**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO**

BRISA MARIA FREGONESI

**Pesquisa de bioagentes na água do rio Pardo, Brasil, e
estimativa de risco de infecção e de doença por
Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp.**

**RIBEIRÃO PRETO
2017**

BRISA MARIA FREGONESI

Pesquisa de bioagentes na água do rio Pardo, Brasil, e
estimativa de risco de infecção e de doença por
Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp.

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

Linha de pesquisa: Saúde Ambiental

Orientador: Susana Inés Segura-Muñoz

RIBEIRÃO PRETO
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Fregonesi, Brisa Maria

Pesquisa de bioagentes na água do rio Pardo, Brasil, e estimativa de risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Ribeirão Preto, 2017.
140 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Susana Inés Segura-Muñoz

1. Água superficial. 2. *Escherichia coli*. 3. *Salmonella* Não Tifóide. 4. *Cryptosporidium* spp. 5. *Giardia* spp. 6. Risco de infecção e de doença. 7. Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico.

FREGONESI, Brisa Maria

Pesquisa de bioagentes na água do rio Pardo, Brasil, e estimativa de risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

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

Aprovado em / /

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Dedicatória

*Aos meus queridos pais, **Janete e Luiz Carlos**, que sempre me incentivaram a buscar o
que há de melhor em mim... Pela confiança em mim depositada e pelo amor
incondicional partilhado.*

Dedico este trabalho!

Agradecimento especial

*À minha querida orientadora **Profa. Dra. Susana Inés Segura-Muñoz**, pela confiança em minha capacidade, pela excelente orientação, e por sua inestimável competência. Agradeço pela compreensão e paciência em um dos momentos mais difíceis da minha vida, em que muitas vezes precisei me ausentar! Agradeço também por me proporcionar um dos bens mais valiosos: o conhecimento. Obrigada por tudo!*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, que me proporcionou mais esta oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Por sempre estar no comando do meu caminho, me guiando, me protegendo e me iluminando. Pelas inúmeras providências e maravilhas que tem feito em minha vida!

À minha família. Aos meus pais Janete e Luiz Carlos, e aos meus irmãos, André Felipe e Marcus Tiago, pela convivência diária, paciência, carinho e amor. Fê, não poderia me esquecer das inúmeras vezes que me carregou por toda cidade de Ribeirão Preto para buscar amostras comigo. Muito obrigada!

Aos meus amigos do LEPA, Meire, Cássio, Fabiana, Thaís, Beatriz, Rudison, Gabriel e Vanessa, que sempre se dispuseram de um tempinho para me ajudar em alguma coleta... Em especial, agradeço à Karina e ao Guilherme, pelas inúmeras vezes que me ajudaram nas análises, à Carol pelo companheirismo nos intermináveis domingos de coleta, e ao Renato pelo auxílio nas análises de risco.

Agradeço de um modo mais especial, meus “Lepinhas” que muito me aguentaram: Karina, Carol, Meire e Guilherme, obrigada por todos os cafés, todas as gargalhadas, e até mesmo por todos os sofrimentos que compartilhamos... assim, nossas alegrias se multiplicaram e os nossos problemas dividiram! Obrigada pela grande amizade, por sempre estarem prontos para me ajudar em tudo, e especialmente por permitirem com que o local de trabalho fosse um ambiente agradável e feliz.

Aos meus verdadeiros amigos, àqueles que nem preciso citar nomes. Obrigada pela amizade, risadas, conversas, desabafos e companheirismo.

Ao José Antônio Padula, pela grande ajuda na leitura das lâminas de Cryptosporidium e Giardia.

À Profa. Dra. Maria Tereza Pepe Razzolini, pelos ensinamentos partilhados desde o início do meu doutorado, pela disposição, pelas contribuições de extrema relevância e auxílio quanto ao entendimento da Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico. Sem a sua ajuda este estudo não sairia do papel;

Ao Dr. Eduardo Angelino Savazzi, pela disposição e contribuições de extrema relevância;

À Dra. Solange Martone Rocha pela paciência e disposição em nos ensinar a técnica de Salmonella Não Tifóide;

Não poderia deixar de agradecer aos “nossos vigilantes” Lico e Odilon por toda dedicação e carinho. Obrigada por cada “bom dia” desejado de coração... “ Bom dia, linda”, Bom dia, loira”, Bom dia, minha filha!”, “Esses dias você não está bem, o que está acontecendo?”, “Está tudo bem?”, “E o casório, quando sai?”... Sem vocês meus dias não seriam os mesmos... Vocês são os melhores do mundo!!

Aos “tiozinhos” dos ranchos, Alair, Cláudio e Jaime, que nos permitiram realizar as coletas de água de um modo mais seguro...

À FERP, pela oportunidade!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste projeto, muito obrigada!

Meus sinceros agradecimentos!

Trem Bala (Ana Vilela)

*“Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si
É sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti
É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz
É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós...*

*É saber se sentir infinito
Num universo tão vasto e bonito, é saber sonhar...
Então fazer valer a pena,
Cada verso daquele poema sobre acreditar*

*Não é sobre chegar
No topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo
E também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações*

*A gente não pode ter tudo
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?
Por isso eu prefiro sorrisos
E os presentes que a vida trouxe pra perto de mim*

*Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar
E sim sobre cada momento, sorriso a se compartilhar
Também não é sobre
Correr contra o tempo pra ter sempre mais
Porque quando menos se espera a vida já ficou pra trás...”*

RESUMO

FREGONESI, Brisa Maria. Pesquisa de bioagentes na água do rio Pardo, Brasil, e estimativa de risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. 2017. 140f. Tese (Doutorado em Enfermagem em Saúde Pública)- Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O lançamento de esgotos domésticos *in natura*, efluentes das estações de tratamento de esgoto e escoamento superficial, são relatados como importantes causas de poluição das águas superficiais. Sabe-se que a alteração da qualidade das águas dos rios restringe seus múltiplos usos e contribui para o aumento de doenças de veiculação hídrica, em decorrência da exposição oral a bioagentes patogênicos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi identificar e quantificar bioagentes presentes na água do rio Pardo, Brasil, e estimar o risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para a população, devido ao uso do rio como fonte de abastecimento público e recreação de contato primário, por meio da abordagem da Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM). Durante os anos de 2015 e 2016, foram realizadas seis coletas de amostras da água do rio Pardo (período chuvoso e período seco) em seis pontos, totalizando 36 amostras. Foram realizadas análises de identificação e quantificação de *E. coli*, *Salmonella* Não Tifóide, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Para estimativa de risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (AQRM), foram considerados diferentes populações (crianças e adultos), volumes de água ingerido, concentração de (oo)cistos e duração e frequência da exposição, de acordo com o cenário estabelecido. Os valores médios para *E. coli* variaram de $6,57 \times 10^1$ UFC/100 mL a $6,07 \times 10^3$ UFC/100 mL, apresentando diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os períodos chuvoso e seco. As densidades de *Salmonella* Não Tifóide foram baixas ($<0,6473$ a $1,55$ NMP/100 mL), com frequência de 13,9% das amostras positivas, evidenciando a circulação desse patógeno no ambiente. A concentração de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. variou de $<0,1$ a $0,4$ oocistos/L e $<0,1$ a $4,4$ cistos/L, respectivamente. Para abordagem da AQRM devido a ingestão da água do rio Pardo usada para abastecimento público, a probabilidade anual de infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foi maior para adultos do que para crianças, sendo que na maioria dos pontos apresentou resultados superiores ao risco anual tolerável pela USEPA (1×10^{-4}). No que diz respeito ao uso da água do rio Pardo para recreação de contato primário, a probabilidade diária e anual de infecção, bem como a probabilidade de doenças, foi maior para crianças, seguida de adultos/homens e adultos/mulheres. A probabilidade de criptosporidiose e giardíase esteve abaixo do limite tolerável pela USEPA ($3,6 \times 10^{-2}$), exceto no Ponto 4, em que a estimativa de risco de doença por *Giardia* spp. para crianças esteve acima deste valor. A presença de bioagentes em amostras de água do rio Pardo pode estar relacionada à poluição das águas por fontes pontuais e difusas. Esses achados refletem a importância de priorizar os recursos para implantação e complementação das Estações de Tratamento de Esgoto na UGRHI 4, a fim de prevenir as doenças de veiculação hídrica em populações que utilizam a água do rio Pardo para abastecimento público e recreação de contato primário.

Palavras chave: 1. Água superficial. 2. *Escherichia coli*. 3. *Salmonella* Não Tifóide. 4. *Cryptosporidium* spp. 5. *Giardia* spp. 6. Risco de infecção e de doença. 7. Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico.

