividades e etapas fundamentais, haja vista que apenas através da caracterização da qualidade dos pontos de captação, com a identificação dos perigos e a avaliação de riscos, é possível priorizar as ações e alocação de recursos nos pontos críticos (BRASIL, 2012), como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 – Etapas para o desenvolvimento de um Plano de Segurança da Água.

Fonte: BRASIL, 2012

Evidencia-se que a AQRM e o PSA configuram-se como ferramentas importantes para avaliação e gestão do risco representado pela presença de microrganismos patogênicos em águas de consumo, contudo, valores calculados de risco (probabilidade de infecção, neste caso), por si só, são essencialmente desprovidos de significado, a menos que sejam interpretados através da estrutura das suposições do modelo e das circunstâncias da população exposta, ou seja, pela comparação do valor calculado com alguma referência de risco tolerável (USEPA, 2012a, WHO, 2006, 2011).

De acordo com HUNTER e FEWTRELL (2001), o risco pode ser considerado tolerável em pelo menos uma das seguintes situações: 1) apresenta-se abaixo de um limite estabelecido arbitrariamente e do que é tolerável; 2) está abaixo de uma fração do total de carga de doença na comunidade; 3) o custo para redução do risco excederia o valor economizado e, portanto, seria mais bem gasto em outras ações de promoção a saúde pública; 4) os profissionais de saúde e os responsáveis de políticas públicas dizem que é aceitável; e 5) o público em geral ou políticos consideram o risco aceitável (ou, pelo menos, não o consideram inaceitável).

O conjunto de regulamentações da USEPA (2006) e as diretrizes da OMS (WHO, 2011) costumam servir de referência internacional sobre os riscos microbiológicos toleráveis relacionados à água para consumo humano. A USEPA, por exemplo, estabeleceu um risco tolerável de menos de 1 infecção por 10 mil pessoas por ano (10^{-4}), utilizando *Giardia* como organismo de referência, em razão de sua resistência aos processos de desinfecção da água ser maior que a maioria dos outros patógenos microbianos (MACLER e REGLI, 1993). Desta forma, a proteção contra a infecção por *Giardia* deveria fornecer proteção contra outros microrganismos, embora *Cryptosporidium* tenha desafiado este “status” desde então (HUNTER e FEWTRELL, 2001).

De acordo com a OMS (WHO, 2011), a perspectiva de risco é medida pelo indicador “DALY”, acrônimo em língua inglesa para “*Disability Adjusted Life Years*”, o qual permite a transformação de uma incapacidade vivenciada durante um certo tempo (por exemplo, três dias com diarreia ou óbito devido à diarreia) em “anos de vida saudáveis perdidos”.

Para doenças diarreicas de veiculação hídrica, a OMS estabelece uma carga tolerável de 10^{-6} DALY por pessoa por ano, ou seja, um doente a cada milhão de pessoas por ano. Contudo, a própria OMS argumenta que, quando a carga da doença por várias vias de exposição (água, alimentos, ar, contato direto, etc.) é muito alta, o estabelecimento de 10^{-6} DALY por pessoa por ano de um nível da carga de doença por exposição hídrica terá pouco impacto sobre a carga global de doenças. Neste caso, a definição de um nível de risco aceitável menos rigoroso, tal como 10^{-5} ou 10^{-4} DALY por pessoa por ano, para exposição através da água potável, é mais realista e consistente com a meta de proporcionar a água mais segura e de alta qualidade (WHO, 2011).

2 - OBJETIVOS

Ante a importância da qualidade microbiológica das águas de abastecimento público bem como seu potencial para transmissão de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* pela ingestão, este estudo tem como objetivos:

1. Quantificar cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água bruta no ponto de captação de água para abastecimento público do município de Cajamar-SP;
2. Caracterizar genotipicamente os (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* detectados nas amostras de água bruta;
3. Estimar o risco anual de infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium* via ingestão de água em adultos (maiores de 21 anos) e crianças (menores de 5 anos);
4. Levantar os dados epidemiológicos disponíveis de doenças diarreicas na área de estudo e verificar possíveis correlações com o risco anual de infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium* via ingestão de água.

3.1 – Caracterização da Área de Estudo

O município de Cajamar (Latitude 23°21'23.44"S, Longitude 46°52'36.73"O) localiza-se na RMSP, a 32 km do centro da capital (Figura 5). Segundo dados do IBGE (2010), a população era de 64.114 habitantes, o que resulta numa densidade demográfica de 493,5 hab/km, dividindo-se em três distritos: Sede (Centro), Polvilho e Jordanésia.

Figura 5 - Região Metropolitana de São Paulo e localização da área de estudo.

Fonte: IBGE, 2010

De acordo com o mais recente Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil (BRASIL, 2013), a população de Cajamar é predominantemente urbana (98%) e a estrutura etária de sua população é composta por 70% de pessoas na faixa de 15 a 64 anos, sendo observada uma diminuição de mais de 11%, entre 1991 e 2010, na faixa de residentes com menos de 15 anos, conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Estrutura Etária da População na área de estudo, Cajamar-SP, 1991, 2000 e 2010.

Estrutura Etária / Ano	1991		2000		2010	
	População	%	População	%	População	%
Menos de 15 anos	13.412	36,93	15.609	30,75	16.346	25,50
15 a 64 anos	21.944	60,43	33.461	65,92	44.958	70,12
População de 65 anos ou mais	958	2,64	1.691	3,33	2.810	4,38

Fonte: BRASIL, 2013

Em relação à mortalidade infantil (mortalidade de crianças com menos de um ano) o município passou de 29 casos por mil nascidos vivos em 1991 para 17,0 por mil nascidos vivos em 2010. Vale ressaltar que, em 2010, as taxas de mortalidade infantil do estado e do país eram 13,9 e 16,7 por mil nascidos vivos, respectivamente, e que, segundo os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio das Nações Unidas, a mortalidade infantil para o Brasil deve estar abaixo de 17,9 óbitos por mil em 2015 (BRASIL, 2013).

Situado na encosta da Serra da Cantareira, entre a serra do Japi e a serra dos Cristais, possui 128 Km² de área e parte do seu território é considerada área de proteção ambiental (CAJAMAR, 2011). Faz fronteiras com os municípios de Pirapora do Bom Jesus, Santana do Parnaíba, São Paulo, Caieiras, Franco da Rocha e Jundiaí e as principais vias de acesso são as rodovias Anhanguera e Bandeirantes, que interligam o município à Capital e ao interior do Estado. Cajamar também pode ser acessado a partir da rodovia Castelo Branco, via Santana do Parnaíba e Estrada dos Romeiros (CAJAMAR, 2011).

Quanto ao clima, segundo a Classificação Climática de Koeppen, Cajamar está enquadrado como clima tropical, com verão quente, sem estação seca de inverno. A figura 6 apresenta os dados de comportamento da chuva e da temperatura ao longo do ano para o município.

Figura 6 – Médias mensais de precipitação e temperaturas máximas e mínimas para o município de Cajamar-SP.

Fonte: CLIMATEMPO⁷

Embora o clima predominante seja tropical central, dada a sua altitude elevada (cerca de 700 metros), seus padrões climáticos assemelham-se, em diversos aspectos, ao clima tropical de altitude, sendo que as temperaturas médias não excedem os 25°C e o índice pluviométrico mantém-se em torno dos 50 mm médios nos meses com temperaturas mais baixas. O regime dos rios retrata esta contribuição do clima, havendo significativa variação de vazões na rede hídrica em função das diferenças entre o período de estiagem, de abril a setembro, e o de chuvas, de outubro a março (CAJAMAR, 2011).

Em relação à hidrografia, o município está quase totalmente inserido na bacia do rio Tietê Alto - Zona Metropolitana. Sua rede hídrica é configurada da seguinte forma: o rio Juqueri escoar no sentido leste-oeste, afluindo no reservatório do Rasgão, no rio Tietê, em Pirapora do Bom Jesus; o córrego da Lavrinha atravessa a sede e afluente pela margem esquerda ao ribeirão dos Cristais; o córrego Tanquinho deságua no Tietê, após a confluência do Juqueri; os afluentes do rio Jundiá se afastam para noroeste; por fim, o ribeirão dos Cristais, desenvolve-se no sentido norte-sul e, embora tenha suas nascentes no município de Caieiras, está quase totalmente inserido no território de Cajamar, configurando-se como seu principal manancial, com uma área total de 124,0 km² (CAJAMAR, 2011).

⁷ <http://www.climatempo.com.br/climatologia/2183/cajamar-sp>

O ribeirão dos Cristais (também chamado Rio Juqueri-Mirim) é enquadrado na classe 3 pelo Decreto Estadual 10.755 de 22/11/1977 (ESP, 1977), o que significa dizer que, em suas águas, não podem ser lançados efluentes, mesmo tratados, ou materiais flutuantes, inclusive espumas não naturais, conforme Decreto nº 8468/1976 (ESP, 1976) e que o uso de suas águas para o abastecimento público requer, pelo menos, tratamento convencional, conforme resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005).

A ETA Cristais (Latitude 23°19'54.98"S, Longitude 46°49'30.44"O) tem capacidade de até 110,0 L/s, capta água do ribeirão dos Cristais e efetua tratamento convencional. Posteriormente, a água tratada é entregue para três adutoras (reservatórios Jordanésia, Zona Baixa de Polvilho e Cajamar Sede) e distribuída (CAJAMAR, 2011).

Durante os 15 anos de operação desta ETA (que foi construída pela iniciativa privada em 1996 e, atualmente, é operada pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP), os problemas de disponibilidade hídrica ocorreram quando a vazão do manancial foi reduzida para 60,0 L/s em alguns períodos do ano (CAJAMAR, 2011).

Em 1999, devido ao relato de problemas freqüentes relacionados à qualidade da água do ribeirão dos Cristais, foi estabelecido um ponto de coleta a montante da ETA (CRIS 03400) e o mesmo tem sido monitorado pela rede de Monitoramento da Qualidade de Águas Interiores do Estado de São Paulo da Agência Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Desde então, tal ponto de coleta têm apresentado concentrações de oxigênio dissolvido (OD), coliformes termotolerantes (CTT) e fósforo total não conformes com os limites para a classe 3 da Resolução CONAMA 20/86 (BRASIL, 1986), indicando que o manancial tem sido impactado por esgoto doméstico sem tratamento (CETESB, 2015).

A seguir, apresentam-se as Figuras 7 e 8, com a localização do ribeirão dos Cristais na RMSP e da ETA Cristais e de sua captação.

Figura 7 – Localização do ribeirão dos Cristais na Região Metropolitana de São Paulo.

Fonte: CETESB, 2006

Figura 8 – Localização da ETA Cristais e sua captação.

Fonte: Google Earth

3.2 – Amostragem

As amostras de água foram coletadas semanalmente no ponto de captação da ETA Cristais durante um período de 12 meses (de 16/05/2013 a 21/05/2014), totalizando 48 amostras. A figura 9 apresenta um panorama do ponto de captação da ETA ribeirão dos Cristais e seu entorno.

Cada amostra consistiu na coleta de 10L de água bruta diretamente no manancial, divididos em dois frascos de polipropileno com capacidade de 5L, limpos e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Posteriormente, os frascos contendo as amostras eram transportados para o Laboratório de Biologia Ambiental (LBA) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sob-refrigeração (0 °C a 8 °C), onde eram analisadas para a presença de bactérias indicadoras de contaminação fecal e de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, dentro de um período máximo de 24 horas.

Figura 9 – Panorama do ponto de captação da ETA ribeirão dos Cristais e seu entorno.

3.3 – Detecção e caracterização de microrganismos

3.3.1 – Detecção e quantificação de *Giardia* e *Cryptosporidium* pelo Método EPA 1623.1

Para quantificação dos (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* foi utilizada a técnica de filtração/IMS/FA pelo Método EPA 1623.1 (USEPA, 2012b), descrito no **anexo I**.

3.3.2 – Extração de DNA e caracterização molecular de *Giardia* e *Cryptosporidium*

3.3.2.1 – Extração de DNA de *Giardia* e *Cryptosporidium*

A extração do DNA genômico de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foi realizada pelo Laboratório de Prática de Saúde Pública do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública/USP, utilizando o *kit* comercial *QIAamp DNA Stool Mini*® (Qiagen, Venlo, The Netherlands) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante com modificações no tempo de aquecimento com tampão de lise, que foi realizado a 95°C por 10 minutos para todas as amostras, e armazenamento dos DNAs purificados em freezer -20°C até o momento do uso.

3.3.2.2 – Caracterização Molecular de *Giardia*

A técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real, utilizada para detecção de *Giardia intestinalis* genótipos A e B, encontra-se descrita no **anexo II**. Os cistos/L não foram quantificados utilizando-se esta metodologia.

3.3.2.3 – Caracterização Molecular de *Cryptosporidium*

As técnicas de amplificação do DNA de *Cryptosporidium* spp através de *Nested Polymerase Chain Reaction* (*Nested PCR*), sequenciamento e análises filogenéticas dos fragmentos amplificados, encontram-se descritas no **anexo III**. Os oocistos/L não foram quantificados utilizando-se esta metodologia.

3.3.3 – Quantificação de CTT e *E. coli*

A presença de bactérias indicadoras de contaminação fecal (CTT e *E. coli*) foi verificada utilizando a técnica de número mais provável (NMP)⁸ nas amostras coletadas através de ensaio cromogênico, empregando o kit Colilert (Iddex), utilizando técnica adaptada a partir do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005) SM 9223, conforme descrito no **anexo IV**.

3.4 – Estimativa de risco

Essa etapa foi realizada em conjunto com o Núcleo de Pesquisas em Avaliação de Riscos Ambientais (NARA)⁹ da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. O cenário proposto para a estimativa do risco de infecção pela ingestão de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* presentes na água tratada foi calculada a partir dos dados de concentração dos patógenos obtidas pelo Método EPA 1623.1 (USEPA, 2012b) a partir das amostras de água bruta coletada no ponto de captação da ETA Cristais; eficiência de remoção desses (oo)cistos durante o processo convencional de tratamento da água; modelo dose-resposta; e taxa de ingestão diária de água, tanto para crianças (menores de 5 anos) como para adultos (maiores de 21 anos). A figura 10 apresenta, resumidamente, o processo metodológico empregado neste trabalho, sendo que as etapas são pormenorizadas na sequência:

⁸ NMP é um método que permite estimar a densidade de microrganismos viáveis presentes em uma amostra sob análise. Esta técnica não permite a contagem "fixa" de células viáveis ou de unidades formadoras de colônias (UFC), como acontece com a técnica de contagem em placas.

⁹ www.fsp.usp.br/nra

Figura 10 - Diagrama de processo metodológico empregado neste trabalho.

3.4.1 - Concentração dos patógenos

Os dados obtidos durante o monitoramento foram ajustados pelo método de máxima verossimilhança, considerando quatro famílias de distribuição Triangular, Lognormal, Gama e Weibull, usando modelo apropriado para dados censurados das amostras com concentrações abaixo do limite de detecção (LD)¹⁰. As distribuições Lognormal, Gama e Weibull foram ajustadas utilizando-se as implementações do pacote "fitdistrplus" R (DELIGNETTE-MULLER et al., 2014) e a distribuição triangular foi ajustada utilizando uma rotina especializada desenvolvida pelo NARA, fazendo uso de um ambiente para computação estatística¹¹ denominado "R" (2014).

¹⁰ Devido às limitações inerentes dos métodos analíticos de mensuração, dados de exposição ambiental podem apresentar observações abaixo de um certo limite de detecção, sendo denominados, estatisticamente, como "limite de detecção," "censurados à esquerda" ou, simplesmente, "censurados" (CHRISTOFARO e LEÃO, 2014).

¹¹ <https://www.r-project.org/>

3.4.2 - Remoção dos patógenos durante o processo de tratamento

Para a remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* através do processo convencional de tratamento de água para consumo humano, adotamos a eficiência calculada por NIEMINSK (1997) de, respectivamente, 3 e 2 logs.

3.4.3 - Taxa de ingestão

Para a taxa de ingestão de água para a região sudeste brasileira, foi utilizada aquela calculada no estudo de KAHN e STRALKA (2009), na qual se considerou o consumo de água por peso e por faixa etária (menores de 5 anos e maiores de 21 anos). Naquele estudo, o melhor ajuste para a taxa de ingestão de água foi a distribuição log-normal, com média de 0,44L/dia e desvio padrão (DP) de 0,92L/dia para menores de 5 anos e média de 1,5L/dia, com DP de 0,80 L/dia para maiores de 21 anos.