ABSTRACT

FREGONESI, Brisa Maria. **Research on bioagents in the Pardo river water, Brazil, and estimated risk of infection and disease by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp.** 2017. 140f. Thesis (PhD)- Ribeirão Preto College of Nursing, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The discharge of domestic sewage, effluents of wastewater treatment plants and surface runoff, are reported as important causes of surface water pollution. It is known that the alteration of river water quality restricts its multiple uses and contributes to the increase of waterborne diseases, due to oral exposure to pathogenic bioagents. In this context, the aim of the present study was to identify and quantify bioagents present in Pardo river water, Brazil, and to estimate the risk of infection and disease by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. for the population, due to the use of the river as source of public supply and primary contact recreation, through the approach of Quantitative Microbial Risk Assessment (QMRA). During the years of 2015 and 2016, six samples of water from the Pardo river (rainy and dry season) were collected at six points, totaling 36 samples. Identification and quantification analyzes of *E. coli*, Non-typhoid *Salmonella*, *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. To estimate the risk of infection and disease by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. (QMRA), different populations (children and adults), volumes of ingested water, concentration of (oo) cysts, duration and frequency of exposure were considered according to the established scenario. Mean values for *E. coli* varied from 6.57×10^1 CFU / 100 mL to 6.07×10^3 CFU / 100 mL, showing statistically significant differences ($p < 0.05$) between the rainy and dry season. Non-typhoid *Salmonella* densities were low (< 0.6473 at 1.55 MPN / 100 mL), with a frequency of 13.9% of the positive samples, evidencing the circulation of this pathogen in the environment. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. concentration ranged from < 0.1 to 0.4 oocysts / L and < 0.1 to 4.4 cysts / L, respectively. In order to approach the QMRA due to the ingestion of Pardo river water used for public supply, the probability of annual infection by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. was higher for adults than for children, and in most points presented results higher than the risk tolerable by USEPA (1×10^{-4}). Regarding the use of Pardo river water for primary contact recreation, the daily and annual probability of infection, as well as the probability of illness, was higher for children, followed by adults / men and adults / women. The probability of cryptosporidiosis and giardiasis was below the limit tolerable by USEPA (3.6×10^{-2}), except in Point 4, where the estimated risk of disease by *Giardia* spp. for children was above this value. The presence of bioagents in Pardo river water may be related to water pollution by point and diffuse sources. These findings reflect the importance of prioritizing the resources for implementation and complementation of wastewater treatment plants at UGRHI 4, in order to prevent waterborne diseases in populations that use Pardo river water for public supply and primary contact recreation.

Keywords: 1. surface water. 2. Infection and Disease Risk. 3. *Escherichia coli*. 3. Non-typhoid *Salmonella*. 4. *Cryptosporidium* spp. 5. *Giardia* spp. 6. Infection and Disease Risk. 7. Quantitative Microbial Risk Assessment (QMRA).

RESUMEN

FREGONESI, Brisa Maria. Investigación de bioagentes en el agua del río Pardo, Brasil, y estimación de riesgo de infección y de enfermedad por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. 2017. 140f. Tesis (Doctorado en Enfermería en Salud Pública)- Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

El lanzamiento de desagües domésticos in natura, efluentes de las estaciones de tratamiento de aguas residuales y escurrimiento superficial, son reportados como importantes causas de contaminación de las aguas superficiales. Se sabe que la alteración de la calidad de las aguas de los ríos restringe sus múltiples usos y contribuye al aumento de enfermedades de transmisión hídrica, como consecuencia de la exposición oral a bioagentes patógenos. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue identificar y cuantificar bioagentes presentes en el agua del río Pardo, Brasil, y estimar el riesgo de infección y de enfermedad por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. para la población, debido al uso del río como fuente de abastecimiento público y recreación de contacto primario, por medio del abordaje de la Evaluación Cuantitativa de Riesgo Microbiológico (ECRM). Durante los años 2015 y 2016, se realizaron seis colectas de muestras del agua del río Pardo (período lluvioso y período seco) en seis puntos, totalizando 36 muestras. Se realizaron análisis de identificación y cuantificación de *E. coli*, *Salmonella* No Tifoide, *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. Para la estimación del riesgo de infección y de enfermedad por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. (ECRM), se consideraron diferentes poblaciones (niños y adultos), volúmenes de agua ingerida, concentración de (oo) quistes y duración y frecuencia de la exposición, de acuerdo con el escenario establecido. Los valores medios para *E. coli* variaron de $6,57 \times 10^1$ UFC / 100 mL a $6,07 \times 10^3$ UFC / 100 mL, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los períodos lluvioso y seco. Las densidades de *Salmonella* No Tifoide fueron bajas ($< 0,6473$ a $1,55$ NMP / 100 mL), con frecuencia del 13,9% de las muestras positivas, evidenciando la circulación de este patógeno en el ambiente. La concentración de (oo) quistes de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. varió de $< 0,1$ a $0,4$ ooquistes / L y $< 0,1$ a $4,4$ quistes / L, respectivamente. Para el abordaje de la ECRM debido a la ingestión del agua del río Pardo usada para abastecimiento público, la probabilidad anual de infección por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. fue mayor para adultos que para niños, siendo que en la mayoría de los puntos presentó resultados superiores al riesgo anual tolerable por la USEPA (1×10^{-4}). En lo que se refiere al uso del agua del río Pardo para la recreación de contacto primario, la probabilidad diaria y anual de infección, así como la probabilidad de enfermedades, fue mayor para los niños, seguida de adultos / hombres y adultos / mujeres. La probabilidad de criptosporidiosis y giardiasis estuvo por debajo del límite tolerable por la USEPA ($3,6 \times 10^{-2}$), excepto en el punto 4, en el que la estimación del riesgo de enfermedad por *Giardia* spp. para niños estaba por encima de este valor. La presencia de bioagentes en muestras de agua del río Pardo puede estar relacionada con la contaminación de las aguas por fuentes puntuales y difusas. Estos hallazgos reflejan la importancia de priorizar los recursos para implantación y complementación de las Estaciones de Tratamiento de Aguas Residuales en la UGRHI 4, a fin de prevenir las enfermedades de transmisión hídrica en poblaciones que utilizan el agua del río Pardo para abastecimiento público y recreación de contacto primario.

Palabras clave: 1. Agua superficial. 2. *Escherichia coli*. 3. *Salmonella* No Tifoide. 4. *Cryptosporidium* spp. 5. *Giardia* spp. 6. Riesgo de infección y de enfermedad. 7. Evaluación cuantitativa de riesgo microbiológico.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Porcentagem de tratamento de esgoto doméstico por município do estado de São Paulo, no ano de 2016.....	25
Figura 2 - Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. corados com ácido tricrômico, marcados com anticorpos monoclonais fluorescentes e sob microscopia de contraste de fase.....	37
Figura 3 - Cistos de <i>Giardia</i> spp. em lâminas preparadas com iodo, coradas com tricômico e sob microscopia de contraste de fase.....	41
Figura 4 - Trofozoítos de <i>Giardia</i> spp. em lâminas preparadas com iodo, coradas com tricômico e sob microscopia de contraste de fase.....	41
Figura 5 - Bacias Hidrográficas do estado de São Paulo.....	52
Figura 6 - Bacia Hidrográfica do Rio Pardo.....	53
Figura 7 - Representação gráfica dos pontos de coleta ao longo do rio Pardo, Brasil. Ribeirão Preto. 2015-2016.....	58
Figura 8 - Gráfico relativo aos meses de coleta de amostras da água do rio Pardo nos meses de chuva e seca. Ribeirão Preto. 2015-2016.....	59
Figura 9 - Colônias típicas para <i>E. coli</i> em meio ágar m-Tec modificado pela técnica de membrana filtrante.....	61
Figura 10 - Frascos e tubos com o meio TSB exibindo crescimento para <i>Salmonella</i> Não Tifóide (turvação).....	63
Figura 11 - Adição do caldo TSB positivo em meio MRSV para análise de <i>Salmonella</i> Não Tifóide.....	64
Figura 12 - Placa com o meio MRSV sem crescimento típico para <i>Salmonella</i> Não Tifóide (A) e com crescimento típico para <i>Salmonella</i> Não Tifóide (formação de halo esbranquiçado) (B).....	64
Figura 13 - Placa com o meio XLD apresentando crescimento típico para <i>Salmonella</i> Não Tifóide.....	65
Figura 14 - Meio TSI sem inoculação representado pela coloração vermelho laranja, levemente opalescente (A) e meio TSI com reação típica para <i>Salmonella</i> Não Tifóide (B).....	66
Figura 15 - Meio LIA sem inoculação (A) e meio LIA com reação típica para <i>Salmonella</i> Não Tifóide (B).....	67

Figura 16 - Urease negativa (sem mudança na coloração do caldo ureia) (A) e Urease positiva (com mudança na coloração do caldo ureia) (B).....	67
Figura 17- Sorologia negativa (A) e sorologia positiva (B) para análise de <i>Salmonella</i> Não Tifóide.....	68
Figura 18 - Sistema de filtração (Filta-Max) para análise de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. em amostras de água.....	71
Figura 19 - Etapa de eluição para análise de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. em amostras de água.....	72
Figura 20 - Etapa de concentração para análise de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. em amostras de água.....	73
Figura 21 - Etapa de separação imunomagnética para análise de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. em amostras de água.....	74
Figura 22 - Etapa de dissociação térmica para análise de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. em amostras de água.....	74
Figura 23 - Coloração FITC (A), DAPI (B) e DIC (C) para amostras positivas de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	75
Figura 24 - Coloração FITC (A), DAPI (B) e DIC (C) para amostras positivas de <i>Giardia</i> spp.....	76
Figura 25 - Modelo conceitual de exposição à <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. devido ao consumo da água do rio Pardo após tratamento convencional.....	80
Figura 26 - Modelo conceitual de exposição à <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. devido às atividades de recreação de contato primário.....	83
Figura 27 - Vista parcial do Ponto 1 no rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.....	87
Figura 28 - Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 1.....	88
Figura 29 - Mapa do município de São José do Rio Pardo, com as respectivas localizações dos pontos de captação de água para abastecimento público.....	89
Figura 30 - Rio Pardo sendo usado para atividades de recreação de contato primário próximo ao Ponto 1.....	90
Figura 31 - Vista parcial do Ponto 2 no rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.....	90
Figura 32- Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 2.....	91
Figura 33 - Vista parcial do Ponto 3 no rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.....	92

Figura 34 - Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 3.....	93
Figura 35 - Rio Pardo sendo utilizado para recreação de contato primário entre os Pontos 3 e 4. 2015.....	94
Figura 36 - Vista parcial do Ponto 4 no rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.....	95
Figura 37 - Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 4.....	95
Figura 38 - Rio Pardo sendo utilizado para fins recreacionais (natação) próximo ao Ponto 4.....	97
Figura 39 - Vista parcial do Ponto 5 no rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.....	97
Figura 40 - Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 5.....	98
Figura 41 - Rio Pardo sendo utilizado para recreação de contato primário próximo ao Ponto 5.....	99
Figura 42 - Vista parcial do local de coleta no Ponto 6 do rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.....	100
Figura 43 - Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 6.....	101

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Categorias e faixas de classificação dos Índices de Qualidade da Água.....	26
Tabela 2 -	Distribuição do número de sorotipos de acordo com as espécies e subespécies de <i>Salmonella</i>	31
Tabela 3 -	Distribuição das espécies de <i>Cryptosporidium</i> que acometem hospedeiros vertebrados.....	36
Tabela 4 -	Espécies de <i>Giardia</i> spp. segundo hospedeiros.....	40
Tabela 5 -	Municípios pertencentes à UGRI 4 e suas respectivas fontes de abastecimento de água, demanda de abastecimento, porcentagem da população atendida pela coleta e tratamento de esgoto.....	54
Tabela 6 -	Pontos de coleta de dados no Rio Pardo, municípios próximos aos pontos e localização geográfica. 2015-2016.....	58
Tabela 7 -	Resultados dos ensaios de Precisão e Recuperação Inicial (PRI) para <i>Salmonella</i> Não Tifóide, Média, Desvio Padrão (DP) e Desvio Padrão Relativo (DPR).....	70
Tabela 8 -	Resultados dos ensaios de Precisão e Recuperação Inicial (PRI) para (oo)cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> , Média, Desvio Padrão (DP) e Desvio Padrão Relativo (DVR).....	78
Tabela 9 -	Parâmetros de exposição para uso da água do rio Pardo para abastecimento público após tratamento convencional da água.....	82
Tabela 10 -	Parâmetros de exposição para uso da água do rio Pardo para recreação de contato primário.....	84
Tabela 11 -	Densidade de <i>Escherichia coli</i> (UFC/100mL) na água do rio Pardo nos seis pontos de coleta nos períodos chuvoso e seco e suas respectivas médias e desvio padrão. 2015-2016.....	102
Tabela 12 -	Densidade de <i>Salmonella</i> Não Tifóide (NMP/100mL) na água do Rio Pardo nos seis pontos de coleta no período chuvoso e seco. 2015-2016.....	105
Tabela 13 -	Concentração de (oo)cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> spp. na água do rio Pardo nos seis pontos de coleta no período chuvoso e seco, e médias dos pontos. 2015-2016.....	106

Tabela 14 - Probabilidade anual de infecção (P_a) e de doença (P_d) por <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. em crianças e adultos devido à ingestão da água do rio Pardo, após tratamento convencional da água. 2015-2016.....	109
Tabela 15 - Probabilidade diária de infecção (P_i), probabilidade anual de infecção (P_a) e a probabilidade anual de doença (P_d) por <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. em crianças e adultos devido à ingestão acidental da água do rio Pardo em atividades de recreação de contato primário. 2015-2016.....	115

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS.....	22
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1	Saneamento ambiental e sua relação com a qualidade de águas superficiais.....	24
3.2	Doenças de veiculação hídrica e bioagentes de significância sanitária.....	26
3.2.1	<i>Escherichia coli</i>	28
3.2.2	<i>Salmonella</i> spp.....	31
3.2.2.1	<i>Salmonella</i> Tifóide.....	32
3.2.2.2	<i>Salmonella</i> Não Tifóide.....	33
3.2.3	<i>Cryptosporidium</i> spp.....	35
3.2.4	<i>Giardia</i> spp.....	39
3.3	Monitoramento de bioagentes em águas superficiais.....	43
3.4	Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico.....	45
3.4.1	A identificação do perigo.....	46
3.4.2	Avaliação da exposição.....	47
3.4.3	Avaliação da dose-resposta.....	49
3.4.4	Caracterização do risco.....	50
3.5	Situação dos Recursos Hídricos no Brasil.....	50
3.6	Bacia Hidrográfica do rio Pardo.....	52
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1	Delineamento da pesquisa.....	57
4.2	Local de estudo e pontos de coleta.....	57
4.3	Períodos de coleta de amostras da água do rio Pardo.....	58
4.4	Coleta das amostras da água do rio Pardo.....	59
4.5	Análises de amostras da água do rio Pardo.....	59
4.5.1	Identificação e quantificação da densidade de <i>Escherichia coli</i>.....	59
4.5.1.1	A preparação da amostra.....	60
4.5.1.2	Filtração da amostra.....	60
4.5.1.3	Incubação da amostra.....	61
4.5.1.4	Leitura e cálculo da densidade de <i>E. coli</i>	61
4.5.1.5	Teste de Controle de Qualidade para <i>Escherichia coli</i>	62
4.5.2	Identificação e quantificação da densidade de <i>Salmonella</i> Não Tifóide.....	62
4.5.2.1	Inoculação em Caldo Trípico de Soja (<i>Tryptic Soy Broth</i> - TSB).....	63
4.5.2.2	Isolamento em placas com meio Semissólido Rappaport Vassiliadis Modificado (<i>Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis</i> - MRSV).....	63
4.5.2.3	Isolamento em placas com meio ágar Desoxicolato Lisina Xilose (<i>Xylose Lysine Desoxycholate Agar</i> - XLD).....	65
4.5.2.4	Inoculação nos meios: Ferro Triplo Açúcar (<i>Triple Sugar Iron</i> – TSI), Ágar Ferro Lisina (<i>Lysine Iron Agar</i> – LIA), e caldo de ureia.....	65
4.5.2.5	Teste sorológico.....	68
4.5.2.6	Teste de Controle de Qualidade para <i>Salmonella</i> Não Tifóide.....	69
4.5.2.6.1	Precisão Inicial de Recuperação (PRI).....	69
4.5.2.6.2	Precisão e Recuperação em Curso (PRC).....	70
4.5.2.6.3	Semeadura da Matriz (Spike).....	70
4.5.3	Identificação e quantificação de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.....	71
4.5.3.1	Filtração.....	71