3.4.4 - Modelo de dose-resposta

Para os patógenos estudados, o modelo de dose-resposta aplicado foi o exponencial, que considera que a densidade de microrganismos no meio é uniforme; que estes possuem probabilidades independentes e idênticas de sobrevivência até iniciar um foco infeccioso (r); e que um único microrganismo é capaz de iniciar um foco infeccioso. Tal distribuição foi triangular, adotando o valor de r e os intervalos de confiança (IC95%) apontados no Quadro 3.

Quadro 3 - Modelo exponencial de dose-resposta para *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Protozoário	Valor de r	IC95%	Referência
<i>Giardia</i>	$1,98 \times 10^{-2}$	$9,8 \times 10^{-3} - 3,6 \times 10^{-2}$	ROSE et al. (1991)
<i>Cryptosporidium</i>	$4,19 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-3} - 8,52 \times 10^{-3}$	DUPONT et al. (1995)

3.4.5 – Risco de infecção

Para o cálculo do risco de infecção diário (P_i), foi utilizado o modelo exponencial, segundo a equação 1.

$$P_i = 1 - \exp(-r \times C \times TI \times 10^{-\log R}) \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

r = parâmetro do modelo de dose-resposta;

C = concentração média de cistos de *Giardia* ou oocistos de *Cryptosporidium* (cistos ou oocistos/L);

TI = taxa de ingestão (L/dia);

$\log R$ = eficiência de remoção dos patógenos durante o processo de tratamento (log).

Considerando que o risco de uma segunda exposição é estatisticamente independente do risco da primeira exposição, para o cálculo do risco anual (P_a) de infecção foi considerado a combinação de sucessivas exposições diárias como eventos independentes, conforme equação 2:

$$P_a = 1 - \prod_{j=1}^{365} (1 - P_i^{(j)}) \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:

P_a = risco anual de infecção;

n = número de vezes no ano nos quais a população é exposta.

3.4.6 - Análise de incertezas e variabilidade

As incertezas foram avaliadas e caracterizadas através de análises de sensibilidade, nas quais cada parâmetro utilizado foi analisado separadamente e o impacto de cada um foi avaliado no resultado final (GERBA, 2000).

Para estimativa do risco e análise de variabilidade, utilizou-se a simulação de Monte Carlo, na qual se assume que todos os parâmetros envolvidos na construção do cenário são aleatórios; assim, ao invés de variar cada um desses parâmetros separadamente, utilizando o ambiente computacional R (2014)¹², o qual gerou, aleatoriamente, os valores dos parâmetros (segundo as distribuições de probabilidade assumidas) a partir de funções matemáticas para cálculo do risco a cada tempo.

Esse processo de geração de valores dos parâmetros e cálculo do risco correspondente teve 50.000 iterações, fornecendo, assim, distribuições de probabilidades para os riscos anuais de infecção para adultos (maiores de 21 anos) e crianças (menores de 5 anos) do município de Cajamar-SP.

3.5 – Dados epidemiológicos de DDA na área de estudo

Os dados epidemiológicos de DDA na área de estudo para o período de 2011 a 2015 foram fornecidos pela Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, a partir de consulta ao Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica de DDA (SIVEP – DDA) em 19/01/2016 (por esta razão, os dados apresentados para o ano de 2015 ainda estavam sujeitos a alterações).

¹² Outros softwares podem ser utilizados para a análise de Monte Carlo, tais como @Risk® (Palisade), CrystalBall® (Oracle) ModelRisk® (Vosesoftware).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Ocorrência e caracterização de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em águas captadas para abastecimento público no município de Cajamar-SP

No período compreendido entre 16/05/2013 e 21/05/2014, 48 amostras de água foram coletadas no ponto de captação da ETA Cristais e analisadas para a quantificação de cistos *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. A Tabela 2 mostra os resultados das concentrações (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* e das bactérias indicadoras de contaminação fecal nas amostras de água de captação, os valores de turbidez e ocorrência de chuva nas 24 horas anteriores à coleta (os dois últimos parâmetros foram fornecidos pelos profissionais da ETA Cristais).

Utilizando a técnica de filtração/IMS/FA pelo Método EPA 1623.1, cistos de *Giardia* foram detectados em 83,3% (40/48) das amostras analisadas, sendo que as concentrações variaram desde o LD ($<0,1$ cistos/L) até 8,6 cistos/L (média de 1,2 cistos/L), enquanto que a presença de oocistos de *Cryptosporidium* ocorreu em 37,5% (18/48), com concentrações variando desde o LD ($<0,1$ oocistos/L) até 2,0 oocistos/L (média de 0,35 oocistos/L).

Resultados semelhantes foram encontrados pela CETESB, que realizou, entre 2000 e 2001, um acompanhamento bimestral de *Giardia* e *Cryptosporidium* no ribeirão dos Cristais. Em 2000, o órgão ambiental demonstrou que o corpo d'água encontrava-se contaminado por *Giardia*, detectada nos meses de março, maio e julho (CETESB, 2001). Em 2001, *Giardia* foi detectada em todas as amostras realizadas (março, maio, julho e novembro), variando de 3,7 a 35,8 cistos/L e, em março, também foi registrada a ocorrência do *Cryptosporidium*, na concentração de 0,4 oocistos/L (CETESB, 2002).

Contemporaneamente ao estudo anterior, HACHICH et al. (2000) avaliaram as concentrações de *Giardia* e *Cryptosporidium* em 28 mananciais da Rede Básica de Monitoramento do Estado de São Paulo, dentre os quais, o ribeirão dos Cristais foi considerado um dos mais críticos entre os avaliados, com densidade máxima de 176 cistos/L de *Giardia*, não tendo encontrado *Cryptosporidium* nas amostras deste ponto. Os autores apontam ainda a possibilidade dos dados serem subestimados, pois o método empregado possuía uma baixa recuperação (15% a 20%) dos cistos de *Giardia* nas amostras ambientais.

Tabela 2 – Concentrações de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água bruta, CTT, *E. coli*, média de turbidez e ocorrência de chuva nas 24 horas anteriores ao dia da coleta no município de Cajamar-SP, 2013-2014.

Amostra	Data	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	CTT	<i>E.coli</i>	Turbidez	Ocorrência de chuva nas 24 horas anteriores
		Cisto/L	Oocisto/L	NMP/100mL	NMP/100mL	Média no dia (uT)	
1.	16.05.13	0,3	<0,1	1,1.10 ⁴	4,6.10 ³	7,15	Não
2.	22.05.13	0,2	<0,1	2,4.10 ³	2,5.10 ³	10,04	Não
3.	29.05.13	<0,1	<0,1	1,6.10 ³	4,1.10 ²	33,59	Sim
4.	05.06.13	<0,1	<0,1	1,4.10 ³	1,4.10 ³	8,14	Não
5.	11.06.13	1,2	0,1	4,9.10 ²	2,4.10 ²	6,89	Não
6.	19.06.13	<0,1	<0,1	1,4.10 ²	1,2.10 ²	8,09	Não
7.	26.06.13	1,6	<0,2	1,0.10 ⁴	3,0.10 ³	449,09	Sim
8.	03.07.13	0,3	0,3	2,1.10 ³	4,1.10 ²	146,19	Sim
9.	10.07.13	0,2	0,1	1,1.10 ³	6,2.10 ²	8,22	Não
10.	17.07.13	0,3	<0,1	8,2.10 ³	7,3.10 ³	6,81	Não
11.	24.07.13	<0,1	<0,1	5,7.10 ³	2,8.10 ²	16,64	Sim
12.	31.07.13	0,6	<0,1	4,3.10 ⁴	9,5.10 ³	25,79	Não
13.	07.08.13	0,6	<0,1	1,8.10 ³	1,1.10 ³	8,06	Não
14.	14.08.13	0,6	0,2	3,7.10 ³	2,4.10 ³	7,24	Não
15.	21.08.13	1,1	<0,1	7,4.10 ²	4,3.10 ²	5,85	Não
16.	28.08.13	0,2	<0,1	6,6.10 ³	3,3.10 ³	6,4	Não
17.	04.09.13	1,4	0,1	6,6.10 ³	3,3.10 ³	8,67	Sim
18.	11.09.13	<0,1	<0,1	4,9.10 ³	1,3.10 ³	8,79	Sim
19.	18.09.13	2,6	0,1	7,1.10 ³	2,2.10 ³	15,77	Sim
20.	25.09.13	3,3	0,1	2,0.10 ³	7,0.10 ²	11,21	Sim
21.	02.10.13	1,8	<0,1	7,1.10 ⁴	7,7.10 ⁴	505,22	Sim
22.	09.10.13	4,9	0,4	2,9.10 ³	4,8.10 ³	28,33	Não
23.	16.10.13	0,5	0,1	6,0.10 ³	5,2.10 ²	203,86	Sim
24.	23.10.13	0,5	0,1	7,2.10 ³	4,1.10 ²	91,14	Sim
25.	30.10.13	0,1	<0,1	8,6.10 ⁴	9,1.10 ²	9,72	Sim
26.	06.11.13	0,1	<0,1	8,6.10 ⁴	9,8.10 ³	36,97	Sim
27.	13.11.13	0,1	<0,1	3,8.10 ³	9,5.10 ²	10,37	Sim
28.	21.11.13	0,6	0,4	1,7.10 ⁴	6,6.10 ³	219,42	Sim
29.	27.11.13	<0,1	<0,1	4,5.10 ³	1,0.10 ³	28,34	Não
30.	04.12.13	0,1	<0,1	8,6.10 ³	1,1.10 ³	12,6	Não
31.	11.12.13	3,3	<0,1	1,2.10 ⁴	3,4.10 ³	39,86	Sim
32.	08.01.14	0,4	<0,1	3,3.10 ³	6,9.10 ²	14,42	Não
33.	15.01.14	8,6	2	1,7.10 ⁴	1,1.10 ⁴	372,36	Sim
34.	22.01.14	0,2	<0,1	3,1.10 ³	7,1.10 ²	46,43	Não
35.	29.01.14	0,4	<0,1	9,2.10 ⁴	6,5.10 ²	43,25	Não
36.	05.02.14	0,5	<0,1	7,9.10 ³	1,8.10 ³	33,34	Não
37.	12.02.14	0,4	<0,1	5,1.10 ²	2,7.10 ²	10,49	Não
38.	19.02.14	0,6	0,2	1,6.10 ⁴	9,6.10 ³	13,21	Não
39.	26.02.14	<0,1	<0,1	7,2.10 ³	1,4.10 ³	52,95	Sim
40.	12.03.14	0,3	0,1	8,2.10 ³	1,2.10 ³	29,52	Não
41.	19.03.14	1,3	0,5	3,1.10 ³	3,6.10 ²	14,24	Não
42.	26.03.14	0,1	<0,1	9,6.10 ³	1,8.10 ³	11,35	Não
43.	02.04.14	5,3	0,9	1,4.10 ⁴	8,6.10 ³	51,94	Não
44.	09.04.14	<0,1	<0,1	2,3.10 ³	7,9.10 ²	9,05	Não
45.	23.04.14	0,3	0,1	7,5.10 ²	1,6.10 ²	11,43	Não
46.	07.05.14	1,3	0,6	2,4.10 ⁴	1,5.10 ³	8,47	Não
47.	14.05.14	0,1	<0,1	6,9.10 ³	1,2.10 ³	8,23	Não
48.	21.05.14	0,4	<0,1	5,0.10 ³	4,1.10 ²	7,71	Não

A ocorrência de protozoários no ribeirão dos Cristais corrobora os dados publicados por outras pesquisas realizadas no Brasil (FRANCO et al., 2001; FRANCO e CANTUSIO NETO, 2002; HACHICH et al., 2004; DIAS et al. 2008; NISHI et al. 2009; FERNANDES et al., 2011; BRANCO et al., 2012) e configura um cenário de preocupação, haja vista que denota a sua circulação no ambiente, representando risco à saúde da população do município de Cajamar, especialmente aos indivíduos que possuem o sistema imunológico vulnerável (MASCARINI, 2007; TEIXEIRA et al., 2007; VOLOTÃO et al., 2007; PÉREZ et al., 2008; KOHLI et al., 2008; GOMES et al., 2010; BORGES et al.; 2011; SANTOS et al., 2012).

De acordo com a CETESB, desde o início dos anos 2000, as principais fontes de poluentes do manancial foram a Penitenciária Mário de Moura de Albuquerque, o Centro Pioneiro em Atenção Psicossocial Arquiteto Januário José Ezemplari (serviço de saúde mental conhecido como “Fazenda São Roque” e destinado à assistência e moradia de cerca de 500 pacientes institucionalizados) e uma favela estabelecida na foz do ribeirão. As amostras de água coletadas à jusante destes aglomerados urbanos apresentam valores elevados de turbidez e alta carga orgânica (CETESB, 2005).

Esses parâmetros apontam para o lançamento de esgotos sem tratamento e que superam a capacidade assimilativa do ribeirão, inferência confirmada no plano de saneamento do município, que informa o lançamento de esgotos *in natura* em 73 pontos de seus cursos d’água, sendo 37 deles diretamente no ribeirão dos Cristais, com uma vazão contribuinte estimada de cerca de 30 L/s (CAJAMAR, 2011).

Cabe ainda salientar que tal cenário de contaminação por esgotos domésticos sem tratamento se manteve inalterado desde a inserção do ribeirão dos Cristais (em 1999) na rede de Monitoramento da Qualidade de Águas Interiores do Estado de São Paulo da CETESB (CETESB, 2015), embora a coleta dos efluentes no município tenha aumentado de 63% em 2011 (CETESB, 2012) para 71% em três anos (CETESB, 2014).

Tais dados tornam evidente que um processo eficiente de coleta e tratamento de esgoto na área do ribeirão dos Cristais diminuiria sensivelmente o aporte de patógenos neste manancial e, conseqüentemente, o risco advindo da sua presença (EDZWALD e KELLEY, 1998; CASTRO-HERMIDA et al., 2008).

É interessante notar que, no presente estudo, bactérias indicadoras de contaminação fecal estiveram presentes em todas as 48 amostras analisadas, sendo

que a concentração de CTT variou de $1,4 \times 10^2$ a $9,2 \times 10^4$ NMP/100mL, com média geométrica de $5,4 \times 10^3$ NMP/100mL.

Desde 1999, de acordo com relatórios de monitoramento da qualidade de águas interiores da CETESB, tal ponto de captação vem, sistematicamente, apresentando valores de CTT acima de 1.000 UFC/100mL. O valor médio entre os anos de 2009 e 2013, por exemplo, foi de $4,9 \times 10^3$ UFC/100mL e de $8,4 \times 10^3$ UFC/100mL em 2014 (CETESB, 2015), acima do limite de 4.000 UFC/100mL estabelecido pela Resolução CONAMA nº 357 para corpos d'água doce da Classe 3, caso do ribeirão dos Cristais (BRASIL, 2005).

A concentração de *E. coli* nas amostras analisadas variou de $1,2 \times 10^2$ a $7,7 \times 10^4$ NMP/100mL, com média geométrica de $1,4 \times 10^3$ NMP/100mL, valor que tornaria necessário o monitoramento de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* neste ponto de captação, de acordo com artigo 31, § 1º, da Portaria 2.914 de 12/12/2011 (BRASIL, 2011), que determina o monitoramento dos protozoários quando for identificada média geométrica anual igual ou maior que 10^3 de *E. coli*/100mL.

Contudo, vale notar que, em 16 das 20 amostras com concentração de *E. coli* abaixo de 10^3 /100mL verificou-se a presença de cistos de *Giardia* e em 10 delas a presença de oocistos de *Cryptosporidium*. Tais dados revelam que, mesmo em amostras com concentração menor que 10^3 de *E. coli*/100mL, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* estiveram presentes, indicando riscos à saúde aos consumidores de água provenientes de fontes sistematicamente contaminadas, como parece ser o caso do ribeirão dos Cristais.

A limitação representada pelo uso de bactérias do grupo coliforme como indicador de protozoários na água é amplamente conhecida; entretanto, por limitações financeiras e analítico-laboratoriais, o monitoramento rotineiro de protozoários é praticamente inviável, principalmente na água tratada, onde, hipoteticamente, esses organismos se fazem presentes em baixas concentrações. Neste contexto, os responsáveis pelo tratamento e controle de qualidade da água recorrem a indicadores da filtração, como a contagem de partículas e, principalmente, a turbidez (BRASIL, 2006).