4.5.3.2	Eluição.....	71
4.5.3.3	Concentração da amostra.....	72
4.5.3.4	Separação Imunomagnética.....	73
4.5.3.5	Dissociação térmica.....	74
4.5.3.6	Microscopia de imunofluorescência	75
4.5.3.7	Teste de Controle de Qualidade para <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.....	76
	4.5.3.7.1 Taxa de Precisão e Recuperação Inicial (PRI).....	77
	4.5.3.7.2 Precisão e Recuperação em Curso (PRC).....	78
	4.5.3.7.3 Semeadura da Matriz (SM).....	78
4.6	Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM).....	79
4.6.1	Uso da água do rio Pardo para abastecimento público após tratamento convencional.....	80
4.6.2	Uso da água do Rio Pardo para recreação de contato primário.....	82
4.7	Análise dos dados.....	85
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
5.1	Caracterização dos pontos de amostragem no rio Pardo.....	87
5.1.1	Ponto 1.....	87
5.1.1.1	Uso do rio Pardo próximo ao Ponto 1.....	89
5.1.2	Ponto 2.....	90
5.1.2.1	Uso do rio Pardo próximo ao Ponto.....	92
5.1.3	Ponto 3.....	92
5.1.3.1	Uso do rio Pardo próximo ao Ponto.....	94
5.1.4	Ponto 4.....	94
5.1.4.1	Uso do rio Pardo próximo ao Ponto.....	96
5.1.5	Ponto 5.....	97
5.1.5.1	Uso do rio Pardo próximo ao Ponto.....	99
5.1.6	Ponto 6.....	100
5.1.6.1	Uso do rio Pardo próximo ao Ponto.....	102
5.2	Monitoramento de <i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella</i> Não Tifóide, <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. na água do rio Pardo.....	102
5.2.1	<i>Escherichia coli</i> na água do rio Pardo.....	102
5.2.2	<i>Salmonella</i> Não Tifóide na água do rio Pardo.....	104
5.2.3	<i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. na água do rio Pardo.....	106
5.3	Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM).....	108
5.3.1	Estimativa de risco de infecção e de doença por <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. devido à ingestão da água do rio Pardo usada para abastecimento público municipal	108
5.3.2	Estimativa de risco de infecção e de doença por <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. para crianças e adultos devido à ingestão acidental da água do rio Pardo usada para recreação de contato primário.....	114
5.4	Limitações do estudo e considerações finais.....	119
6	CONCLUSÕES.....	121
	REFERÊNCIAS.....	124

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e industrial tem influenciado de maneira significativa os padrões de qualidade das águas superficiais. O lançamento de esgotos domésticos *in natura*, efluentes das estações de tratamento de esgoto e o escoamento superficial, são relatados como importantes causas de poluição das águas de rios e reservatórios (HADI et al., 2016, CETESB, 2017). Sabe-se que a alteração da qualidade das águas superficiais restringe seus múltiplos usos e contribui para o aumento de doenças de veiculação hídrica, em decorrência da exposição oral a bioagentes potencialmente patogênicos (GEMMELL; SCHIMIDT, 2013).

Diversos bioagentes podem ser encontrados em águas contaminadas, dentre os quais merecem destaque cepas patogênicas de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Evidências científicas mostram que esses patógenos são responsáveis por diversos surtos de veiculação hídrica, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento (CVE, 2017b; DENNO et al., 2009; EFSTRATIOU; ONGERTH, KARANIS, 2017; WHO, 2016; WIDERSTRÖM et al., 2014).

Uma das maiores preocupações no contexto da saúde pública e ambiental se deve a disseminação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em ambientes aquáticos, visto que, apresentam resistência aos processos de tratamento de esgoto e à desinfecção por cloro, realizada por Estações de Tratamento de Água (HADI et al., 2016; TONANI et al., 2013; WHO, 2016). Além disso, possuem baixa dose de infecção em hospedeiros humanos e podem provocar severas doenças gastrointestinais, especialmente em crianças em idade pré-escolar e pessoas que vivem com HIV/AIDS (ADAM et al., 2016; EFSTRATIOU; ONGERTH, KARANIS, 2017; NETO et al., 2008; OLIVEIRA-SILVA et al., 2007; RAYAN et al., 2014).

A presença de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. já foi relatada em fontes de águas superficiais destinadas ao abastecimento público e recreacional bem como em águas tratadas de diversos países do mundo (FREGONESI et al., 2012).

No Brasil, as águas superficiais são fontes para abastecimento público na maioria dos municípios brasileiros (61%) (ANA, 2010), sendo também utilizadas para outras finalidades, tais como: recreação de contato primário, geração de energia elétrica, irrigação, indústria e pesca (BRASIL, 2005). Neste contexto, o rio Pardo é um importante recurso hídrico da região nordeste do estado de São Paulo, amplamente utilizado pela população para diversas atividades, dentre as quais merecem destaque o abastecimento público e a recreação de contato primário (MACHADO et al., 2017). Ademais, existem esforços para ampliação de estudos da qualidade da água do rio Pardo devido a eminente necessidade de utilização dessa

fonte de água para abastecimento público na cidade de Ribeirão Preto e região, atualmente abastecida pelo Aquífero Guarani, que está sofrendo um rebaixamento do nível de água (DANTAS et al., 2009; ANA, 2017).

Considerando a relevância do rio Pardo para a população, o presente estudo pretende realizar o monitoramento de bioagentes na água do rio Pardo com enfoque na Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM). Esta ferramenta pode ser utilizada para estimar os possíveis efeitos adversos à saúde devido à presença de bioagentes patogênicos em águas de abastecimento público e de recreação de contato primário.

A aplicação de metodologias de avaliação de risco ainda são consideradas recentes no cenário brasileiro, representando uma lacuna nos estudos de monitoramento de patógenos em Bacias Hidrográficas. Este é o primeiro estudo realizado em rios da região com a utilização da abordagem da AQRM e os resultados poderão trazer importantes informações para as autoridades gestoras da Bacia Hidrográfica do rio Pardo, no contexto das ações dos Comitês de Bacias Hidrográficas.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar e quantificar bioagentes presentes na água do rio Pardo, Brasil, e estimar o risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para a população devido ao uso do rio como fonte de abastecimento público e recreação de contato primário, por meio da abordagem da Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM).

Objetivos específicos

- Identificar e quantificar *Escherichia coli*, *Salmonella* Não Tifóide, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas superficiais do rio Pardo;
- Estimar o risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para crianças e adultos devido à ingestão da água do rio Pardo usada para abastecimento público municipal;
- Estimar o risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para crianças e adultos devido à ingestão acidental da água do rio Pardo usada para recreação de contato primário.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Saneamento ambiental e sua relação com a qualidade de águas superficiais

No ano de 2015, as Nações Unidas definiram os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), baseados nos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio, como parte da Agenda 30, contando com 17 objetivos para transformar o mundo. O objetivo de número seis é “assegurar a disponibilidade e gestão sustentável da água e saneamento para todos”, com melhorias significantes na distribuição e na qualidade da água de forma igualitária para a população mundial, bem como a garantia do saneamento e higiene para todos, até o ano de 2030 (ONU BRASIL, 2017). Com este enfoque, a Organização Mundial da Saúde inclui adequadas condições de saneamento e disponibilidade de água segura como fatores ambientais chaves para a qualidade da vida humana (WHO, 2017a).

Estima-se que em todo o mundo, 2,1 bilhões de pessoas, não têm acesso à água segura e prontamente disponível, e 2,3 bilhões ainda não possuem serviços básicos de saneamento (WHO, 2017a). Saneamento é definido como o conjunto dos serviços, infraestrutura e instalações operacionais de abastecimento de água, esgotamento sanitário, limpeza urbana e manejo de resíduos sólidos, e drenagem e manejo das águas pluviais (BRASIL, 2007).

Neste contexto, no Brasil, 50,3% dos esgotos gerados são coletados, e apenas 42,7% do total de esgotos gerados recebe algum tipo de tratamento (o que representa 74% dos esgotos coletados) (BRASIL, 2017). No Estado de São Paulo, 87% dos esgotos gerados são coletados e 62% dos esgotos coletados passam por algum tipo de tratamento (CETESB, 2017). A Figura 1 apresenta o mapa do estado de São Paulo com a porcentagem de tratamento de esgoto doméstico nos 645 municípios.

Figura 1- Porcentagem de tratamento de esgoto doméstico por município do estado de São Paulo, no ano de 2016.

Fonte: CETESB (2017).

O governo do estado de São Paulo está trabalhando para a universalização do saneamento nos municípios, considerando que o aumento da porcentagem da população atendida pelos serviços de coleta e tratamento de esgotos é fundamental para a melhoria da qualidade das águas superficiais.

O despejo de esgotos domésticos *in natura* ou parcialmente tratados nos corpos hídricos, o lançamento de cargas remanescente das Estações de Tratamento de Esgoto e o escoamento superficial representam as principais causas de poluição das águas superficiais (CETESB, 2017; HADI, et al., 2016).

Com esta preocupação, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), utiliza desde 1975, o Índice de Qualidade das Águas – IQA, que fornece um diagnóstico geral dos recursos hídricos no Estado de São Paulo, em função da ocupação humana e das atividades praticadas na Bacia Hidrográfica. Trata-se de um indicador bastante sensível à contaminação das águas por esgotos domésticos e possui como principal finalidade avaliar a diluição dos efluentes domésticos nos corpos hídricos (CETESB, 2017).

O IQA é composto por nove parâmetros físico-químicos e biológicos, sendo eles:

temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, nitrogênio total, fósforo total, sólidos totais, turbidez e coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli*. Seus valores variam de 0 a 100, categorizados em cinco faixas de qualidade (ótima, boa, regular, ruim e péssima), de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1- Categorias e faixas de classificação dos Índices de Qualidade da Água.

Categoria		Índice de Qualidade	
Ótima	100	$\geq$ IQA >	79
Boa	79	$\geq$ IQA >	51
Regular	51	$\geq$ IQA >	36
Ruim	36	$\geq$ IQA >	19
Péssima	19	$\geq$ IQA	-

Fonte: CETESB (2017).

No estado de São Paulo, são monitorados bimestralmente os IQA de 449 pontos de amostragem da rede básica, distribuídos entre as 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos do estado. Em 2016, as categorias Ótima, Boa e Regular contabilizaram 84% dos pontos monitorados, sendo que o percentual de pontos na categoria Boa do IQA avaliado em tempo seco foi 6 % superior àquele observado em tempo chuvoso. As alterações de qualidade da água entre a época seca e a chuvosa geralmente refletem a influência das cargas difusas nos corpos hídricos superficiais em intervalos intermitentes, relacionados à ocorrência de eventos chuvosos (CETESB, 2017). *Escherichia coli* esteve entre os principais parâmetros que influenciaram na desconformidade dos pontos, apresentando densidades elevadas (CETESB, 2017).

Sabe-se que a alteração da qualidade das águas superficiais restringe seus múltiplos usos e contribui para o aumento da ocorrência de doenças de veiculação hídrica, em decorrência da exposição à bioagentes potencialmente patogênicos (GEMMELL; SCHIMIDT, 2013).

3.2 Doenças de veiculação hídrica e bioagentes de significância sanitária

As doenças de veiculação hídrica são causadas, principalmente, por bioagentes patogênicos de origem entérica, animal ou humana, transmitidos pela rota fecal-oral, ou seja, são eliminados nas fezes de indivíduos infectados e ingeridos na água ou em alimentos irrigados com água contaminada (GRABOW, 1996; HARAMOTO; YAMADA; NISHIDA, 2011).

De maneira geral, em indivíduos imunocompetentes, as doenças de veiculação hídrica, podem variar de assintomáticas a distúrbios gastrointestinais de gravidade variada (CDC, 2017a; CDC, 2017b; WHO, 2016). Em contrapartida, em grupos populacionais mais suscetíveis, como idosos, crianças, gestantes e imunodeprimidos, podem evoluir para um quadro de morbidade grave associada à diarreia crônica, distúrbios eletrolíticos, desidratação, desnutrição e morte (CDC, 2017a; CDC, 2017b; IGNOTO, 2010; POPULIN et al., 2009).

Diversos bioagentes patogênicos podem estar presentes na água contaminada com fezes, dentre os quais se destacam bactérias (*Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Legionella*, *Shigella*), protozoários (*Cryptosporidium*, *Giardia*) e vírus (Norovirus, Rotavirus, Adenovirus, Vírus da hepatite A) (SOTO et al., 2007; RAMADAN; GIJS, 2012; SOLLER et al., 2010; SOLLER et al., 2011; CDC, 2017a; WHO, 2016).

De acordo com o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), entre os anos de 2015 e 2016 foram registradas 1.640.558 internações no Brasil por doenças gastrointestinais de origem infecciosa e parasitária, sendo que a Organização Mundial da Saúde (OMS) atribui 88% das doenças diarreicas ao saneamento básico inadequado e à falta de higiene (BRASIL, 2017).

Estima-se que aproximadamente 842 mil pessoas morrem anualmente em nível mundial por problemas gastrointestinais relacionados com abastecimento de água, esgotamento sanitário e práticas inadequadas de lavagem das mãos, sendo que 361 mil são crianças menores de cinco anos (WHO, 2017a). Além disso, os surtos de doenças de veiculação hídrica continuam a ocorrer tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, levando a encargos econômicos significativos para indivíduos e comunidades (WHO, 2016). Diante desse cenário, a associação da água como um importante fator na veiculação de diversas doenças ao homem é estudada por vários autores em diferentes regiões do mundo.

No Brasil, existem lacunas nos sistemas de vigilância em saúde. Nos relatórios *on line* disponíveis, constam que na maioria dos surtos de veiculação hídrica e alimentar, os agentes etiológicos não são identificados (CVE, 2017b). Dessa maneira, os bioagentes patogênicos envolvidos em surtos, sejam eles bactérias, vírus ou protozoários, estão subnotificados no país. Ainda, para minimizar as incertezas destes dados, seria necessário o desenvolvimento de ensaios padronizados, confiáveis e acessíveis a todos os laboratórios de referência, para a detecção de patógenos em amostras clínicas e ambientais.

A principal via de exposição do homem à bioagentes presentes na água é a oral, sendo que a ingestão pode se dar acidentalmente, por recreação de contato primário (natação,

mergulho, esqui-aquático), ou por meio da ingestão por consumo (abastecimento público). A contaminação da água destinada ao abastecimento público pode ocorrer tanto na água de origem (água bruta) como no sistema de distribuição depois que o tratamento da água já ocorreu, devido à conexões cruzadas, quebras de tubos e intrusão de águas residuais na rede (MOREIRA; BONDELIND, 2017).

Uma das maiores preocupações no contexto da saúde pública e ambiental é a resistência de alguns bioagentes patogênicos, como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., à processos convencionais de tratamento de água, que envolve as etapas de coagulação, floculação, decantação e filtração, seguida de desinfecção por cloro. O cloro é o desinfetante mais utilizado em processos de tratamento convencional da água (BETANCOURT; ROSE, 2004; ROSE; HUFFMAN; GENNACCARO, 2002).

Ambos os protozoários podem permanecer viáveis por vários meses no ambiente aquático e apresentam baixa dose de infecção em hospedeiros humanos. Em adição, estudos têm demonstrado que os processos de Tratamento de Esgoto por Lodos Ativados não são totalmente eficientes na remoção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., facilitando sua disseminação em ambientes aquáticos (SANTOS, 2007; TONANI et al., 2013; NASSER et al., 2012).

Evidências científicas mostraram a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água bruta e tratada destinada ao abastecimento público em diversos países do mundo, inferindo que os processos de tratamento aplicados foram ineficientes na remoção e/ ou inativação desses parasitas (FREGONESI et al., 2012).

Neste sentido, algumas tecnologias para que haja remoção e/ou inativação de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. no processo de tratamento da água estão sendo estudadas. Dentre essas tecnologias destacam-se as técnicas de filtração com eficiência aumentada, a fim de assegurar uma adequada retenção na passagem dos referidos protozoários, que possuem tamanho pequeno (PEREIRA et al., 2009). Além disso, a desinfecção da água por luz ultravioleta ou ozônio, em substituição ao cloro, é vista por diversos pesquisadores como uma alternativa eficaz para inativar protozoários (BETANCOURT; ROSE, 2004; PEREIRA et al., 2008; WHO, 2016).

A seguir, são apresentados *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Esses bioagentes de veiculação hídrica foram escolhidos para o presente estudo em consequência da sua relevância sanitária.

3.2.1 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* recebeu o nome do pediatra e bacteriologista alemão, Theodor Escherich que pesquisou o agente etiológico em amostras de fezes de crianças no ano de 1885, o qual ele chamou de *Bacterium coli commune*. Em 1919, foi reclassificada no gênero *Escherichia* em homenagem ao seu descobridor original, passando a ser denominada *Escherichia coli* (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016).

Escherichia coli pertencem ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae, gênero *Escherichia* e espécie *Escherichia coli* (KONYA et al., 2014). São bactérias gram-negativas em forma de bastonetes, anaeróbias facultativas, com crescimento característico a 44,5°C e capacidade de fermentar a lactose com produção de ácido, gás e aldeído (LEVINSON, 2010).

A maioria das cepas de *E. coli* é inofensiva e faz parte da flora intestinal de seres humanos e animais de sangue quente, onde está presente em densidades elevadas, sem causar nenhum efeito prejudicial. Em outras partes do corpo, entretanto, pode causar graves doenças, como infecções do trato urinário, doenças respiratórias, pneumonia, dentre outras (CDC, 2017c; CETESB, 2009).