Quanto a este parâmetro, a análise da Tabela 2 permite notar que os valores de turbidez variaram de 5,8 a 505,2 uT, com média aritmética de 56,7 uT. A Figura

11 apresenta uma comparação visual da turbidez no ponto de captação em diferentes momentos da coleta.

Figura 11 – Comparação visual da turbidez no ponto de captação de água para abastecimento público do município de Cajamar-SP, 2013-2014.

De acordo com o relatório de Monitoramento da Qualidade de Águas Interiores do Estado de São Paulo da CETESB, a turbidez no ponto de captação da ETA Cristais apresentou valor médio de 50 uT entre os anos de 2009 e 2013 e de 17 uT em 2014 (CETESB, 2015). Vale apontar que, segundo a resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005), em recursos hídricos enquadrados como Classes 2 e 3, o valor máximo de turbidez permitido é de até 100 uT, o qual foi ultrapassado em seis (12,5%) das amostras, nas quais ao menos um dos parasitas estava presente (Tabela 2).

A variação dos valores de turbidez no cenário de estudo demonstra que o manancial apresenta características que podem trazer dificuldades durante o processo de tratamento, especialmente na etapa de filtração, considerada a mais importante para a remoção de patógenos como *Giardia* e *Cryptosporidium* (HELLER et al., 2004).

Segundo a OMS (WHO, 2011), em valores elevados (acima de 5,0 UT), a turbidez é perceptível à visão humana e o material particulado pode proteger os microrganismos da desinfecção, considerando que estes têm facilidade em aderir à matéria orgânica e inorgânica que compõem a turbidez, reduzindo a eficiência do processo de tratamento. Por esta razão, o parâmetro pode ser utilizado como indicativo de provável presença de microrganismos, como *Giardia* e *Cryptosporidium*.

FENG et al. (2003) estudaram o efeito da turbidez e das partículas em suspensão na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp, a partir de matrizes de água bruta, observando que, em amostras que apresentavam turbidez de 1,8 uT, a recuperação de oocistos foi de 63,3%, enquanto que, para turbidez de 5,0 uT, o valor de recuperação foi de 85%.

Por outro lado, de acordo com estudo de CRAUN et al. (1998), em um número significativo de surtos de criptosporidiose, a água de consumo cumpria parâmetros propostos pela OMS, tanto para os níveis de *E. coli*, quanto para turbidez. Ademais, em avaliações da qualidade de águas tratadas, foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* e/ou cistos de *Giardia* em valores de turbidez considerados baixos, na faixa entre 0,00 e 0,01 uT (WHO, 2011), evidenciando que o controle de turbidez não é suficiente para substituir o monitoramento dos protozoários na água destinada ao abastecimento.

É interessante notar que a Portaria 2914/2011 estabelece valores de turbidez em função da média aritmética de oocistos de *Cryptosporidium* ($\leq 3,0$ oocistos/L) nos pontos de captação de água, recomendando a obtenção de efluente em filtração rápida com valor de turbidez menor ou igual a 0,3 uT em 95% das amostras mensais ou uso de processo de desinfecção que comprovadamente alcance a mesma eficiência de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp (BRASIL, 2011)

Além da turbidez, estudos têm apontado que vários fatores podem influenciar na concentração de cistos e oocistos na água de mananciais, como as características das bacias, variações pluviométricas, carga de efluentes domésticos,

temperatura, distribuição não homogênea, atividade humana no entorno do manancial e metodologias utilizadas para análise (LECHEVALIER et al., 1991; CANTUSIO NETO, 2004).

No que se refere às variações pluviométricas e sua relação com a concentração de cistos e oocistos no presente estudo, observou-se que 18 das 48 amostras com as maiores concentrações de (oo)cistos foram coletadas nas 24 horas posteriores a precipitações. Isso evidencia a importância deste dado para contextualização da análise das concentrações dos parasitas, haja vista que os mesmos podem ser diluídos ou então retornar à coluna d'água pela ressuspensão dos sedimentos em função da precipitação (ATHERHOLT et al., 1998; ROSE et al., 2002).

Verifica-se pela Tabela 2 que, no período chuvoso compreendido entre 18/09/13 e 23/10/13, foram observadas concentrações elevadas de cistos de *Giardia* (quatro das sete maiores), além de detecção de *Cryptosporidium* em cinco das seis amostras coletadas no período (ou seja, 27% das 18 amostras com presença do protozoário). Em contrapartida, no período de janeiro a maio de 2014, as chuvas foram escassas e não foram observadas variações nas concentrações dos parasitas.

ROSE et al. (2002) indicaram a precipitação pluviométrica como principal fator de influência na dispersão dos parasitas que estão presentes no solo e ATHERHOLT et al. (1998) acrescentaram que chuvas intensas podem promover a ressuspensão de sólidos e de materiais fecais presentes no leito dos rios.

Estes últimos autores pesquisaram protozoários no rio Delaware (EUA) e revelaram que a chuva foi um fator significativo para o aumento da concentração de *Giardia* e *Cryptosporidium*, devido à elevação da turbidez causada pela ressuspensão do sedimento do rio e escoamento superficial (ATHERHOLT et al., 1998).

Segundo CROCKETT (2004), o número de cistos e oocistos aumenta no período de chuvas com o forte revolvimento da água e diminuem na época da estiagem, concentrando-se no sedimento. De fato, os leitos dos rios podem configurar-se como reservatórios de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. Desta forma, após fortes chuvas tende a haver um aumento da quantidade destes cistos e oocistos depositados nos sedimentos dos mananciais e, conseqüentemente, serem captados pelas estações de tratamento (JIANG, 2005).

Também é interessante notar que, no ponto de coleta (local de captação de água bruta da ETA Cristais) há uma pequena barragem artificial, modificação esta que melhorava a captação de água bruta nos meses de estiagem. Neste cenário, de acordo com MEDEMA et al. (1998), tal barragem pode favorecer a sedimentação dos cistos de *Giardia* spp., pois em ambientes lênticos os cistos sedimentam e sua concentração tende a aumentar.

Em Luxemburgo, BURNET et al. (2014) analisaram amostras de águas superficiais no intuito de se obter a distribuição espacial e temporal desses parasitas na área rural da bacia de Upper-Sûre, a fim de verificar implicações para o seu monitoramento e avaliação de risco. Além de características de uso do solo e captação, a climatologia pareceu ser um dos principais fatores determinantes do comportamento dos parasitas na bacia, introduzindo uma tendência sazonal na sua ocorrência, sendo detectadas maiores densidades durante a estação chuvosa. Picos de contaminação também foram observados em razão do escoamento induzido pela precipitação.

DAVIES et al. (2004), em experimento piloto, observaram que em episódios de chuvas fortes em solos sem cobertura vegetal, a água da enxurrada apresentou maior concentração de oocistos do que em solo cobertos. Sendo assim, a lixiviação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, provenientes de dejetos de animais, também pode configurar fonte de contaminação do manancial estudado. Cabe dizer que excretas foram encontradas próximas à captação da ETA Cristais com alguma frequência durante a coleta dos dados, como pode ser observado na Figura 9.

Objetivando uma melhor compreensão da origem da contaminação dos protozoários no manancial estudado e de possíveis riscos de transmissão zoonótica, o presente estudo também se utilizou de metodologias moleculares, que apresentam como complemento, em relação ao Método EPA 1623.1, a determinação da espécie do patógeno, indicando sua capacidade para causar infecção/doença em seres humanos e evidenciando se são originados de contaminação antrópica. Os resultados da caracterização molecular dos patógenos encontrados nas amostras deste estudo são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Resultados de PCR em tempo real para a pesquisa de genótipos A e B de *Giardia intestinalis* nas amostras de água do ribeirão dos Cristais, 2013-2014.

Amostra	Data	Cistos/L	<i>G. intestinalis</i>		Amostra	Data	Cistos/L	<i>G. intestinalis</i>	
			Genótipo A	Genótipo B				Genótipo A	Genótipo B
1.	16.05.13	0,3	-	+	25.	30.10.13	0,1	-	-
2.	22.05.13	0,2	+	+	26.	06.11.13	0,1	-	-
3.	29.05.13	<0,1	+	-	27.	13.11.13	0,1	-	-
4.	05.06.13	<0,1	+	-	28.	21.11.13	0,6	-	+
5.	11.06.13	1,2	-	-	29.	27.11.13	<0,1	-	-
6.	19.06.13	<0,1	+	-	30.	04.12.13	0,1	-	-
7.	26.06.13	1,6	-	-	31.	11.12.13	3,3	+	-
8.	03.07.13	0,3	+	-	32.	08.01.14	0,4	-	-
9.	10.07.13	0,2	-	-	33.	15.01.14	8,6	+	-
10.	17.07.13	0,3	-	-	34.	22.01.14	0,2	+	+
11.	24.07.13	<0,1	-	-	35.	29.01.14	0,4	-	-
12.	31.07.13	0,6	-	-	36.	05.02.14	0,5	-	-
13.	07.08.13	0,6	-	-	37.	12.02.14	0,4	-	-
14.	14.08.13	0,6	-	-	38.	19.02.14	0,6	+	-
15.	21.08.13	1,1	+	-	39.	26.02.14	<0,1	-	-
16.	28.08.13	0,2	-	-	40.	12.03.14	0,3	-	-
17.	04.09.13	1,4	+	+	41.	19.03.14	1,3	-	+
18.	11.09.13	<0,1	+	-	42.	26.03.14	0,1	+	-
19.	18.09.13	2,6	+	-	43.	02.04.14	5,3	-	-
20.	25.09.13	3,3	+	-	44.	09.04.14	<0,1	-	-
21.	02.10.13	1,8	-	-	45.	23.04.14	0,3	-	-
22.	09.10.13	4,9	-	+	46.	07.05.14	1,3	+	-
23.	16.10.13	0,5	-	-	47.	14.05.14	0,1	-	-
24.	23.10.13	0,5	-	-	48.	21.05.14	0,4	-	+

A análise da Tabela 3 permite observar a presença de *Giardia intestinalis* genótipos A e B em, respectivamente, 33,4% (16/48) e 16,6% (8/48) das amostras de água bruta superficial do ribeirão dos Cristais. Considerando os dois genótipos em conjunto, observou-se que 44% das amostras coletadas (21/48) foram positivas, sendo que ambos foram detectados na mesma amostra em três oportunidades.

Conforme apontado anteriormente, embora apenas genótipos A e B de *G. intestinalis* tenham demonstrado ser potencialmente zoonóticos, não está claro o risco de transmissão dos demais genótipos (MORRISON et al., 2007; ORTEGA-PIERRES et al., 2009; PLUTZER et al., 2010; FENG e XIAO, 2011), possivelmente presentes nas demais amostras em que cistos foram detectados pelo Método EPA 1623.1 (USEPA, 2012b).

Tabela 4 - Resultados de genotipagem de *Cryptosporidium* por meio de Nested PCR e sequenciamento nas amostras de água do ribeirão dos Cristais, 2013-2014.

Amostra	Data	Oocisto/L	Nested PCR	Sequenciamento	Amostra	Data	Oocisto/L	Nested PCR	Sequenciamento
1.	16.05.13	<0,1	+	<i>C. hominis</i>	25.	30.10.13	<0,1	-	nd
2.	22.05.13	<0,1	+	nd	26.	06.11.13	<0,1	-	nd
3.	29.05.13	<0,1	+	<i>C. hominis</i>	27.	13.11.13	<0,1	+	<i>C. parvum</i>
4.	05.06.13	<0,1	-	nd	28.	21.11.13	0,4	+	<i>C. parvum</i>
5.	11.06.13	0,1	+	nd	29.	27.11.13	<0,1	-	nd
6.	19.06.13	<0,1	+	nd	30.	04.12.13	<0,1	+	<i>C. parvum</i>
7.	26.06.13	<0,2	+	<i>C. hominis</i>	31.	11.12.13	<0,1	-	nd
8.	03.07.13	0,3	+	nd	32.	08.01.14	<0,1	-	nd
9.	10.07.13	0,1	+	<i>C. hominis</i>	33.	15.01.14	2	+	nd
10.	17.07.13	<0,1	+	nd	34.	22.01.14	<0,1	-	nd
11.	24.07.13	<0,1	-	nd	35.	29.01.14	<0,1	-	nd
12.	31.07.13	<0,1	+	nd	36.	05.02.14	<0,1	-	nd
13.	07.08.13	<0,1	-	nd	37.	12.02.14	<0,1	-	nd
14.	14.08.13	0,2	+	nd	38.	19.02.14	0,2	-	nd
15.	21.08.13	<0,1	+	nd	39.	26.02.14	<0,1	-	nd
16.	28.08.13	<0,1	-	nd	40.	12.03.14	0,1	-	nd
17.	04.09.13	0,1	+	<i>C. parvum</i>	41.	19.03.14	0,5	-	nd
18.	11.09.13	<0,1	-	nd	42.	26.03.14	<0,1	-	nd
19.	18.09.13	0,1	-	nd	43.	02.04.14	0,9	-	nd
20.	25.09.13	0,1	-	nd	44.	09.04.14	<0,1	-	nd
21.	02.10.13	<0,1	-	nd	45.	23.04.14	0,1	-	nd
22.	09.10.13	0,4	-	nd	46.	07.05.14	0,6	-	nd
23.	16.10.13	0,1	+	nd	47.	14.05.14	<0,1	-	nd
24.	23.10.13	0,1	-	nd	48.	21.05.14	<0,1	-	nd

nd: não definido

Em relação ao *Cryptosporidium*, a Tabela 4 demonstra que, das 48 amostras de água analisadas, foi possível a detecção do protozoário em 37,5% (18/48), quando utilizada a técnica de Nested PCR. É interessante notar que determinadas amostras que apresentaram concentrações menores que o limite de detecção pelo Método EPA 1623.1 (USEPA, 2012b), foram positivas quando utilizada a Nested PCR, possibilitando a genotipagem e demonstrando que a técnica constitui uma ferramenta útil para confirmação da presença e identificação do protozoário, mesmo quando os oocistos estão em baixo número no ambiente (ARAÚJO, 2015).

Procedeu-se, então, o sequenciamento dos fragmentos obtidos para as amostras em que o *Cryptosporidium* foi detectado por Nested PCR, resultando em 44% (8/18) de perfis compatíveis com as espécies frequentemente identificadas em estudos epidemiológicos, sendo *C. hominis* identificado nas amostras 1, 3, 7 e 9 e *C. parvum* nas amostras 17, 27, 28 e 30, quando comparadas a seqüências homólogas disponíveis no banco de dados *Genbank*, conforme Figura 12.

Figura 12 - Relação filogenética baseada no método de *Neighbor-Joining* utilizando seqüências do gene *18S rRNA* de diferentes espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no banco de dados *Genbank* e os valores de bootstrap após 1000 réplicas. As demais amostras identificadas com número seguido de R dos Cristais são amostras positivas oriundas deste estudo.

Em síntese, utilizando técnicas de PCR e sequenciamento, identificou-se, em parcela considerável das amostras, a presença de genótipos/espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium* que são característicos de contaminação antrópica e capazes de causar DDA. A aplicação de técnicas moleculares também foi utilizada em outros estudos, com finalidade semelhante.

No surto de criptosporidiose ocorrido em 1993 em Milwaukee (EUA), por exemplo, onde foram registrados 403 mil casos, com 4.400 hospitalizações e a morte de cerca de uma centena de pessoas, tais metodologias tornaram possível averiguar que *C. hominis* foi o principal agente etiológico envolvido na contaminação da água tratada. A ampliação dos estudos na área ambiental, com a realização de investigação de amostras disponíveis de esgoto bruto, também evidenciou a ocorrência de seis espécies de *Cryptosporidium*, à época do surto: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. canis* e *C. felis* (XIAO et al., 2010).

ARAÚJO (2008), em estudo sobre a genotipagem de *Cryptosporidium* spp. proveniente de 30 amostras de águas superficiais e recreacionais de 10 pontos de coleta situados no estado de São Paulo, detectou *Cryptosporidium* em 30% das amostras analisadas e a genotipagem permitiu a identificação de *C. hominis*, *C. meleagridis* e *C. andersoni*. A autora concluiu que, embora a identificação de *Cryptosporidium* em amostras ambientais seja uma tarefa complexa, os métodos moleculares são essenciais para determinação de espécies, ajudando a elucidar a epidemiologia deste protozoário em nosso país.