Ademais, existem algumas linhagens, que estão associadas com diarreia e assim são referidas como cepas patogênicas, sendo descritas e identificadas com base em diferentes características sorológicas e de virulência (CDC, 2017c). São elas, a *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), a *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e a *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (CDC, 2017c). No grupo da *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), existem vários sorotipos associados à infecções humanas, sendo o O157: H7, o mais estudado, e o responsável por casos mais graves (GOMES et al., 2016). Atualmente, existem dados limitados de vigilância em saúde pública sobre a ocorrência de sorotipos patogênicos os quais são determinados por técnicas de sorotipagem e biologia molecular (HEALTH CANADÁ, 2012).

A transmissão ocorre pelo contato direto entre seres humanos, pelo contato de humanos com outros animais, bem como por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados (CDC, 2017c).

A dose infecciosa para humanos varia e depende da cepa (CDC, 2017c; CETESB, 2009). Estudos revelam, por exemplo, que para causar infecções em hospedeiros humanos, são necessários cerca de 10 organismos para cepas de EIEC e EHEC (O157: H7), e de 100 milhões a 10 bilhões de organismos para cepas de ETEC (CVE, 2017a).

A infecção do trato gastrointestinal se dá primeiramente pela adesão da bactéria às

células do jejuno e íleo por meio dos *pili* que se projetam a partir da superfície do micro-organismo. Dessa forma, cada cepa de bactéria vai realizar uma ação diferente na mucosa do intestino, podendo elas, sintetizar toxinas bem como invadir as células e lesionar a mucosa (LEVINSON, 2010). O tratamento para infecções com *E. coli* se dá por hidratação, sendo que o uso de antibióticos não é recomendado, uma vez que, pode agravar o quadro (CDC, 2017c).

O sorotipo O157: H7 (EHEC), em especial, é capaz de produzir toxinas tipo *Shiga*, semelhantes às produzidas por *Shigella dysenteriae*. A infecção causa colite hemorrágica, marcada por diarreia sanguinolenta, cólicas, dor abdominal e falta geral de febre. Estima-se que 2-8% dos casos progridem para a Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU) (GOMES et al., 2016; HEALTH CANADÁ, 2012). Esta síndrome consiste em uma insuficiência renal, anemia hemolítica e trombocitopenia, que ocorre quando a toxina produzida pela bactéria atinge a corrente sanguínea (LEVINSON, 2010; GUIRRO et al., 2014). A *E. coli* O157:H7, passou a ser reconhecida mundialmente na década de 80, sendo que sua designação ocorreu em 1983, após um surto alimentar ocorrido no EUA (NATARO; KAPER, 1998).

No Brasil, a primeira identificação do sorotipo O157: H7 ocorreu entre uma coleção laboratorial de 2.573 cepas de *E. coli* que foram analisadas retrospectivamente e isoladas de pacientes com diarreia no estado de São Paulo, de 1976 a 1999, no Laboratório Central do Instituto Adolfo Lutz. A cepa de *Escherichia coli* O157: H7 foi isolada em 1990 de um paciente de 18 anos com HIV/AIDS (IRINO et al., 2002).

Desde 1971, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) e a USEPA (*United States Environmental Protection Agency* - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) mantêm um sistema de vigilância colaborativa para coletar e relatar periodicamente dados relacionados a ocorrências e causas de surtos de doenças de veiculação hídrica nos EUA, relacionados à água para consumo. No ano de 1975 foi relatado o primeiro surto de *E. coli* (enterotoxigênica) nos EUA, com a ocorrência de 1000 casos de doença gastrointestinal devido ao consumo de água (CDC, 1975).

Em 1978 nos EUA, iniciou-se a vigilância relativa à surtos relacionados à água de uso recreacional (CDC, 1978). Entretanto, somente em 1994, foi documentado o primeiro surto de *E. coli* (sorotipo O157:H7), com 166 casos de gastroenterite veiculada por água de um lago em Nova York usada para recreação (CDC, 1993-1994).

No Brasil, dados mais recentes mostraram que no ano de 2014, foram confirmados 686 casos de diarreia em adultos e crianças de diversos municípios do Estado de São Paulo, devido à contaminação de água destinada ao abastecimento público por coliformes e/ou coliformes fecais e/ou *E. coli* e/ou coliformes totais (agente etiológico encontrado conforme

critério de análise estabelecido pelo município), sem especificação de sorotipos (CVE, 2017b).

3.2.2 *Salmonella* spp.

Salmonella pertence ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae e gênero *Salmonella* (USEPA, 2006a; SOUZA, 2007; CVE, 2011). São bactérias gram-negativas, em forma de bacilos, móveis, anaeróbias facultativas, não fermentam a lactose e geralmente produzem H₂S (LEVINSON, 2010).

A designação do nome *Salmonella* é derivada de *Salmonella choleraesuis*, adotada em 1900 por Lignieres, em homenagem a Daniel Salmon, que isolou o micro-organismo pela primeira vez do intestino de suínos e nomeou-a inicialmente como *Bacillus choleraesuis*. Desde então, a taxonomia e nomenclatura da *Salmonella* vem sofrendo diversas mudanças (CVE, 2011; BRASIL, 2011a).

O gênero *Salmonella* possui duas espécies distintas, sendo elas, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* está subdividida em seis subespécies que receberam as denominações e abreviações numéricas: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Já *S. bongori* não possui subespécies, e, por simplicidade e conveniência, são algumas vezes referidas como "subespécie V" (BRENNER et al., 2000; CDC, 2013).

Em cada subespécie são reconhecidos diferentes números de sorotipos de acordo com as estruturas na superfície da bactéria, tendo por base a caracterização de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H), resultando na designação de mais de 2.500 sorotipos (CVE, 2011). A distribuição do número de sorotipos de acordo com as espécies e subespécies de *Salmonella* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Distribuição do número de sorotipos de acordo com as espécies e subespécies de *Salmonella*.

Gênero	Espécie	Subespécies	Sorotipos
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	1531
		<i>salamae</i> (II)	505
		<i>arizonae</i> (IIIa)	99
		<i>diarizonae</i> (IIIb)	336
		<i>houtenae</i> (IV)	73
		<i>indica</i> (VI)	13
	<i>bongori</i>	subespécie V	22

Fonte: Adaptado de Grimont e Weill (2007).

Com base nas enfermidades causadas em humanos, entretanto, *Salmonella* spp. é tipicamente classificada em dois grupos: *Salmonella* Tifóide e *Salmonella* Não Tifóide, descritos a seguir (CETESB, 2009; SILVA, 2015):

3.2.2.1 *Salmonella* Tifóide

Salmonella Tifóide são transmitidas pela rota fecal-oral, por meio de água e alimentos contaminados por fezes. São representadas por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi (*Salmonella* Typhi), causadora da febre tifóide; e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Paratyphi A, B e C (*Salmonella* Paratyphi), causadores da febre paratifóide. Esses sorotipos são específicos de seres humanos, não possuindo nenhum reservatório animal (CDC, 2017d; SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2011).

Ambas as doenças podem ser nomeadas como febre entérica, uma vez que, possuem características clínicas semelhantes, sendo que na febre paratifóide os sintomas geralmente são mais brandos. Os sintomas incluem febre alta (39 °C a 40 °C), náusea, vômito, dor abdominal, cefaleia, mal estar e anorexia, podendo ser acompanhada de erupções cutâneas (CDC, 2017d). As graves complicações da febre tifóide geralmente ocorrem após 2-3 semanas de doença e podem incluir hemorragia ou perfuração intestinal com risco de morte. O diagnóstico é realizado por meio de exames de fezes, e o tratamento é por meio de antibióticos específicos (CDC, 2017d).

Estima-se que 26 milhões de casos de febre tifóide e 5 milhões de casos de febre paratifóide ocorrem a nível mundial a cada ano, causando 215 mil mortes (CDC, 2017d). Cabe salientar que os casos de *Salmonella* Tifóide são mais prevalentes no Subcontinente Indiano, na América do Sul e Central, África e Ásia, sendo que foram praticamente eliminadas em países que alcançaram altos índices de saneamento ambiental (CVE, 2017a). Nos Estados Unidos, a estimativa de febre tifoide é de 5.700 casos por ano, onde 75% são adquiridos em viagens internacionais (CDC, 2017d).

No Brasil, os casos de *Salmonella* Tifóide persistem de forma endêmica em algumas regiões, refletindo as condições de vida desses lugares, sendo que os estados Norte e Nordeste representam cerca de 90% de todos os casos registrados no Brasil. No estado de São Paulo, a incidência de doença causada por *Salmonella* Tifóide diminuiu a partir da segunda metade da década de 70, quando atingia níveis em torno de 3 a 4 casos/100.000 habitantes. A partir de 2010, este índice tem se mantido abaixo de 0,1 casos/100.000 habitantes (CVE, 2017a).

3.2.2.2 *Salmonella* Não Tifóide

Salmonella Não Tifóide são transmitidas pela ingestão de água e alimentos de origem animal (ovos, aves, carnes e produtos lácteos) contaminados com fezes, além da transmissão direta entre pessoas, e contatos com animais e seus ambientes (CDC, 2017d; CRUMP et al., 2015). Dentre os animais, *Salmonella* Não Tifóide podem ser encontradas em fezes de répteis, aves e mamíferos (suínos, ruminantes, roedores, cachorros e gatos) (CVE, 2011).

Compreende mais de 2500 sorotipos que infectam humanos, animais domésticos e selvagens, além de estarem presentes em alimentos e em diversas matrizes ambientais (CETESB, 2009). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) são os sorotipos mais comumente encontrados no mundo (CDC, 2017d). Neste sentido, *Salmonella* Enteritidis é o sorotipo mais frequente isolado de casos de infecções humanas no Brasil, seguido de *Salmonella* Typhimurium (BRASIL, 2011a; HENDRIKSEN et al., 2011).

Durante o período de 1996 a 2003, o Instituto Adolfo Lutz recebeu um total de 3554 cepas de *Salmonella* isoladas de origem humana provenientes de diferentes locais geográficos do Estado de São Paulo. *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo mais frequente (67,4%), seguido por *S. Typhimurium* (5,2%) (FERNANDES et al., 2006).

Miranda et al. (2016) analisaram 55 isolados de *Salmonella* spp. de pacientes de quatro hospitais da cidade de Salvador, na Bahia. Entre os isolados obtidos a partir de amostras clínicas, este estudo identificou 18 sorotipos diferentes, sendo que os mais prevalentes foram *S. Enteritidis* (29,1%), *S. Typhimurium* (16,4%), *S. Infantis* (10,9%) e *S. Schwarzengrund* (10,9%).

Estudo dos EUA sobre crianças menores de cinco anos com doença entérica bacteriana confirmada em laboratório, relatou que *Salmonella* Não Tifóide foi o patógeno entérico mais comumente isolado (42%), seguido de *Campylobacter* (28%), *Shigella* (21%), *Yersinia* (5%) e *Escherichia coli* O157: H7 (3%) (SCALLAN et al., 2013).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), a salmonelose, causada por *Salmonella* Não Tifóide, é considerada a zoonose mais difundida do mundo. Globalmente, é estimado mais de 90 milhões de casos de gastroenterite por ano, resultando em mais de 155 mil mortes (MAJOWICZ, et al., 2010). Nos Estados Unidos, a estimativa de morbidade é de 1,2 milhões de casos por ano com 23 mil hospitalizações e 450 mortes (CDC, 2013). Em 2015, um total de 94.625 casos confirmados de salmonelose foram notificados pelos 28

Estados-Membros da União Européia, resultando em uma taxa de notificação de 21,2 casos por 100 mil habitantes com 126 casos fatais (ECDC, 2016).

A dose infectante varia de 10^5 a 10^8 células, porém, em indivíduos com o sistema imunológico suprimido, têm sido observadas doses $\leq 10^3$ para alguns sorotipos (BRASIL, 2011). Os bioagentes, por meio da via oral, invadem a mucosa intestinal, com disseminação para a submucosa, resultando em enterocolite aguda (LEVINSON, 2010).

Uma pessoa infectada com *Salmonella* Não Tifóide pode apresentar febre, dores abdominais e diarreia. A doença tem duração de 4 a 7 dias, e muitos doentes se recuperam sem a necessidade de medicamentos. Entretanto, quando a diarreia é severa, é necessária a hospitalização e uso de antibióticos específicos, além de hidratação e outros cuidados. Em pessoas com o sistema imunológico comprometido, crianças, gestantes e idosos, o quadro pode se agravar, com a infecção passando para corrente sanguínea ou para outros órgãos do corpo, o que pode levar à óbito (CVE, 2011). O diagnóstico de salmonelose é realizado por meio da cultura de fezes do paciente.

De acordo com a literatura, uma prevalência crescente de resistência antimicrobiana tem sido observada em sorotipos de *Salmonella* Não Tifóides nas últimas décadas (CRUMP et al., 2015). Estudos realizados pelo CDC (2013), cerca de 5% das *Salmonella* Não Tifóides testadas apresentaram resistência a cinco ou mais tipos de antibióticos (CDC, 2013), entre eles ceftriaxona e ciprofloxacina. Ainda neste contexto, alguns isolados de *Salmonella* Typhimurium mostraram resistência a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (CRUMP et al., 2015; KARIUKI et al., 2015). Neste âmbito, a emergência e re-emergência de alguns sorotipos de *Salmonella* representam um desafio para saúde pública.

No Estado de São Paulo, estudos indicaram um aumento de *Salmonella* Não Tifóide (*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*) em amostras ambientais (KRZYŻANOWSKI et al., 2014; SILVA 2015). Silva (2015) quantificou e caracterizou *Salmonella* Não Tifóide em águas superficiais e esgotos brutos da Região Metropolitana de São Paulo, Brasil. As águas superficiais apresentaram concentrações que variaram de $<0,06473$ NMP/100 mL a 0,67 NMP/100 mL, em 4% das amostras. Nos esgotos brutos as concentrações foram de $<0,06473$ NMP/100 mL a 54,22 NMP/100 mL, em 54% das amostras. Foram isoladas sete cepas em amostras de água superficial, identificadas como *Salmonella* sp, e 499 em esgotos brutos, sendo que os sorotipos mais prevalentes foram *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

No primeiro relatório emitido pelo CDC, de vigilância de ocorrências e causas de surtos de doenças de veiculação hídrica relacionados à água para consumo nos EUA, no ano de 1971 foi registrado um surto de salmonelose em Washington (CDC, 1771-1772). No ano

de 1978, iniciou-se a vigilância relativa aos surtos relacionados à água de uso recreacional (CDC, 1978). O primeiro surto notificado pelo CDC (1995-1996), causado por *Salmonella* Não Tifóide, ocorreu em 1995 em águas de piscina, no Estado de Idaho, EUA.

Denno et al. (2009) estudaram principais fatores de risco para as infecções entéricas humanas mais comuns causadas por bactérias, em pacientes do Estado de Washington (USA), no período de 2005-2007. Duzentos e noventa e seis pacientes foram acompanhados, sendo que a recreação aquática foi o fator mais importante associado à infecção por *Salmonella*, devido a ingestão acidental da água.

Salmonella Não Tifóide podem permanecer viáveis por mais de 28 meses nas fezes de aves, 30 meses no estrume bovino, 280 dias no solo cultivado e 120 dias na pastagem, sendo ainda encontrada em efluentes de esgoto, como resultado da contaminação fecal (BRASIL, 2011a). Ademais, estudos relatam a resistência de *Salmonella* spp. aos processos de tratamento de esgoto com radiação UV e seu reaparecimento em efluentes depois de oito dias após ozonização (ALONSO, SANTOS; RIESCO, 2004).

3.2.3 *Cryptosporidium* spp.

Taxonomicamente, *Cryptosporidium* pertence ao filo Apicomplexa, classe Gregarinomorpha, subclasse Cryptogregaria, família Criptosporidiidae e gênero *Cryptosporidium* (RYAN et al., 2016). O *Cryptosporidium* spp. Até recentemente, pensava-se que *Cryptosporidium* era um parasita intracelular obrigatório que se replicava dentro de um hospedeiro susceptível e que os oocistos poderiam sobreviver no meio ambiente, sem se multiplicar. À luz de extensos dados moleculares, genômicos e bioquímicos, estudos têm demonstrado a capacidade do *Cryptosporidium* em completar seu ciclo de vida na ausência de hospedeiro bem como de multiplicação e desenvolvimento epicelular e extracelular (RYAN, et al., 2016).

O gênero *Cryptosporidium* spp. foi descrito inicialmente em 1907 pelo parasitologista Ernest Edward Tyzzer. Entretanto, só em 1976 foi reconhecido como um importante patógeno humano (WHITE, 2010). A doença causada por *Cryptosporidium* spp. ganhou importância no início dos anos 80, com o advento do HIV/AIDS bem como com os surtos de veiculação hídrica, sendo classificada como uma protozoonose emergente (KÖRKÖCA et al., 2013; PEREIRA et al., 2010).

Cryptosporidium hominis e *C. parvum* são consideradas as espécies de maior prevalência em hospedeiros humanos, sendo que *C. hominis* é mais comum em pessoas que

vivem nas áreas urbanas, enquanto que *C. parvum* é identificado mais frequentemente em pessoas de áreas rurais, estando associada ao gado (JANSSEN; SNOWDEN, 2017).