Em consonância, SEVÁ (2009) procedeu a caracterização molecular de 24 amostras de *Cryptosporidium* detectado em fezes de pacientes imunodeprimidos provenientes de hospital do município de São Paulo, encontrando *C. hominis*, *C. canis*, *C. parvum* e *C. felis*. Em outro estudo com amostras clínicas fecais obtidas durante surto de giardíase ocorrido em Bergen na Noruega, entre os anos de 2004 e 2005, a investigação molecular indicou que a maioria dos isolados de *Giardia duodenalis* estavam relacionados ao genótipo da *Assemblage* B, com reconhecido potencial zoonótico. Um pequeno número de cistos foi detectado na água e o esgoto doméstico foi a provável fonte de contaminação do manancial (ROBERTSON et al., 2006).

MARTINS (2010), em estudo de caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp., provenientes de 43 amostras fecais de origem humana na Baixada Santista (SP), demonstrou que o *Assemblage* B da *Giardia duodenalis* foi o mais

freqüente na região litorânea, ocorrendo em 53,5% das amostras, com o *Assemblage* A identificado em 34,8% e infecção pelos dois parasitas presentes em 11,6% das amostras.

FERNANDES (2011) isolou amostras do protozoário provenientes de águas superficiais (11), poço (3), nascente (1), esgoto bruto (5) e esgoto tratado (6) do Estado de São Paulo. A autora verificou que onze amostras (incluindo água superficial, poço e esgoto tratado) foram positivas para a presença de *Giardia duodenalis*, genótipos A e B, sendo que dez delas foram confirmadas por sequenciamento.

SCALIA (2012), em identificação molecular de isolados de *Giardia duodenalis* em crianças de creches dos municípios de Araguari e Uberlândia (MG), observaram a presença do parasita em 45 (19,9%) das 226 amostras fecais de crianças. É interessante notar que a autora encontrou genótipos predominantes diferentes para as cidades analisadas, assim como relação entre a *Assemblage* B e crianças com diarreia (nenhuma outra manifestação clínica foi associada às *Assemblages* A e B).

Por fim, PRYSTAJECKY et al. (2014), em estudo de sequenciamento genômico de *Giardia* e *Cryptosporidium* realizado durante dois anos Columbia Britânica (Canadá), revelou que 50% das 186 amostras de *Cryptosporidium* e 98% das 134 amostras de *Giardia* continham espécies/genótipos capazes de infectar seres humanos. Além disso, este estudo também destacou os benefícios do sequenciamento genômico destes protozoários para complementar o Método USEPA 1623.1, como uma ferramenta adicional que poderia ser utilizada para a avaliação dos riscos em saúde pública e as decisões de gestão de bacias hidrográficas.

4.2 – Risco de infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium* na água distribuída e possíveis correlações com a incidência de DDA

Para efetuar o cálculo dos riscos anuais de infecção, as concentrações de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, obtidas pelo Método EPA 1623.1 (USEPA, 2012b), foram ajustadas pelo método da máxima verossimilhança, cujos resultados, para cada família de distribuição, podem ser observados nas figuras 13 e 14.

Figura 13 - Distribuições empíricas (linhas pontilhadas) e ajustadas (linha contínua) das famílias Triangular, Lognormal, Gama e Weibull para as concentrações de cistos de *Giardia* em amostras de água do ribeirão dos Cristais.

Figura 14 - Distribuições empíricas (linhas pontilhadas) e ajustadas (linha contínua) das famílias Triangular, Lognormal, Gama e Weibull para as concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água do ribeirão dos Cristais.

Para concentração de cistos de *Giardia*, a melhor distribuição foi a lognormal, com média e desvio padrão de 1,05 e 2,2 cistos/L, respectivamente. Para oocistos

de *Cryptosporidium*, lognormal também foi a melhor distribuição, com média e desvio padrão de 0,15 e 0,33 oocistos/L, respectivamente. Todos (oo)cistos foram considerados viáveis e infecciosos.

A partir destes dados, foram calculadas as distribuições dos riscos anuais de infecção (sumarizadas pela média, mediana e 95º percentil) por ingestão direta de água tratada contaminada por *Giardia* e *Cryptosporidium* em adultos (maiores de 21 anos) e crianças (menores de 5 anos) no município de Cajamar-SP, apresentadas nas figuras 15 e 16 e no quadro 4.

Figura 15 – Distribuição do risco anual de infecção ($\log_{10}$) por *Giardia* em adultos (maiores de 21 anos) e de crianças (menores de 5 anos) por ingestão direta de água tratada no município de Cajamar-SP, 2013-2014.

Figura 16 – Distribuição do risco anual de infecção ($\log_{10}$) por *Cryptosporidium* em adultos (maiores de 21 anos) e de crianças (menores de 5 anos) por ingestão direta de água tratada no município de Cajamar-SP, 2013-2014.

Quadro 4 – Média, mediana e 95º percentil de risco anual de infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium* em adultos (maiores de 21 anos) e de crianças (menores de 5 anos) pela ingestão de água no município de Cajamar-SP, 2013-2014.

Risco anual de infecção pela ingestão de água tratada	Adultos			Crianças		
	Média (log10)	Mediana (log10)	95º percentil (log10)	Média (log10)	Mediana (log10)	95º percentil (log10)
<i>Giardia</i>	11,5x10 ⁻³ (-1,94)	11,5x10 ⁻³ (-1,94)	13,3x10 ⁻³ (-1,88)	3,4x10 ⁻³ (-2,47)	3,3x10 ⁻³ (-2,48)	4,6x10 ⁻³ (-2,34)
<i>Cryptosporidium</i>	4,0x10 ⁻³ (-2,39)	3,9x10 ⁻³ (-2,40)	5,0x10 ⁻³ (-2,30)	1,1x10 ⁻³ (-2,93)	1,1x10 ⁻³ (-2,95)	1,7x10 ⁻³ (-2,75)

A análise das Figuras 15 e 16 e do quadro 4 permite observar que a mediana do risco anual de infecção foi, respectivamente, de cerca de 11 e 4 infecções em 1000 adultos (maiores de 21 anos) por ano, para *Giardia* e *Cryptosporidium*. Já em menores de 5 anos, a mediana do risco foi, respectivamente, de cerca de 3 e 1 infecção em 1000 crianças por ano, para *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Observa-se que, embora os riscos anuais de infecção pelos protozoários foram menores em crianças do que em adultos, ambos são elevados quando comparados ao valor de risco tolerável da USEPA (2006), de menos de 1 infecção por 10 mil pessoas por ano (10⁻⁴), para os diversos organismos patogênicos transmissíveis através de água potável.

Se assumirmos que a frequência de doença clínica seguida da infecção é da ordem de 50 a 67% para *Giardia* (GERBA et al., 1996) e de 40 a 70% para *Cryptosporidium* (HAVELAAR e MELSE, 2003), temos, respectivamente, cerca de 6 e 2 casos de giardíase e criptosporidiose em 1000 adultos (maiores de 21 anos) por ano. Em menores de 5 anos temos, aproximadamente, 1 caso de giardíase e criptosporidiose em 1000 crianças por ano.

Sendo assim, os resultados deste estudo caracterizaram, indubitavelmente, a existência de um risco elevado, tanto de infecção quanto de adoecimento por *Giardia* e *Cryptosporidium*, através da ingestão de (oo)cistos em águas de abastecimento público captadas do ribeirão dos Cristais.

Resultados semelhantes foram encontrados por outros estudos, que utilizaram a metodologia da AQRM para avaliar efeitos potenciais à saúde humana associados com a água de consumo contaminada por *Giardia* e *Cryptosporidium*.

ROSE *et al.* (1991), por exemplo, pesquisaram os riscos anuais representados pela ingestão de *Giardia lamblia* através da água tratada nos Estados Unidos. No cenário proposto pelos autores, foram assumidos os volumes de água consumidos diariamente (2L), níveis médios de cistos em água de superfície (0,33 a 104/100L), redução de cistos através do tratamento da água (3 logs) e a relação dose-resposta foi modelada, resultando em riscos anuais de 1 infecção por 10 mil pessoas para águas de abastecimento.

PERZ *et al.* (1998) aplicaram uma avaliação de risco para examinar o papel em potencial da água distribuída na transmissão de infecção endêmica por *Cryptosporidium parvum*. A população foi dividida em quatro subgrupos que incluíam adultos e crianças, com e sem AIDS, assumindo uma concentração de 1 oocisto/1.000L na água para consumo tratada e distribuída. Nos subgrupos que não eram doentes, o risco médio anual de infecção foi de, aproximadamente, 1 em cada 1.000 adultos (IC95% 0,0003-0,0028), enquanto nos subgrupos de doentes, o risco previsto foi de cerca de 2 em 1000 (IC95% 0,0003-0,0130). Quando o modelo foi aplicado para a população de Nova York, o número calculado de casos relacionados com a água de torneira por ano nos subgrupos que não eram doentes foi de seis (IC95% 1-29) e nos subgrupos doentes foi 34 (IC95% 6-240).

XIAO *et al.* (2012) utilizaram a abordagem da AQRM para calcular a probabilidade de risco anual de infecção por *Cryptosporidium*, considerando a eficiência de remoção patógeno, diferentes vias de exposição e várias subpopulações suscetíveis, com base no resultado de uma pesquisa do protozoário em pontos de captação de água para abastecimento público de 66 sistemas de tratamento em 33 cidades chinesas. A morbidade por diarreia anual causada por *Cryptosporidium* em água potável foi estimada em 2701 casos por 100.000 pessoas imunodeficientes e 148 casos por 100.000 pessoas imunocompetentes, resultando em uma taxa global de 149 casos por 100.000 habitantes. A carga criptosporidiose associada à água potável tratada com o processo convencional foi calculada em $8,31 \times 10^{-6}$ DALYs por pessoa por ano, que foi maior do que o nível de risco de referência sugerido pela OMS.

SATO *et al.* (2013) avaliaram a probabilidade de risco anual de infecção por *Giardia* e *Cryptosporidium* pela ingestão de água de abastecimento público distribuída em quatro regiões de São Paulo (RMSP, Campinas, Baixada Santista e Vale do Paraíba), estimando que o risco para *Giardia* para todas as regiões foi uma

média de 1,94% (IC95% 2,59%) para adultos e de 0,55% (IC95% 0,87%) para crianças. Para *Cryptosporidium* o risco médio encontrado foi de 0,10% (IC95% 0,17%) para adultos e 0,02% (IC95% 0,05%) para crianças.

Considerando ainda que os parâmetros utilizados podem ter contribuído de forma diferente para os riscos calculados, foi calculada a sensibilidade para cada um deles, conforme pode ser observado nas Figuras 17 e 18.

Figura 17 – Sensibilidade da concentração do patógeno, taxa de ingestão de água e parâmetros dose-resposta sobre o risco anual de infecção *Giardia* no município de Cajamar-SP, 2013-2014.

Figura 18 – Sensibilidade da concentração do patógeno, taxa de ingestão de água e parâmetros dose-resposta sobre o risco anual de infecção *Cryptosporidium* no município de Cajamar-SP, 2013-2014.

A análise das Figuras 17 e 18 permite observar que, para adultos, a variável que teve maior impacto nos riscos obtidos foi a concentração de ambos os patógenos na água tratada, contribuindo cerca de três vezes mais que a taxa de ingestão e, pelo menos, cinco vezes mais que os parâmetros dose-resposta. Em relação às crianças, embora a concentração na água tratada também tenha sido a variável mais sensível para o estabelecimento de risco para ambos os patógenos, a taxa de ingestão foi quase tão relevante quanto para o risco anual de infecção pelo *Cryptosporidium*. Por fim, os parâmetros dose-resposta foram os menos sensíveis em ambas as faixas etárias. Estes resultados são semelhantes àqueles relatados por SATO et al. (2013), cujo estudo também revelou que o maior contribuinte para o risco foi a concentração dos patógenos na água em todas as regiões e cenários considerados.

TEUNIS et al. (1997) conduziram uma análise de risco de infecção por *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* na água de manancial superficial, na qual os principais fatores de contribuição ao risco foram tratados individualmente como variáveis estocásticas. As variáveis pesquisadas incluíram a concentração de (oo)cistos em água bruta, a recuperação do método de detecção, a viabilidade de cistos ou oocistos recuperados, a eliminação de organismos no processo de tratamento e o consumo diário de água de torneira não fervida. Os autores indicaram que a incerteza na eficiência de eliminação estimada do processo de tratamento prevaleceu sobre as incertezas em todos os outros fatores de contribuição.

MAUL (2014) aponta que a avaliação de risco microbiológico é dependente de vários fatores biológicos e ambientais, que afetam tanto as características de exposição aos agentes, quanto os mecanismos de patogenicidade envolvidos na relação patógeno-hospedeiro. Neste sentido, o autor advoga que a média ou mediana por si mesmos são insuficientes para avaliar os efeitos adversos que estão associados com um determinado nível de exposição, considerando que a heterogeneidade da caracterização da distribuição temporal e espacial de microrganismos patogênicos em um dado ambiente merece atenção, podendo influenciar a magnitude do risco dramaticamente, ampliando o risco quando a concentração média de agentes patogênicos é inferior ao limiar da relação dose-resposta.

Objetivando verificar se os riscos calculados foram observados como possível incremento nas taxas de DDA na área de estudo, construiu-se a Tabela 5, que apresenta a incidência de diarreias agudas por mil habitantes e por faixa etária em Cajamar, para o período de 2011 a 2015, a partir de consulta ao SIVEP – DDA¹³ e estimativas de população da Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (SEADE)¹⁴.

A análise da Tabela 5 permite observar que, quando comparada às taxas de 2011 e 2012, a incidência quase dobrou nas faixas etárias acima de 5 anos no ano de 2013, passando de cerca de 12 casos por mil habitantes para cerca de 23 casos por mil habitantes, se mantendo elevada em 2014 nas faixas etárias acima de 9 anos. Já nas faixas de menores de cinco anos, a incidência permaneceu estável entre 2011 e 2013, com cerca de 7 casos por mil habitantes, caindo nos anos seguintes.

A distribuição temporal destes casos foi avaliada através do levantamento do número de registros de DDA na semana epidemiológica (SE)¹⁵ seguinte à coleta, de janeiro 2011 a dezembro de 2015 (Figura 19), considerando que o período de incubação para os protozoários estudados varia de uma a duas semanas, antes do aparecimento dos sintomas (ORTEGA-PIERRES et al., 2009).

A análise da Figura 19 evidencia que, entre as semanas epidemiológicas 36 e 45 de 2013, referentes ao período de 01/09/2013 a 09/11/2013¹⁶, ocorreu um perceptível o aumento no número de casos de DDA, que variou entre 30 e 67 casos notificados, dobrando a média de 15 casos de DDA registradas nos anos 2011 e 2012 por semana epidemiológica.

Vale ressaltar que, justamente neste período, as amostras do presente estudo detectaram com frequência *Cryptosporidium*, além de concentrações elevadas de cistos de *Giardia*, iniciando em 04 de Setembro e culminando em 23 de Outubro, como pode ser observado na Tabela 6.

¹³ Dados provisórios para 2015, captados do SIVEP (<http://sivepdda.saude.gov.br/>) em 19/01/2016.

¹⁴ <http://produtos.seade.gov.br/produtos/projpop/index.php>

¹⁵ Semanas epidemiológicas são padronizadas internacionalmente para avaliação da distribuição temporal de casos de doenças em diferentes regiões e permitir a comparabilidade dos dados. A primeira semana epidemiológica de cada ano é aquela que contém o maior número de dias, iniciando-se no domingo e terminando no sábado. Por isto, elas não coincidem, necessariamente, com o calendário.

¹⁶ http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/nive/se_2013.htm

Tabela 5 – Incidência de DDA por mil habitantes e por etária em Cajamar-SP, 2011-2015.

Ano	Casos na faixa de 0 a 4 anos	População	Incidência	Casos na faixa de 5 a 9 anos	População	Incidência	Casos 10 anos ou +	População	Incidência	Total Casos	Total População	Incidência DDA no ano
2011	41	5187	7,90	54	5154	10,48	702	54995	12,76	797	65336	12,20
2012	36	5341	6,74	74	5156	14,35	702	56214	12,49	812	66711	12,17
2013	40	5498	7,28	137	5156	26,57	1288	57461	22,42	1465	68115	21,51
2014	19	5658	3,36	31	5153	6,02	1098	58738	18,69	1148	69549	16,51
2015	1	5819	0,17	9	5149	1,75	618	60045	10,29	628	71013	8,84

Figura 19 – Número de casos de DDA por semana epidemiológica no município de Cajamar-SP, 2011-2015.

Tabela 6 – Concentrações de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água bruta e total de casos de DDA na SE seguinte no município de Cajamar-SP, 2013-2014.

Data	<i>Giardia</i> Cisto/L	<i>Cryptosporidium</i> Oocisto/L	Casos de DDA na SE seguinte	Data	<i>Giardia</i> Cisto/L	<i>Cryptosporidium</i> Oocisto/L	Casos de DDA na SE seguinte
16.05.13	0,3	<0,1	27	30.10.13	0,1	<0,1	30
22.05.13	0,2	<0,1	22	06.11.13	0,1	<0,1	32
29.05.13	<0,1	<0,1	24	13.11.13	0,1	<0,1	25
05.06.13	<0,1	<0,1	17	21.11.13	0,6	0,4	40
11.06.13	1,2	0,1	19	27.11.13	<0,1	<0,1	37
19.06.13	<0,1	<0,1	23	04.12.13	0,1	<0,1	30
26.06.13	1,6	<0,2	20	11.12.13	3,3	<0,1	43
03.07.13	0,3	0,3	17	08.01.14	0,4	<0,1	30
10.07.13	0,2	0,1	14	15.01.14	8,6	2	19
17.07.13	0,3	<0,1	19	22.01.14	0,2	<0,1	15
24.07.13	<0,1	<0,1	18	29.01.14	0,4	<0,1	15
31.07.13	0,6	<0,1	26	05.02.14	0,5	<0,1	35
07.08.13	0,6	<0,1	29	12.02.14	0,4	<0,1	27
14.08.13	0,6	0,2	26	19.02.14	0,6	0,2	27
21.08.13	1,1	<0,1	29	26.02.14	<0,1	<0,1	19
28.08.13	0,2	<0,1	29	12.03.14	0,3	0,1	26
04.09.13	1,4	0,1	44	19.03.14	1,3	0,5	32
11.09.13	<0,1	<0,1	41	26.03.14	0,1	<0,1	44
18.09.13	2,6	0,1	67	02.04.14	5,3	0,9	36
25.09.13	3,3	0,1	47	09.04.14	<0,1	<0,1	33
02.10.13	1,8	<0,1	63	23.04.14	0,3	0,1	33
09.10.13	4,9	0,4	56	07.05.14	1,3	0,6	13
16.10.13	0,5	0,1	49	14.05.14	0,1	<0,1	16
23.10.13	0,5	0,1	47	21.05.14	0,4	<0,1	10

A Tabela 6 mostra que, no período compreendido entre 01/09/2013 a 09/11/2013, foram detectados cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em, respectivamente, 90% e 60% das 10 amostras do período.

Embora tal situação possa ser parcialmente explicada pelo aumento da concentração de protozoários na água bruta após as precipitações, conforme discutido anteriormente, verificou-se que, no início de setembro de 2013, ocorreu transbordamento de material advindo da ETE da penitenciária Mário de Moura de Albuquerque, que abriga 2.500 detentos, atingindo tributário do ribeirão dos Cristais e levando ao aumento na demanda de oxidante pela ETA Cristais, que operou em contingência durante o período citado, com aumento de aplicação de produtos químicos e, até mesmo, paralisando o tratamento de água por várias horas, de acordo com relato do responsável por suas operações.

Em visita à ETE da citada penitenciária, juntamente com profissionais da vigilância sanitária, fomos informados que o transbordamento se deu devido ao entupimento do gradeamento, logo no início do processo de tratamento, composto por três tanques, localizados em um morro acima do afluyente do ribeirão dos Cristais, como pode ser observado na Figura 20.

Figura 20 – Localização da ETE da Penitenciária Mário de Moura de Albuquerque.

A despeito de este evento ter sido ou não pontual, sua ocorrência associada à elevação dos casos registrados de DDA e ao aumento na detecção dos protozoários nas amostras deste estudo, evidencia que o manancial de Cajamar é vulnerável a contaminações por *Giardia* e *Cryptosporidium* através do lançamento de esgotos não tratados, culminando em um risco elevado de infecção pela ingestão de água captada para abastecimento público, tratada por uma ETA convencional e distribuída naquele município, sendo possível que o incremento da incidência de DDA registrado neste período tenha relação com tal contaminação.

Em contexto similar, EISENBERG et al. (1998) combinaram informações sobre o padrão temporal de incidência de doença no surto de criptosporidiose em Milwaukee (EUA), em 1993, com informações de níveis de oocistos, para compreender o processo epidêmico. O resultado do modelo construído indicou que um surto menor ocorreu antes do grande surto relatado, provavelmente, entre os dias 01 e 22 de março. Os autores sugerem que, se os sistemas de vigilância tivessem detectado o surto anterior, mais de 85% dos casos relacionados ao surto maior poderiam ter sido evitados. Análises posteriores, usando dados de incidência no surto maior (ocorrido entre 23 de março e o final de abril), permitiram três inferências acerca do processo de infecção: (1) a média do período de incubação, provavelmente, foi de três a sete dias; (2) no decorrer do surto, houve um aumento na concentração de oocistos de *Cryptosporidium* na água de consumo e, ao mesmo tempo, uma redução na eficiência da estação de tratamento de água; e (3) a variabilidade da dose-resposta no modelo não afetou de maneira significativa os dados simulados.

Cabe salientar que a deficiência de dados epidemiológicos acerca da associação destes protozoários com a ocorrência de DDA é uma realidade em todo o Brasil, impossibilitando o estabelecimento de uma relação direta entre estes agentes patológicos e a ocorrência de doenças diarreicas na área estudada. Neste contexto, ainda é possível fazer inferências sobre subnotificação das DDA no município de Cajamar, haja vista a possibilidade de deslocamento das notificações para serviços de assistência localizados além das suas fronteiras, pois o mesmo se configura como uma “cidade-dormitório”, termo que designa cidades ou aglomerações suburbanas surgidas nos arredores de uma metrópole, onde, por conveniência, se alojam pessoas que passam o dia em outra cidade, onde exercem alguma atividade (FREITAG, 2002; OJIMA, 2007).

De qualquer forma, tendo em conta que a incidência de DDA apresentada pode ter diversas origens (inclusive, a ingestão dos protozoários estudados através da água tratada) e que o princípio da precaução, conceito consagrado com a finalidade de proteger o meio ambiente, mas que também pode ser aplicado às análises de impacto à saúde humana (CUNHA et al., 2013), aponta que “*quando houver perigo de dano grave ou irreversível, a falta de certeza científica absoluta não deverá ser utilizada como razão para que seja adiada a adoção de medidas eficazes em função dos custos*”, evidencia-se o benefício da regulamentação de um limite tolerável tal

qual ao da USEPA em nosso País, ou seja, um risco anual de um caso de infecção a cada 10 mil consumidores por microrganismos transmissíveis através da água de consumo humano.

Os diversos estudos, citados ao longo deste trabalho, que verificaram a ocorrência de protozoários em águas destinadas ao consumo humano e o risco advindo deste fenômeno, reforçam a assertiva de que não se pode admitir que consumidores urbanos, com acesso à água da rede pública, sujeita à vigilância e controle de qualidade, estejam expostos a riscos superiores ao limite tolerável estabelecido pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos.

É inegável que a legislação sanitária que define as condições de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano no Brasil evoluiu muito nessas últimas décadas, incluindo, em sua última revisão da portaria de potabilidade, a avaliação e gestão de riscos, na perspectiva do PSA. Contudo, é necessário refletir que, para que o PSA se estabeleça de fato como instrumento de referência para controle de riscos sanitários relacionados a doenças de veiculação hídrica, não apenas no município estudado, mas em todo o Brasil, é imprescindível estabelecer exigências legais aos produtores de água para consumo humano, considerando que, em cenários de recursos limitados e necessidades concorrentes, torna-se imprescindível esclarecer os riscos que consideraremos “toleráveis”.

A abordagem científica da avaliação de risco tem potencial para auxiliar neste processo de gestão, tanto para o estabelecimento de níveis de remoção de patógenos em ETAs, quanto na avaliação da eficiência das barreiras sanitárias em diferentes contextos, contribuindo, portanto, para se estabelecer medidas de intervenção direcionadas a promover a qualidade da água e garantir sua segurança.

Considerando ainda que a remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* pelo processo convencional de tratamento de água pode não ser suficiente para garantir a redução do risco de infecção para estes patógenos, evidencia-se a necessidade de impedir a degradação do ribeirão dos Cristais e de estabelecer um processo de gestão de riscos que propicie barreiras sanitárias mais efetivas, desde a captação até a torneira, com ênfase na gestão integrada e colaboração entre os múltiplos organismos que têm responsabilidades em aspectos específicos do ciclo da água, como o órgão ambiental e as vigilâncias, para além da potabilidade e das características físicas e operacionais do sistema de abastecimento.

Neste panorama, os resultados obtidos no presente estudo podem contribuir para a elaboração e ou revisão de padrões de qualidade das águas destinadas ao abastecimento público, a partir das estimativas do risco de infecção devido à exposição à *Giardia* e *Cryptosporidium* via ingestão de água, a exemplo do que ocorre em países da América do Norte e Europa.

Por fim, a necessidade de que mais estudos sejam conduzidos no País é reforçada pelo reconhecimento de que o Brasil dispõe de poucas informações sistematizadas quanto à identificação de protozoários em águas de abastecimento público e as relações entre esses patógenos e efeitos adversos à saúde humana. Tais lacunas do conhecimento precisam ser preenchidas, em especial, ao se considerar que os riscos causados pelos agentes patogênicos transmitidos através da água contaminada constituem problemas imediatos, agudos e, muitas vezes, associados a surtos de grandes proporções, como o de criptosporidiose ocorrido em 1993 em Milwaukee, razão da recomendação da OMS de que a garantia da qualidade microbiológica da água seja prioridade nas ações ambientais de todos os países (WHO, 2011).

5 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram obter as seguintes conclusões:

- A presença de concentrações consideráveis de cistos de *Giardia*, oocistos de *Cryptosporidium* e de bactérias indicadoras de contaminação fecal em amostras de água bruta do ribeirão dos Cristais denota a circulação dos protozoários no ambiente aquático e evidencia o impacto ocasionado pelo lançamento de esgotos domésticos sem tratamento no manancial estudado;
- As variações pluviométricas e dos valores de turbidez demonstraram a importância destes parâmetros para contextualização da análise das concentrações dos protozoários, cuja detecção foi aumentada nas 24 horas posteriores a precipitações e em situações de turbidez elevada;
- A caracterização genotípica dos protozoários encontrados nas amostras revelou a presença de genótipos/espécies característicos de contaminação antrópica e frequentemente identificados em estudos epidemiológicos como responsáveis por surtos de DDA, sendo eles, no caso da *Giardia*, *G. intestinalis* genótipos A e B e, no caso do *Cryptosporidium*, *C. parvum* e *C. hominis*, demonstrando ainda que as metodologias moleculares podem constituir ferramentas úteis para confirmação da presença e identificação dos protozoários, mesmo quando os oocistos estão em baixo número no ambiente;
- Os riscos anuais foram elevados, tanto para infecção quanto para o adoecimento por ambos parasitas através da ingestão de (oo)cistos presentes em águas de abastecimento público captadas do ribeirão dos Cristais, tanto em crianças quanto em adultos, extrapolando níveis considerados toleráveis pela USEPA e pela OMS;
- A variável que contribuiu para o maior impacto nos riscos obtidos para ambas faixas etárias foi a concentração dos patógenos na água tratada, demonstrando a necessidade de operacionalização de medidas de tratamento da água que melhorem as taxas de remoção destes patógenos, por consequência, reduzindo os riscos associados ao seu consumo;
- O incremento da incidência de DDA observado no cenário de estudo após transbordamento de esgotos não tratados advindos da ETE de uma penitenciária em tributário do ribeirão dos Cristais evidenciou que a vulnerabilidade do manancial a contaminações biológicas pode culminar em um risco elevado de infecção e

adoecimento por *Giardia* e *Cryptosporidium*, transmitidos através da ingestão de água tratada por uma ETA convencional e distribuída naquele município;

- O caso de Cajamar é preocupante, tanto do ponto de vista do tratamento e abastecimento de água potável, quanto da degradação e contaminação da bacia hidrográfica na qual se insere o manancial, evidenciando que seria benéfica a regulamentação de um limite tolerável tal qual ao da USEPA em nosso País, ou seja, um risco anual de um caso de infecção a cada 10 mil consumidores por microrganismos transmissíveis através da água de consumo humano;

- A ferramenta da avaliação de risco tem potencial para auxiliar neste processo de gestão de riscos, tanto para o estabelecimento de níveis de remoção de protozoários em ETAs, quanto na avaliação da eficiência das barreiras sanitárias em diferentes contextos, contribuindo, portanto, para se estabelecer medidas de intervenção direcionadas a promover a qualidade da água e garantir sua segurança.

Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Washington: Clinical Microbiology Reviews, 2001.

Almeida AS, Soares SC, Delgado MI, Silva EM, Castro AO, Correia da Costa JM. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*: a picture in Portugal. Environmental Contamination, 2012.

Andrade RC. Aplicação de dióxido de cloro no tratamento de água para consumo humano: desinfecção para controle de oocistos de *Cryptosporidium* sp., formação de subprodutos e manutenção de residuais desinfetantes em sistemas de distribuição. Dissertação (mestrado). Universidade federal de Viçosa, Viçosa - MG. 2010.

Antunes AC. Influência da qualidade da água destinada ao consumo humano na incidência de parasitas e no estado nutricional de criança com idade entre 03 e 06 anos no distrito de Santa Rita do Ouro Preto, Ouro Preto, MG. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, MG. 2004.

Araújo MTF. Aleitamento e infecções por parasitas intestinais em gestantes adolescentes e seus filhos. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal - RN. 2009.

Araújo RS. Genotipagem de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras de águas superficiais e recreacionais como fonte de informação da dispersão de espécies no ambiente. 120p. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2008.

Araújo RS, Dropa M, Fernandes. In, Carvalho TT, Sato MIZ, Soares RM, Matte RG, Matte MH. Genotypic characterization of *Cryptosporidium hominis* from water samples in São Paulo, Brazil. Am J Trop Med Hyg, 2011.

Araújo RS. Quantificação e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. isolados em água bruta superficial e esgoto bruto para a monitorização em mananciais de abastecimento público na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP). Tese de doutorado. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2015.

Arnone RD, Walling JP. Waterborne pathogens in urban watersheds. J Water and Health, 2007.

Atherholt TB, Lechevallier MW, Norton WD, Rosen JS. Effect of rainfall on *Giardia* and *Crypto*. J Am Water Works Assoc, 1998.

Bachur TPR. Parasitoses intestinais em portadores de HIV/AIDS nas eras pré e pós-terapia anti-retroviral potente. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE, 2007.

Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. Water Res, 2011.

Barer MR, Wright AE. A review: *Cryptosporidium* and water. Lett. Appl. Microbiol., 1990.

Barros Júnior AL. Avaliação da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de água superficial e da interface sedimento-água do rio Capivari, na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas - SP. 2011.

Barwick RS, Levy DA, Craun GF, Beach MJ, Calderon RL. Surveillance for waterborne-disease outbreaks: United States, 1997–1998. MMWR Morb. Mortal Wkly Rep., 2000.

Bastos RKX, Vieira MBM, Brito LA, Bevilacqua PD, Nascimento LE, Heller I. *Giardia* sp cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts dynamics in southeast Brazil: occurrence in surface water and removal in water treatment processes. International Symposium on Waterborne Pathogens, AWWA, 2002.

Batista FS. Avaliação do perfil enteroparasitológico, nutricional e odontológico de indivíduos de uma comunidade do município de Porto Velho - RO. Dissertação (mestrado). Universidade de Taubaté. Taubaté - SP. 2008.

Bella SW, Tam TY. *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage-contaminated river waters. Water Research. 1998.

Belloto MVT. Enteroparasitoses em escolares atendidos na rede pública de ensino do município de Mirassol, Noroeste Paulista. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP. 2010.

Berino E. Ocorrência e detecção de *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. em águas brutas de abastecimento de formadores do Lago Guaíba. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2004.

Berne AC. Prevalência de enteroparasitoses na população atendida em uma creche pública do Rio Grande, RS, e comparação de métodos de diagnósticos para giardíase. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS. 2007.

Borges WF, Marciano FM, Oliveira HB. Parasitos intestinais: elevada prevalência de *Giardia lamblia* em pacientes atendidos pelo serviço de saúde pública da região sudeste de Goiás, Brasil. Rev Patol Trop, 2011.

Boulter-Bitzer JI, Lee H, Trevors JT. Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. Biotechnology Advances, 2007.

Bouزيد M, Steverding D, Tyler KM. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. Current Opinion in Biotechnology, 2008.

Branco N, Guiguet Leal DA, Franco RMB. A parasitological survey of natural water springs and inhabitants of a tourist city in southeastern Brazil. Vector. Borne. Zoonotic. Dis., 2012.

Brasil. Decreto 79.367, de 9 de março de 1977. Brasília, 1977.

Brasil. Decreto Federal 92752/1986. Brasília, 1986.

Brasil. Constituição Federal de 1988. Brasília, 1988.

Brasil. Portaria 36 GM, de 10 de janeiro de 1990. Brasília, 1990a.

Brasil. Lei no. 8.080 (Lei Orgânica da Saúde), de 19 de setembro de 1990. Brasília, 1990b.

Brasil. Portaria MS 1469/2000. Brasília, 2000.

Brasil. Portaria Nº. 518, de 23 de março de 2004. Brasília, 2004.

Brasil. Resolução Conama 357, de 17 de março de 2005. Brasília, 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Inspeção sanitária em abastecimento de água. Brasília, 2006.

Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Impactos na saúde e no Sistema Único de Saúde decorrentes de agravos relacionados a um saneamento ambiental inadequado. Brasília, 2010.

Brasil, Ministério da Saúde. Portaria nº. 2914, de 12 de dezembro de 2011. Brasília, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Plano de segurança da água: garantindo a qualidade e promovendo a saúde - um olhar do SUS. Brasília, 2012.

Brasil. Índice de Desenvolvimento Humano Municipal Brasileiro. Atlas do desenvolvimento humano no Brasil – Brasília, 2013.

Burnet JB, Penny C, Ogorzaly I, Caichie HM. Spatial and temporal distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a drinking water resource: implications for monitoring and risk assessment. Science and the total Environment., 2014.

Cajamar. Plano Municipal de Saneamento Ambiental do Município de Cajamar – SP. Cajamar: 2011.

Cantusio Neto R. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes ponto do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2004.

Cardoso IV. Estudo retrospectivo de enteroparasitoses em indivíduos com HIV – 1 / AIDS na era HAART em hospital escola de nível quaternário. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto - SP. 2011.

Carmo RF, Bevilacqua PD, Bastos RKX. Vigilância da qualidade da água para consumo humano: abordagem qualitativa da identificação de perigos. Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2008.

Carvalho-Almeida TT, Pinto PLS, Quadros CMS, Torres DMAGV, Kanamura HY, Casimiro AM. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non-diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. São Paulo: Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2006.

Carvalho GLX. Prevalência de enteroparasitas em crianças de 0 a 12 anos e condições sanitárias na terra indígena Xakriabá, São João das Missões, Minas Gerais, 2007. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto - MG. 2011.

Castro-Hermida JA, Pressedo IG, Almeida A, Warleta MG, Costa JMC, Mezo M. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river áreas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* duodenalis. Water research, 2008.

CDC. *Giardiasis*: Vail. Colorado. Morbidity and Mortality Weekly Report, 1978.

Cerqueira DA. Remoção de oocistos de *Cryptosporidium* parvum e de indicadores no tratamento de água por ciclo completo, filtração direta descendente e dupla filtração, em escala piloto. Tese (doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo horizonte – MG. 2008.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. São Paulo, 2001.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. São Paulo, 2002.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Diagnóstico ecológico da bacia do Ribeirão dos Cristais. São Paulo: 2005.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Estudo da genotoxicidade de amostras da bacia do ribeirão dos cristais. São Paulo, 2006.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. São Paulo, 2012.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. São Paulo, 2014.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. São Paulo, 2015.

Christofaro C, Leao M. Tratamento de dados censurados em estudos ambientais. Quím. Nova. 2014.

Costa CFS. Identificação de patógenos humanos nas águas que margeiam a cidade de Rio Grande/RS: proposta de vigilância e monitoramento para os agravos relacionados. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande – RS. 2006.

Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by Nested PCR and restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol, 2005.

Cox P, Fisher I, Kastl G, Jegatheesan V, Warnecke M, Angles M, Bustamante H, Chiffings T, Hawkings PR. Sydney 1998 – lessons from a drinking water crisis. Jornal American Water Works Association, 2003.

Craun GF, Hubbs SA, Frost F, Calderon RL. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. J. Am. Wat. Wks Assoc., 1998.

Crockett CS. The significance of streambeds sediments as a reservoir of *Cryptosporidium* oocysts. Dissertation. Drexel University, 2004.

Cunha GF, Pinto CRC, Martins SR, Castilhos Jr AB. The precautionary principle in Brazil post-Rio-92: environmental impact and human health. Ambient. Soc., 2013.

Davies CM, Ferguson CM, Kaucner. Dispersion and transport of *cryptosporidium* oocysts from fecal pat sunder simulated rainfall events. Appl. Environ. Microbiol., 2004.

Delignette-Muller ML, Pouillot R, Denis JB, Dutang C. Fitdistrplus: help to fit of a parametric distribution to non-censored or censored data., 2014.

Dias DG. Prevalência estacional de enteroparasitoses em uma população de zero a quatorze anos do bairro Cohab Tablada, Pelotas – RS. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS. 2005.

Dias GMF. Qualidade microbiológica da água da bacia do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa – MG: análise epidemiológica, ambiental e espacial. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 2007.

Dias GMF, Bevilacqua PD, Bastos RKX, Oliveira AA, Campos GMM. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2008.

Dugan NR, Fox KR, Owens JH, Miltner RJ. Controlling *Cryptosporidium* oocysts using conventional treatment. Journal of the American Water Works Association, 2001.

Dupont HI. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. The New England Journal of Medicine, 1995.

DWI – Drinking Water Inspectorate. Standard operating protocol for the monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in treated water supplies to satisfy the water supply (water quality) regulations. United Kingdom, 2005.

Edzwald JK, Kelley MB. Control of *Cryptosporidium*: from reservoirs to clarifiers to filters. Water science and technology. 1998.

Eisenberg JNS, Seto EYW, Colford JM, Olivieri Jr A, Spear RC. An analysis of the Milwaukee cryptosporidiosis outbreak based on a dynamic model of the infection process. Epidemiology, 1998.

ESP – Estado de São Paulo. Decreto 8.468, de 08 de setembro de 1976. São Paulo, 1976.

ESP – Estado de São Paulo. Decreto nº 10.755 de 22 de novembro de 1977. São Paulo, 1977.

ESP – Estado de São Paulo. Resolução estadual SS 45, de 31 de janeiro de 1992. São Paulo, 1992.

Espanha. Real Decreto 140 de 07 de febrero de 2003. Establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Espanha, 2003.

Fagundes AP. Remoção de oocistos de *Cryptosporidium* por filtração direta – influência de alguns aspectos operacionais. Dissertação (mestrado). Universidade de Brasília. Brasília – DF. 2006.

Farias EWC, Gamba RC, Pellizari VH. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 2002.

Feng Y, Xiao I. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clinical microbiology reviews, 2011.

Feng Y, Ong SI, Hu JY, Song, LF, Tan XI, Ng WJ. Effect of particles on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from source water samples of various turbidities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003.

Fernandes LN, Souza PP, Araújo RN, Razzolini MTP, Soares RM, Sato MIZ. Detection of assemblages A e B of *Giardia duodenalis* in water and sewage from São Paulo State, Brazil. *J Water Health*. 2011.

Fernandes NMG. Influência do Ph de coagulação e dosagem de sulfato de alumínio na remoção de oocistos de por filtração direta descendente. Dissertação (mestrado). Universidade de Brasília. Brasília – DF. 2007.

Ferreira GR. Diagnóstico parasitológico e avaliação de uma intervenção educativa no controle e prevenção de enteroparasitoses no município de estiva Gerbi – SP. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2004.

Figueiredo MAS. Prevalência das enteroparasitoses em pacientes HIV – positivos atendidos no centro de saúde do município de Caruaru – PE – 2007. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE. 2007.

Fox KR, Lytle DA. Milwaukee's *crypto* outbreak: investigation and recommendations. *J. Am. Wat. Wks Assoc.*, 1996.

Franco RMB. Infecções parasitárias em creches: estudo em uma área urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 1996.

Franco RMB, Cordeiro NSS. Giardose e criptosporidiose em creches no município de Campinas, SP. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 1996.

Franco RMB, Cantúcio-Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz, 2002.

Franco RMB, Rocha-Eberhardt R, Cantúcio-Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2001.

Freitag B. Cidade e cidadania. Cidade dos homens. Rio de Janeiro: Edições Tempo Brasileiro Ltda., 2002.

Freitas AG. Recirculação de água de lavagem de filtros em escala piloto: uma contribuição para avaliação de perigos associados à presença de protozoários. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa - MG. 2007.

Fricker CR, Crabb J. Water-borne criptosporidiosis: detection methods and treatment options. Advanced parasitology, 1998.

Garcia MT. Alimentação complementar e estado nutricional de crianças menores de dois anos em Acrelândia, Acre, Amazônia Ocidental Brasileira. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2009.

Gerba CP, Rose JB, Haas CN. Sensitive populations: who is at greatest risk? International Journal of Food Microbiology, 1996.

Gerba CP. Risk assessment. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP. (ed.). Environmental microbiology. San Diego, 2000.

Gomes PDMF, Nunes VLB, Knechtel DS, Brilhante AF. Enteroparasitos em escolares do distrito Águas do Miranda, município de Bonito, Mato Grosso do Sul. Ver Patol Trop., 2010.

Gonçalves EMN, Silva AJ, Eduardo MBP, Uemura IH, Moura INS, Castilho VLP, Corbett CEP. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. Clinics, 2006.

Gonçalves ACM. Estudo de caso-controle sobre a etiologia da diarreia infecciosa em uma população soropositiva para o HIV do noroeste paulista. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto – SP. 2008.

Haas CN, Rose JB, Gerba (ed.). Quantitative Microbial Risk Assessment 2nd.ed. John Wiley & Sons, inc., New York, 2014.

Hachich EM, Galvani AT, Padula JA, Menegon N, Sato MIZ. Importância do controle dos parasitas patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas captadas para consumo humano. In: Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES, 2000.

Hachich EM, Sato MIZ, Galvani At, Menegon Jrn, Mucci JLN. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. Water science and technology, 2004.

Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/ nt. Nucleic Acids Symp. Ser., 1999.

Hashimoto A, Hirata T, Kunikane S. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in a conventional water purification plant. Water Science and Technology, 2001.

Hashimoto A, Kunikane S, Hirata T. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. Water Research, 2002.

Havelaar AH, Melse JM. Quantifying public health risk in the WHO guidelines for drinking-water quality: a burden of disease approach. Geneva: WHO, 2003.

HC - Health Canada. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality - Summary Table. Water and Air Quality Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario, 2014.

Heller I, Bastos RKX, Vieira MBCM. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. Epidemiol. Serv. Saúde, 2004.

Heller I. Terceira edição dos guias da Organização Mundial Da Saúde: que impacto esperar na portaria 518/2004? In: 23º Congresso Brasileiro De Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005, Mato Grosso. Rio de Janeiro: ABES, 2005.

Heller I, Vieira MBCM, Brito ILA, Salvador DP. Association between the concentration of protozoa and surrogates in effluents of the slow sand filtration for water treatment. Braz. J. Microbiol., 2007.

Hofstra N. Exploring global *Cryptosporidium* emissions to surface water. Sci Tot Environ, 2013.

Hunter PR, Fewtrell I. Acceptable risk in water quality - guidelines, standards and health: assessment of risk and risk management for water-related infectious disease. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2001.

Hunter PR, Thompson ARC. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. International Journal for Parasitology, New York, 2005.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2010. Brasília, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Atlas de saneamento. Brasília, 2011.

Jiang J. Distribution of *Cryptosporidium* in storm event water samples from three watersheds in New York. Applied and environmental microbiology, 2005.

Kahn HD, Stralka K. Estimated daily average per capita water ingestion by child and adult age categories based on USDA's 1994-1996 and 1998 continuing survey of food intakes by individuals. J. Exposure science and environmental epidemiology, 2009.

Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. London: Journal of Water and Health, 2007.

Koach PD, Olson ME, Whitley G, Wallis PM. Waterborne *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in the Yukon, Canada. Applied and environmental microbiology. 1993.

Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, Lima AA, Guerrant RL. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008.

Krause IEB. Prevalência e fatores associados aos enteroparasitos em pacientes HIV positivos atendidos no serviço de assistência especializada de Pelotas – RS, Brasil. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS. 2009.

Ladeia MM. Avaliação da eficiência da filtração rápida descendente na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em instalação piloto. Dissertação (mestrado). Belo horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – MG. 2004.

Leal DAG. Avaliação da contaminação de ostras (*crassostrea rhizophorae*) por espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* em um ambiente de estuário do litoral de São Paulo. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2008.

Leal PMRM, Heller L, Cerqueira DA, Queiroz JTM. Avaliação Quantitativa do Risco à Saúde: Protozoários em água de consumo, um estudo em Divinópolis-MG. Cad saúde Colet, 2009.

Lechevallier MW, Norton WD, Lee GR. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. Applied and Environmental Microbiology, 1991.

Lechevallier MW, Norton WD, Atherholt TB. Protozoa in open reservoirs. Journal of American Water Works Association, 1997.

Lee HS, Kim HY, Do HJ, Kim SH. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the Nakdong river and their removal during water. Journal of Water and Health, 2007.

Levy DA, Bens MS, Craun GF, Calderon RL, Herwaldt BL. Surveillance for waterborne disease outbreaks: United States, 1995–1996. Morb. Mortal Wkly, 1998.

Libânio M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. Campinas: Átomo, 2010.

Lim YAL, Ahmad RA, Smith HV. Current status and future trends in *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology in Malasy. Journal of Water and Health, 2008.

Lindsay DS, Blagburn BL. *Cryptosporidium*. In: Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB (ed.). Parasitic Diseases of Wild Birds. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2008.

Lippy EC. Tracing a *giardiasis* outbreak at Berlin, New Hampshire. J. Am. Wat. Wks Assoc, 1978.

Lippy EC. Waterborne disease: occurrence is on the upswing. J. Am. Wat. Wks Assoc., 1981.

Lobo ML, Xiao I, Antunes F, Matos O. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. Letters in Applied Microbiology, 2009.

Lomazi EA. Identificação de agentes enteropatogênicos (bactérias, vírus e parasitas) nas fezes de crianças com diarreia aguda na cidade de Paulínia – SP. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 1990.

Lopes AMMB. Avaliação da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp. e sua associação com indicadores bacteriológicos e turbidez na represa de Vargem das Flores – MG. Dissertação (mestrado). Universidade de Viçosa. Viçosa – MG, 2008.

Lopes GJR. Avaliação da turbidez e do tamanho de partículas como parâmetros indicadores da remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas etapas de clarificação no tratamento de água em ciclo completo. Dissertação (mestrado). Universidade de Viçosa. Viçosa – MG. 2008.

Machado ECI. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife/PE. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

MacIer BA, Regli S. Use of microbial risk assessment in setting US drinking water standards. International Journal of Food Microbiology, 1993.

Maia MMM. Estado nutricional, consumo alimentar, deficiência de micronutrientes e doenças parasitárias em crianças de 0 a 10 anos de idade atendidas em serviços de saúde da cidade de Manaus, Amazonas. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG, 2006.

Malta RCG. Estudo epidemiológico dos parasitas intestinais em crianças no município de Votuporanga – SP. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2005.

Marks MM, Coleman ME, Lin CT, Roberts T. Topics in microbial risk assessment: dynamic flow tree process. Risk analysis, 1998.

Martins J. Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (gdh) e beta-giardina (bg). Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo - SP. 2010.

Mascarini IM. Epidemiologia da enteroparasitoses em crianças menores de sete anos em creches na cidade de Botucatu – SP. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2007.

Mason BW, Chalmers RM, Carnicer-Pont D, Casemore DP. A *Cryptosporidium hominis* outbreak in north-west Wales associated with low oocyst counts in treated drinking water. J Water Health, 2010.

Maul A. Heterogeneity: a major factor influencing microbial exposure and risk assessment. Risk analysis, 2014.

Medema GJ, Schets FM, Teunis, Havelaar AH. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. Applied and environmental microbiology, 1998.

Medema GJ, Schijven JF. Modelling the sewage discharge and dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. Water Research, 2001.

Morrison HG, Mcarthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science, 2007.

Muller APB. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da Região Metropolitana de São Paulo. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 1999.

Nascimento MF. Remoção de oocistos de *Cryptosporidium* por meio da filtração direta ascendente em areia: avaliação em escala piloto. Dissertação (mestrado). Universidade de Brasília. Brasília – DF, 2009.

NRMMC - National Health and Medical Research Council. Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy. National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, Canberra, 2011.

Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia humana. 11^o Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

Newman RD, Wuhib T, Lima M, Guerrant RI, Sears CI. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Fortaleza, 1993.

Nieminski EVAC. Removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* through conventional water treatment and direct filtration. EPA/600/SR-97/025, 1997.

Nishi I, Baesso ML, Santana RG, Fregadolli P, Falavigna DLM, Falavigna-Guilherme AL. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system. Zoon. Public. Health, 2009.

Ojima R. Análise comparativa da dispersão urbana nas aglomerações urbanas brasileiras: elementos teóricos e metodológicos para o planejamento urbano e ambiental. Campinas - SP, 2007.

Oliveira ABA. Condição higiênico-sanitária da água, alimentos e ambiente de preparo da alimentação em escolas públicas atendidas pelo programa nacional de alimentação escolar no município de Porto Alegre - RS. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, 2011.

Oliveira AA. Enteroparasitas em populações usuárias de diferentes sistemas de abastecimento de água em Viçosa-MG. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2004.

Oliveira CHB. Frequência de enteroparasitos em usuários do serviço público de saúde na Mesorregião do Oeste Potiguar. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal – RN, 2013.

Oliveira MAA. Prevalência de enteroparasitoses em comunidade carente de Fortaleza - CE: comparação entre duas décadas. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE, 2011.

Oliveira PV. Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no Rio Atibaia, bacia do Rio Piracicaba, Campinas, São Paulo. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas, 2005.

Oliveira SA. Parasitos entéricos oportunistas em crianças nefropatas crônicas submetidas à hemodiálise. Dissertação (mestrado). Universidade de Goiás. Goiânia – GO, 2012.

Oliver JG. Calidad en salud pública. Gac sanit, 2005.

Ortega-Pierres G, Cacciò SM, Fayer R, Mank TG, Smith HV, Thompson RCA. *Giardia* and *Cryptosporidium*: from molecules to disease. Oxfordshire, UK: CABI, 2009.

Parkin RT. Microbial risk assessment. In: Robson M, Toscano W, editors. Risk Assessment for Environmental Health. San Francisco: John Wiley & Sons, 2007.

Payment P, Berte A, Prévost M, Ménard B, Barbeau B. Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. Canada Journal of Microbiology, 2000.

Pereira RAT. Diagnóstico parasitológico e sorológico da toxocaríase, esquistossomose mansoni e parasitos intestinais. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2003.

Pérez GC, Cordova OPS, Vargas FV, Velasco JRS, Sempere LB, Sánchez MM, Rosales MJ. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in peruvian children. Parasitol Res, 2008.

Perz JF, Ennever FK, Le Blancq, SM. *Cryptosporidium* in tap water - comparison of predicted risks with observed levels of disease. Am. J. Epidemiol, 1998.

Plutzer J, Ongerth J, Karanis. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2010.

Pocol AP. Avaliação dos indicadores utilizados para monitoramento das ações do programa de vigilância da qualidade da água para consumo humano do Estado de São Paulo – Proágua. [dissertação de mestrado]. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 2006.

Portugal. Decreto-lei 306 de 27 de agosto de 2007. Diário da República 1.^a série, n.º 164. Portugal, 2007.

Prado MS, Strina A, Barreto MI, Oliveira-Assis NA, Paz LM, Cairncross S. Risk factors for infection with *Giardia duodenalis* in pré-school children in the city of Salvador, Brazil. Epidemiol. Infect, 2003.

Prystajecky N, Huck PM, Schereir H, Isaac-Renton JL. Assessment of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. as a microbial source tracking tool for surface water: application in a mixed-used watershed. Applied and Environmenatl Microbiology, 2014.

Queiroz JTM, Heller L, Silva SR. Análise da correlação de ocorrência da doença diarreica aguda com a qualidade da água para consumo humano no município de Vitória-ES. São Paulo: Saúde Soc., 2009.

R Development Core Team. R: A language an environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2014.

Razzolini MTP, Nardocci AC. Avaliação de risco microbiológico: etapas e sua aplicação na análise da qualidade da água. INTERFACEHS, 2006.

Razzolini MTP, Günther WMR. Impactos na saúde das deficiências de acesso a água. Revista saúde e sociedade, 2008.

Razzolini MTP, Silva Santos TF, Bastos KB. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* (oo)cysts in watersheds and drinking water sources in Brazil urban areas. J. Water Health, 2010.

Recuero ALC. Giardiose humana e bovina na bacia leiteira do município de Capão do Leão, RS. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS, 2007.

Reis VW. Fatores de risco de diarreia humana associado às condições de saneamento básico em Ouro Preto, MG. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto – MG, 2007.

Ribeiro Junior AGM. Epidemiologia das parasitoses intestinais e toxocaríase no município de Pedro de Toledo – SP. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2002.

Ribeiro DC. Inquérito epidemiológico de infecções parasitárias intestinais em trabalhadores rurais canavieiros na regiões de Campinas e Ribeirão Preto. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2011.

Risebro HL, Doria MF, Andersson Y, Medema G, Osborn K, Schlosser O, Hunter PR. Fault tree analysis of the causes of waterborne outbreaks. J. Wat. Health, 2007.

Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK, Strand E, Alvsvåg JO, Langeland N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne *Giardiasis* in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. Appl Environ Microbiol, 2007.

Rose JB, Haas CN, Regli S. Risk assessment and control of waterborne giardiasis. American Journal of Public Health, 1991.

Rose JB, Huffman DE, Gennaccaro A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. Fems Microbiol Rev, 2002.

Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. Parasitology, 2014.

Ryu H, Morteza A. Long-term study of *Cryptosporidium* and *Giardia* occurrence and quantitative microbial risk assessment in surface waters of Arizona in the USA. J. Water and health, 2008.

Sadovsky ADI. Agentes infecciosos associados à diarreia aguda em crianças até três anos de idade: estudo em um hospital de referência no município de Vitória – ES. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória – ES. 2005.

Sales TFSM. Detecção de enteroparasitas e organismos do zooplâncton em água de consumo humano: risco à saúde pública. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco – PE, 2006.

Santos CK. *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.: prevalência e possíveis fatores associados à infecção em crianças procedentes de creches públicas de uma área de alta endemicidade no sudeste do Brasil. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG. 2008.

Santos CK, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, Mundim MJ, Cury MC. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2012.

Santos D, Moreira M, Almeida AB. Avaliação do risco da degradação da qualidade da água em sistemas públicos de abastecimento. Repositório científico da Universidade de Évora. In: CLME 2011-IIICEM A Engenharia como alavanca para o Desenvolvimento e Sustentabilidade. Portugal, 2011.

Sato MIZ, Galvani AT, Padula JA. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. Sci. Total Environ, 2013.

Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘neglected diseases initiative’. Trends parasitol, 2006.

Scalia IAM. Identificação molecular dos isolados de *Giardia duodenalis* em crianças procedentes dos municípios de Araguari e Uberlândia. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG, 2012.

Schets FM, Van Wijnen JH, Schijven JF, Schoon H, Roda Husman AM. Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam, The Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these waters. *Applied and environmental microbiology*, 2008.

Sevá AP. Identificação de assinaturas genéticas em região codificadora de menor unidade ribossômica de *Cryptosporidium* spp.: caracterização molecular de amostras de mamíferos e aves. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, 2009.

Shaw PK, Brodsky RE, Lyman DO, Wood BT, Hibler CP, Healy GR, Macleod KI, Stahl W, Schultz MG. A community wide outbreak of *Giardiasis* with evidence of transmission by a municipal water supply. *Ann. Intern. Med.* 1977.

Silva CF. Remoção de oocistos e de indicadores físicos de *Cryptosporidium parvum* em águas de abastecimento por meio da decantação – estudo em escala piloto. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG, 2008.

Šlapeta J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow. *International Journal for Parasitology*, Oxford, 2013.

Smith HV, Rose JB. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitology Today*, 1998.

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. Situação de Saneamento Nno Brasil. Ministério da Saúde: Brasília, 2011.

Soller JA. Use of microbial risk assessment to inform the national estimate of acute gastrointestinal illness attributable to microbes in drinking water. *J. of Wat. Health*, 2006.

Solo-Gabriele H, Neumeister S. US outbreaks of cryptosporidiosis. J. Am. Wat. Wks Assoc, 1996.

Souza PX. Nova abordagem laboratorial na investigação das enteroparasitoses em humanos. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Fluminense. Niterói – RJ, 2005.

Standridge J. *E. Coli* as a public health indicator of drinking water quality. Journal American Water Works Association, 2008.

Teixeira JC, Heller L, Barreto ML. *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-settlements in Brazil. Cad. Saude Pública, 2007.

Teles NSB. Avaliação da eficácia terapêutica da mentha crispa no tratamento da giardíase. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza - CE. 2008.

Teunis PFM, Medema GJ, Kruidenier L, Havelaar AH. Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in drinking water from a surface water source. Wat. Res, 1997.

Ulloa-Stanojlovic FM. Detecção molecular de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto provenientes do estado de São Paulo e da cidade de Lima, Peru. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 2014.

UNEP – United Nations Environment Programme. Sick water? The central role of wastewater management in sustainable development. A rapid response assessment. Birkeland, 2010.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. National primary drinking water regulations. Filtration, disinfection, turbidity, *Giardia lamblia*, viruses, legionella, and heterotrophic bacteria; final rule. Part III. Federal register (54 FR 27486). Washington, DC, 1989.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Guidance manual for compliance with the filtration and disinfection requirements for public water systems: using surface water sources. Washington, DC, 1991.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. National Primary Drinking Water Regulations: interim enhanced surface water treatment; final rule. Part V (40 CFR, parts 9, 141 and 142). Washington, DC, 1998.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. National Primary Drinking Water Regulations: long term 2 enhanced surface water treatment rule; final rule. Federal register part II (40 CFR, parts 9, 141 and 142). Washington, DC, 2006.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Microbial risk assessment guideline: pathogenic microorganisms with focus on food and water. Washington, DC, 2012a.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Office of Water. Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Washington, DC, 2012b.

Valentim, LSO. O plano de segurança da água no contexto sanitário paulista. Boletim Epidemiológico Paulista. São Paulo, 2015.

Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. Acta Trop, 2007.

WHO - World Health Organization. International standards for drinking-water. Geneva, 1958.

WHO - World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 1st edition. Geneva, 1984.

WHO - World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 2nd edition. Geneva, 1993.

WHO - World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 3rd. edition. Geneva, 2004.

WHO - World Health Organization. Guideline for the safe use of wastewater, excreta and greywater in agriculture. volume 4: wastewater use in agriculture. Geneva, 2006.

WHO - World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 4th. edition. Geneva, 2011.

Widerström M, Schönning C, Lilja M, Lebbad M, Ljung T, Allestam G, Ferm M, Björkholm B, Hansen A, Hiltula J. Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. Emerging Infectious Diseases, 2014.

Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk TK, Gradus S, Lal A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw water and wastewater. Appl environ microbial, 2001.

Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Experimental parasitology, London, 2010.

Xiao S, An W, Chen Z, Zhang D, Yu J, Yang M. The burden of drinking water-associated cryptosporidiosis in China: the large contribution of the immunodeficient population identified by Quantitative Microbial Risk Assessment. *Water Research*, 2012.

Yamashiro S. Monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em um manancial eutrofizado com presença de florações de cianobactérias: represa de Salto Grande, Americana - SP. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2010.

ANEXO I

Quantificação dos (oo)cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

1 – Concentração da amostra

1.1. Primeiramente, o fluxo de 1 a 4L por minuto foi ajustado mediante passagem de água reagentes, após esse ajuste realizou-se a filtração da amostra;

1.2. O filtro de espuma do sistema Filta-Max® foi colocado no compartimento do filtro e procedeu-se ao fechamento do mesmo para a passagem da amostra, sem vazamentos;

1.3. Após a passagem da amostra, deixou-se a pressão diminuir para escoamento total do fluxo. Nessa etapa, se houve saturação do filtro de espuma, esse foi trocado quantas vezes fossem necessárias;

1.4. Após a filtração, o filtro de espuma do sistema Filta-Max® foi transferido e fixado ao tubo de eluição da estação de lavagem manual (Idexx®). O compartimento de filtros foi lavado com solução tampão (PBST – solução salina tamponada com fosfato). O excedente de amostra e a água de lavagem foram incorporados ao tubo de eluição;

2 – Eluição da amostra

2.1. A membrana (73mm), com a parte rugosa voltada para cima, foi posicionada na base do tubo de concentração e acoplada novamente ao tubo. O filtro de espuma saturado com a amostra foi fixado à cabeça do êmbolo e em seguida o tubo de eluição acoplado à cabeça do êmbolo da estação de lavagem manual;

2.2. O tubo de eluição foi deslocado para baixo para a retirada do parafuso do filtro de espuma permitindo que a haste de aço fosse acoplada à base do tubo de eluição;

2.3. Um volume de 600mL foi adicionado ao tubo de concentração e este, logo em seguida, foi atarraxado à base do tubo de eluição para a realização da primeira lavagem;

2.4. A lavagem dos discos de espuma foi promovida pela movimentação, ascendente e descendente, do êmbolo, por 20 vezes. Esses movimentos foram suaves para prevenir a formação de espuma e danificação dos discos de espuma;

2.5. Após essa primeira etapa de lavagem, o tubo de concentração foi desatarraxado e o líquido que ficou no interior da haste de aço foi purgado e incorporado ao conteúdo do tubo de concentração;

2.6. O tubo de concentração contendo o resultado da primeira etapa de lavagem foi levado ao agitador magnético e o conjunto de vácuo manual acoplado à torneira da parte inferior do tubo de concentração. Com o auxílio da bomba de vácuo manual o líquido contido nesse tubo foi drenado até o limite de um volume de 50mL, recobrindo a membrana posicionada na base do tubo. Em seguida, esse volume de 50ml foi transferido a um tubo cônico de centrífuga com capacidade de 50mL; Obs: O vácuo aplicado foi o menor possível, não excedendo a 30cmHg.

2.7. Para o enxágue do tubo de concentração, um volume aproximado de 50mL foi utilizado e então transferido a um tubo de capacidade de 50mL;

2.8. Para a realização da segunda lavagem, procedeu-se, como o mesmo procedimento da primeira lavagem e, então seguiu-se para a concentração do eluído obtido na segunda lavagem, com a incorporação do concentrado obtido na etapa anterior;

2.9. Após completar as duas etapas de eluição e concentração, foi realizada a eluição e a concentração da membrana;

2.10. A membrana foi retirada da base do tubo de concentração e colocada no interior de um saco plástico, com a adição de 5mL de PBST. A membrana então foi massageada através do saco plástico até adquirir um aspecto limpo e o eluído transferido ao tubo de capacidade de 50mL. Essa operação foi repetida por uma segunda vez e, se observada necessidade, por uma terceira. Obs: Foram usadas quantas membranas fossem necessárias, de acordo com a turbidez da amostra;

2.11. O concentrado foi transferido para tubos cônicos de centrífuga de 250mL ou 50mL, dependendo da necessidade.

3 – Concentração e purificação

3.1 O eluato obtido foi concentrado por centrifugação por 15 minutos a 1500XG. Após a centrifugação, foi obtido o pellet e o seu volume registrado, assim como a data e hora da concentração;

3.2 Caso, o volume do pellet fosse menor que 0,5mL, o sobrenadante era cuidadosamente aspirado, utilizando-se pipeta Pasteur, deixando um volume total de 5mL;

3.3 A etapa de IMS foi realizada com todos os reagentes a temperatura ambiente, 15°C a 25°C.

3.4 A partir do tampão SL-A 10X fornecido, foi preparada uma diluição de 1X do tampão SL-A;

3.5 A um tubo de lado plano, foi adicionado 1mL de tampão SL-A 10X e 1mL do tampão SL-B fornecido. Para a captura dos cistos e oocistos foi utilizada pipeta graduada de 10mL (enxaguada com o tampão de eluição) e a amostra concentrada foi transferida ao tubo de lado plano contendo tampão SL;

3.6 Foi efetuada a agitação em agitador tipo Vortex contendo os Dynabeads Crypto-Combo do kit por, aproximadamente, 10 segundos;

3.7 Foram adicionados 100µL de Dynabeads GC-Combo ao tubo contendo o concentrado e os tampões A e B;

3.8 Após a realização da etapa anterior, o tubo foi fixado a um mixer rotatório e sofreu agitação por 1 hora a 18 rpm e, então, foi removido e colocado no concentrador de partículas magnéticas (MPC-1), com o lado plano do tubo junto ao magneto;

3.9 O tubo foi removido do MPC-1 e procedeu-se a ressuspensão da amostra, com a adição de 1mL do tampão SL-A 1X (preparado anteriormente, a partir do tampão SL-A 10X, solução estoque fornecida). Nessa etapa não houve agitação em agitador tipo Vortex;

3.10 Foram efetuados dois enxágües (o primeiro com 1,5mL de solução tampão SL-1X e o segundo com 0,5mL de água purificada), o líquido foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL;

3.11 O tubo de microcentrífuga contendo a amostra foi colocado em um segundo concentrador de partículas magnéticas (MPC-M), com sua faixa magnética, por 1 minuto com, aproximadamente, um balanço de 180° por segundo. Ao final

dessa etapa, as partículas produziam mancha nítida marrom na parte posterior do tubo;

3.12 O sobrenadante obtido no tubo mantido no MPC-M, foi imediatamente aspirado;

3.13 Para a dissociação dos cistos e oocistos das partículas, a faixa magnética foi removida do MPC-M e adicionados 100µL de água purificada ao tubo de microcentrífuga e esse foi submetido a agitação em agitador tipo Vortex;

3.14 Após agitação, o tubo foi transferido a um banho úmido e incubado a 80°C por 10 minutos;

3.15. Passados 10 minutos, o tubo de microcentrífuga foi submetido a nova agitação em agitador tipo Vortex, assegurando-se que toda a mostra se encontrava no fundo do tubo;

3.16. O tubo foi, então, colocado no MPC-M com a faixa magnética e todo o seu conteúdo foi transferido para uma das cavidades (poço) da lâmina de imunofluorescência.

4 – Coloração em Lâmina

4.1 Os controles positivos (cistos de *Giardia* sp / oocistos de *Cryptosporidium* sp) e controle negativo (água destilada) foram preparados nas cavidades da lâmina de imunofluorescência;

4.2 Foram adicionados em lâminas secas 10µL de metanol absoluto em cada cavidade da lâmina contendo os controles, positivo e negativo, e deixou-se secar a amostra a 42,5°C por 10 minutos;

4.3 Passado os 10 minutos, foi aplicado o corante num volume de 50µL a cada cavidade. A lâmina foi colocada em câmara úmida e escura a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 50µL do tampão de lavagem e o excesso foi retirado, cuidadosamente, com o auxílio de papel toalha absorvente, não tocando na amostra;

4.4 Foram adicionados 100µL de uma solução DAPI 2X (4',6-diamidino-2-fenil-indol) a cada cavidade e esperou-se, no mínimo, 1 minuto para retirar o excesso desse reagente, cuidadosamente, com o auxílio de papel toalha absorvente, não tocando na amostra;

4.5 A montagem da lâmina se deu mediante a adição do meio de montagem DABCO/glicerol 2% em cada cavidade e colocação de lamínula, a qual teve suas bordas seladas com esmalte incolor;

4.6 Foram registradas a data e hora da coloração;

4.7 Após essa etapa, foi realizada a leitura das lâminas.

5 – Leitura dos Resultados

5.1 Cada lâmina foi examinada sistematicamente, com movimentos verticais e horizontais;

5.2 Se a lâmina do controle positivo apresentou cistos/oocistos na quantidade esperada e se na lâmina do controle negativo não houve a presença de cistos/oocistos, foi utilizada a epifluorescência para examinar a amostra, num aumento de 200X, na busca de cistos e oocistos com fluorescência verde;

5.3 O exame e confirmação foi realizado mediante ensaio de imunofluorescência, características de coloração com DAPI e microscopia interferencial e diferencial. Foram registradas as ocorrências de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*.

6 – Cálculo dos resultados

O número de cistos de *Giardia* ou oocistos de *Cryptosporidium* foi calculado conforme a fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de cistos ou oocistos} = \frac{\text{número de cistos/oocistos confirmados}}{V \times F \times R}$$

Onde:

F = fração do *pellet* purificado por IMS

R = fração de amostra analisada ao microscópio

V = volume de amostra filtrada (L)

Os resultados foram expressos em: Número de cistos de *Giardia* ou oocistos de *Cryptosporidium* / L

7 – Controle de qualidade

Para a etapa de controle de qualidade, foi realizado o ensaio de Precisão e Recuperação Inicial segundo as recomendações do Método EPA 1623.1 (USEPA, 2012b), utilizando-se suspensão padronizada EasySeed™ (BTF, Austrália), contendo 100 cistos de *Giardia* e 100 oocistos de *Cryptosporidium*, seguindo as instruções do fabricante. Para a determinação da taxa de recuperação, foi calculada a média dos cinco ensaios realizados, bem como o DP e o desvio padrão relativo (DPR). A taxa de recuperação foi calculada segundo a equação:

$$R = \left[\frac{\text{número de cistos/oocistos}}{\text{número de cistos/oocistos da suspensão padronizada}} \right] \times 100$$

Para o cálculo da determinação do desvio padrão relativo utilizou-se a equação abaixo:

$$\text{DPR} = (\text{desvio padrão/média}) \times 100.$$

ANEXO II

Caracterização Molecular dos genótipos A e B de *Giardia intestinalis* por PCR em tempo real

Foram selecionados iniciadores descritos por ULLOA-STANOJLOVIĆ (2014) e foi desenhado um iniciador reverso para o genótipo A de *Giardia intestinalis* que flanqueiam a região do gene *gdh* de *Giardia intestinalis* para identificação das sequências homólogas aos seus genótipos A e B (Quadro 5).

Quadro 5 - Lista de iniciadores que foram empregados para amplificação e detecção de *Giardia intestinalis* genótipos A e B.

Genótipo	Iniciador ¹⁷	Sequência, 5'-3'	Fragmento (pb)	Referência
A	GiaA F (743)	CGGGCTATGGCGCTGTC	171pb	ULLOA-STANOJLOVIĆ (2014)
	GiaA A2R (760)	TGGTCCCGTTGGAGTCTGAGA		Este estudo
B	GiaBBF (757)	GATATTGGCGTCGGCGG	143pb	ULLOA-STANOJLOVIĆ (2014)
	GiaBBR (758)	AGCTCCATACCCTGTGGCCT		

Um novo iniciador (GiaA A2R) foi desenhado para complementar os iniciadores descritos por ULLOA-STANOJLOVIĆ (2014), pela seleção de regiões diferenciais para o genótipo A dos demais genótipos descritos para *Giardia intestinalis* a partir de sequências disponíveis no banco de dados *Genbank*¹⁸, que foram manualmente alinhadas utilizando o software Bioedit (HALL, 1999). Para verificação da melhor temperatura e avaliação das sequências dos iniciadores apropriadas para a amplificação por PCR em tempo real, foi utilizado o software Primer Express® Software for Realtime PCR versão 3.0 (Life Technologies)¹⁹.

A especificidade teórica do novo iniciador foi avaliada por meio do programa BLAST²⁰, este por sua vez utiliza o banco de dados do *Genbank*, comparando o fragmento com as sequências disponíveis para os diferentes organismos.

O iniciador foi selecionado considerando o menor valor de E (*expect value*) fornecido pelo banco de dados.

¹⁷ Número entre parêntesis indica o número do iniciador no Laboratório.

¹⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

¹⁹ www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4363991

²⁰ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Para controles positivos dos genótipos A e B de *Giardia intestinalis* foram utilizados produtos de amplificação do gene *gdh* previamente seqüenciados e descritos FERNANDES et al. (2011) e que estão armazenados sob o número 001/13 (Genótipo A GQ503134) e 003/13 (Genótipo B GQ503115) na coleção de culturas do Laboratório de Saúde Pública do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Os testes de especificidade dos iniciadores foram realizados utilizando como alvo o DNA extraído de amostras positivas para *Giardia sp.*, *Cryptosporidium*, cultura para ovos de *Ascaris sp* e *E. coli* (ATCC 25922).

Na reação de PCR em tempo real foi utilizado o sistema de detecção SYBER® Green Master Mix (*Applied Biosystems*®), 0,2µL (100µM) de cada iniciador (Exxtend Exxpress - Brasil) e 5µl do DNA extraído das amostras para o volume final de reação de 25µL. As amostras foram amplificadas no equipamento *Step One Plus – Real Time PCR System* (*Applied biosystems*™), nas condições pré-estabelecidas para o reagente SYBER®Green, *fast Run* (40 minutos), com curva de Melt. A figura 21 apresenta o alinhamento do par de iniciadores utilizados para a amplificação do genótipo A de *Giardia intestinalis* frente às seqüências dos diferentes genótipos disponíveis no banco de dados *Genbank*.

Figura 21 - Alinhamento do par de iniciadores utilizados para a amplificação do genótipo A de *Giardia intestinalis* frente às sequências dos diferentes genótipos disponíveis no banco de dados *Genbank*. O iniciador desenhado neste estudo está sublinhado.

ANEXO III

Caracterização Molecular de *Cryptosporidium* spp.**1 - Amplificação do DNA pela reação em cadeia pela polimerase dupla (Nested PCR) para detecção de *Cryptosporidium* spp.**

Para a detecção molecular da presença de *Cryptosporidium* spp. nas amostras foram realizadas amplificações do gene da região 18S rRNA comum a todas as espécies. Na primeira reação de PCR, foram utilizados os iniciadores externos, SCL1 - direto e o CPB-DIAGR – reverso, descritos por COUPE et al. (2005), amplificando o fragmento de, aproximadamente, 1035 pares de bases. Para a segunda etapa da PCR, foi utilizado o produto amplificado com os iniciadores internos 826 SSU rRNA direto e reverso descritos por XIAO et al.. (2001), resultando em um fragmento de 826pb, aproximadamente. As sequências dos iniciadores utilizados nas reações estão apresentadas no Quadro 6.

Quadro 6 - Descrição e sequências dos iniciadores empregados para amplificação do fragmento 18S rRNA de *Cryptosporidium*.

Primers	Seqüência	Fragmento (pb)	Banda
SCL1F	5'- CTGGTTGATCCTGCCAGTAG - 3'	~1035	COUPE et al., 2005
CPB-DIAGR	5'- TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG - 3'		
SSU F	5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG -3'	~826	XIAO et al., 2001
SSU R	5'- AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA - 3'		

A Nested PCR foi realizada em cinco réplicas para cada amostra, de acordo com ARAÚJO et al. (2011), a partir de 5µL de DNA, em mistura contendo: tampão de reação 1X (contendo 1,5 mM de MgCl₂), 1,0 µl de PVP 1%, 0,2 mM de solução de DNTs (Fermentas), 0,3 µM de cada iniciador (Bioneer Oligo Synthesis Report), 1,25U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega), e água ultra pura - Milli Q - para o volume final de 25µL.

As reações foram incubadas em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf®), como segue: 1 ciclo para desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 40 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; emparelhamento a 60°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 90 segundos e finalmente 1 ciclo para

extensão final 72°C por 10 minutos. Após a reação as amostras foram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador.

Para a segunda reação, *Nested* PCR, os produtos da primeira reação de PCR foram submetidos a diluições seriadas de 1:10 até 1:10.000 para redução da presença de possíveis agentes inibidores, e então 2 µL de cada uma das diluições foram utilizados para a segunda etapa da PCR com os iniciadores internos: 826 *SSU* direto e reverso descritos por XIAO et al. (2001) amplificando o fragmento de 826pb.

Para esta reação foi realizada uma mistura de PCR com volume final de 25 µL contendo 2 µL de produto amplificado (amplicon), tampão de reação 1X (contendo 1,5 mM de MgCl₂), 0,2 mM de solução de dNTPs (Fermentas), 0,3 µM de cada iniciador, 1,25 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e água ultra pura Milli Q em quantidade suficiente para completar o volume.

As condições para amplificação final do produto foram as mesmas da anterior à exceção da desnaturação a 94°C por 30 segundos e emparelhamento a 58°C por 45 segundos. Os produtos da segunda reação de PCR (*Nested*), foram purificados com o kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE® Health care, UK).

2 - Visualização dos produtos da *Nested* PCR através de eletroforese em gel de agarose

A cada tubo contendo o produto amplificado, foi adicionado 5µL de tampão carregador de amostra (glicerina + azul de bromofenol). Dez microlitros desta mistura foram aplicados em cada poço do gel de agarose 1,2% (*Amersham Biosciences*) corado com 5,0 µL de Brometo de etídio e imerso em Tampão Tris – Acetato - EDTA (TAE) 1X e submetidos à intensidade de corrente de 6 v/cm para separação dos fragmentos.

O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular 100bp Plus MassRuler™ DNA Ladder (Fermentas), presente em cada gel.

Os fragmentos foram visualizados sob fonte de luz ultravioleta de 302 nm. As imagens foram documentadas por meio do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP).

3 - Sequenciamento e Análises filogenéticas dos fragmentos amplificados para caracterização das espécies de *Cryptosporidium*.

O sequenciamento dos fragmentos amplificados foi realizado em laboratório externo (*Genomic Engenharia Molecular*). As seqüências obtidas nas amostras positivas para o fragmento 826pb foram alinhadas e submetidas ao sistema BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*) para comparação com seqüências disponíveis de *Cryptosporidium* no banco de dados *Genbank*²¹.

A história evolutiva foi inferida usando o método de *Neighbor-Joining*. A percentagem de árvores replicadas em que a taxa associada dos agrupados no teste de inicialização (1000 replicas), é mostrada ao lado dos ramos. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos dos ramos nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas usados para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura 3-parâmetro e estão em unidades do número de substituições de bases por local. A análise envolveu 35 seqüências de nucleotídeos. Todas as posições contendo lacunas foram eliminadas. Foram analisados o total de 734 posições no conjunto de dados final.

As Análises filogenéticas foram realizadas através do programa Mega 5²². Possibilitando a observação da relação filogenética entre os isolados nas amostras do ribeirão dos Cristais e seqüências conhecidas depositadas no Banco de Dados *Genbank*.

²¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

²² http://www.megasoftware.net/m_test_reliab.html

ANEXO IV

Quantificação de CTT e *E. coli*

Para a quantificação de CTT e *E. coli* foi realizado o procedimento descrito abaixo:

1. Adicionou-se o substrato Colilert (meio de cultura) já preparado e fornecido pela Idexx em 100mL de amostra ou suas diluições. Após agitação a amostra foi transferida para a cartela Quanti-Tray para contagem de até 2000 NMP/100mL. A cartela Quanti-Tray foi selada na prancha de selagem e incubada a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (técnica adaptada).

2. Após 24 horas de incubação, a amostra que apresentou coloração amarela, devido à quebra de ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) pela ação da enzima β -galactosidase, foi considerada positiva para a presença de CTT. Foram consideradas positivas para *E. coli* aquelas que, além de amarelas, indicaram fluorescência quando observadas na luz ultravioleta (UV 365nm), demonstrando a metabolização do MUG (4-metilumbelifenil- β -Dglicuronídeo) pela ação da enzima β -glucoronidase.

3. Para encontrar o índice de NMP/100mL foi consultada a tabela de NMP fornecida pelo fabricante, em que são dados os limites de confiança de 95% para cada valor de NMP determinado.

Os resultados foram expressos em NMP/100mL.

8 - CURRÍCULO LATTES MARCEL OLIVEIRA BATAIERO

Dados gerais Formação Atuação Projetos Produções Eventos +

Marcel Oliveira Bataiero

Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/3463159893967832>

Última atualização do currículo em 17/10/2015

Possui graduação em Licenciatura Plena em Enfermagem pela Universidade de São Paulo (2005), graduação em Enfermagem pela Universidade de São Paulo (2005) e mestrado em Ciências pela Universidade de São Paulo (2009). Tem experiência na área de Saúde Pública, com ênfase em Vigilância em Saúde. **(Texto informado pelo autor)**

9 - CURRÍCULO LATTES MARIA TEREZA PEPE RAZZOLINI

Dados gerais Formação Atuação Projetos Produções Eventos Orientações Bancas Citações +

Maria Tereza Pepe Razzolini

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2 - CA
CA - Ciências Ambientais

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/8467049839493963>

Última atualização do currículo em 24/11/2015

Possui graduação em Biologia pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (1986), mestrado em Saneamento Ambiental pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (1998) e doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (2003). Atualmente é professora associada do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Atuando na área de Microbiologia Ambiental, especialmente na avaliação da qualidade microbiológica de águas e avaliação quantitativa de risco microbiológico. **(Texto informado pelo autor)**