A Tabela 3 apresenta a distribuição das espécies conhecidas de *Cryptosporidium* que acomete hospedeiros vertebrados. As espécies identificadas com asterisco já foram relatadas em humanos.

Tabela 3- Distribuição das espécies de *Cryptosporidium* que acometem hospedeiros vertebrados.

Hospedeiros	Espécies
Peixes	<i>Cryptosporidium molnari</i>
	<i>Cryptosporidium huwi</i>
Anfíbios	<i>Cryptosporidium fragile</i>
Répteis	<i>Cryptosporidium serpentis</i>
	<i>Cryptosporidium varanii</i>
	<i>Cryptosporidium testudinis</i>
	<i>Cryptosporidium duscimarci</i>
Aves	<i>Cryptosporidium meleagridis</i> *
	<i>Cryptosporidium baileyi</i>
	<i>Cryptosporidium galli</i>
	<i>Cryptosporidium avium</i>
Mamíferos	<i>Cryptosporidium hominis</i> *
	<i>Cryptosporidium parvum</i> *
	<i>Cryptosporidium muris</i> *
	<i>Cryptosporidium wrairi</i>
	<i>Cryptosporidium felis</i> *
	<i>Cryptosporidium andersoni</i> *
	<i>Cryptosporidium canis</i> *
	<i>Cryptosporidium suis</i> *
	<i>Cryptosporidium bovis</i> *
	<i>Cryptosporidium fayeri</i> *
	<i>Cryptosporidium macropodum</i>
	<i>Cryptosporidium ryanae</i>
	<i>Cryptosporidium xiaoi</i> *
	<i>Cryptosporidium ubiquitum</i> *
	<i>Cryptosporidium cuniculus</i> *
	<i>Cryptosporidium tyzzeri</i> *
	<i>Cryptosporidium viatorum</i> *
	<i>Cryptosporidium scrofarum</i> *
	<i>Cryptosporidium erinacei</i> *
	<i>Cryptosporidium proliferans</i>
	<i>Cryptosporidium rubeyi</i>
	<i>Cryptosporidium homai</i>

*Espécies que já foram relatadas em humanos. Fonte: Adaptado de CDC (2017a); Holubová et al. (2016); Rayan, Fayer e Xiao (2014); Ryan e Hijjawi (2015); Valenzuela et al. (2014); Xiao (2010); Ryan; Hijjawi; Xiao (2017); Zahedi et al., 2017.

A infecção por *Cryptosporidium* spp. acontece por meio da rota fecal oral, pela ingestão dos oocistos infectantes presentes em água ou em alimentos contaminados com fezes e por contato direto com animais e/ou pessoas infectadas (CDC, 2017a; KÖRKÖCA et al., 2013). Os oocistos são também as formas de resistência, podendo ser esféricos ou elípticos, com parede lisa e dupla, e medem de 3,1 a 8,2 μm de diâmetro, como representado na Figura 2.

Figura 2- Oocistos de *Cryptosporidium* spp. corados com Acid-Fast, marcados com anticorpos monoclonais fluorescentes e sob microscopia de contraste de fase.

Fonte: CDC (2017a).

Poucos oocistos são necessários para haja infecção. Extrapolação de dados do modelo exponencial de dose-resposta indicou que a ingestão de um único oocisto é capaz de causar infecção em uma pessoa susceptível (WHO, 2009). Outros estudos sugerem que a dose infecciosa seja de 9 a 1.042 oocistos dependendo da cepa de *Cryptosporidium* spp. (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007).

Após a ingestão de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo hospedeiro, ocorre o desencistamento devido a temperatura corporal e a interação com o ácido do estômago e sais biliares. No intestino delgado, os esporozoítos liberados penetram nas microvilosidades intestinais, geralmente no jejuno ou íleo. Os esporozoítos transformam-se em trofozoítos e sofrem divisão múltipla, formando o meronte, onde são gerados merozoítos de tipo I ou II (reprodução assexuada). Os merozoítos de tipo I são capazes de infectar outras células e repetir a reprodução assexuada. Os merozoítos de tipo II geram gametas microgametócistos (masculinos) e macrogametócitos (femininos). Após a fecundação (reprodução sexuada), o zigoto sofre meiose e dá origem ao oocisto esporulado, que é eliminado para o ambiente juntamente com as fezes do hospedeiro (CDC, 2017a; HIJJAWI, 2010).

O ciclo biológico completa-se geralmente entre 12 e 14 horas e pode variar de acordo com o hospedeiro e a espécie de *Cryptosporidium*. O oocisto esporulado é a única forma

exógena e já se torna infectante ao ser eliminado, o que facilita a sua transmissão (CDC, 2017a).

As manifestações clínicas da criptosporidiose variam com a espécie do parasita bem como com a idade e estado imunológico do hospedeiro. Nos indivíduos imunocompetentes a infecção pode ser assintomática ou causar uma diarreia autolimitada com duração de até três semanas (HORNE et al., 2016). Porém, em crianças, idosos e pessoas que vivem com HIV/AIDS, a doença pode ser debilitante, com quadros de diarreia aquosa, ultrapassando quatro semanas. As complicações se devem especialmente à distúrbios eletrolíticos e desidratação, uma vez que, em 24h o indivíduo pode eliminar de 17 a 20 litros de fezes, levando a óbito (NETO et al., 2008; OLIVEIRA-SILVA et al., 2007; POPULIN et al., 2009).

A nitazoxanida é o medicamento aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da criptosporidiose em pessoas imunocompetentes. Porém, em pacientes imunocomprometidos pode não ser eficiente (RYAN, et al., 2014).

A prevalência global de criptosporidiose é amplamente desconhecida, embora a doença tenha sido recentemente identificada como uma das principais causas de diarreia em crianças menores que cinco anos de idade em países de baixa renda. Este desconhecimento deve-se especialmente aos pacientes assintomáticos e ao requerimento de testes de diagnóstico do parasita (KOTLOFF et al., 2013; WIDERSTROM et al., 2014). Contudo, Fletcher et al. (2012) relatam que *Cryptosporidium* spp. representa cerca de 20% dos episódios de diarreia em crianças em países em desenvolvimento e até 9% dos episódios em países desenvolvidos.

Os primeiros surtos de *Cryptosporidium* notificados pelo CDC (1991-1992), em documentos oficiais, ocorreram no ano de 1992, com 526 casos de gastroenterites devido à ingestão acidental de água de recreação. O reconhecimento dos surtos foi devido ao rastreio de amostras de fezes para *Cryptosporidium* por certos laboratórios locais, o que não era prática padrão (CDC, 1991-1992).

O surto de criptosporidiose com maior número de casos ocorreu em Milwaukee, Wisconsin, EUA, em 1993. Cerca de 403.000 indivíduos foram infectados por *Cryptosporidium hominis* por meio da ingestão de água para consumo humano. A deterioração na qualidade da água bruta (Lago Michigan) e diminuição da eficiência dos processos de tratamento da água, especialmente na coagulação e filtração, levaram a um aumento da turbidez da água e à remoção inadequada de oocistos de *C. parvum* (CDC, 1993-1994; CACCIÒ; WIDMER, 2014).

Na Suécia, em 2010, foi verificado um grande surto de *Cryptosporidium hominis* envolvendo 27 mil habitantes de Östersund devido ao consumo de água contaminada, sendo que a principal causa foi a ineficiência da estação municipal de tratamento de água (WIDERSTRÖM et al., 2014).

No ano de 2015, seis Estados-Membros da União Europeia relataram 38 surtos de veiculação hídrica devido à ingestão de água destinada ao abastecimento público, sendo que quatro foram atribuídos ao protozoário *Cryptosporidium* e quatro à *Giardia* (ECDC, 2016).

Efstratiou, Ongerth e Karanis (2017) realizaram um levantamento mundial dos surtos de veiculação hídrica causados por protozoários parasitas entre os anos de 2011 e 2016. Por meio de relatórios online, documentaram 381 surtos, na Nova Zelândia, América do Norte e Europa, sendo que *Cryptosporidium* spp. apareceu como o principal agente etiológico (63%).

No contexto de países latino-americanos, Rosado-García et al. (2016) registraram da literatura 16 surtos de veiculação hídrica atribuídos à protozoários patogênicos, entre os anos de 1979 a 2015. *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram os mais comumente encontrados em água e o Brasil esteve como país que mais publicou estudos da área.

No Brasil, de acordo com os dados emitidos no estado de São Paulo pelo Centro de Vigilância Epidemiológica, no ano de 2014, foram notificados 11 casos de diarreia aguda causada por *Cryptosporidium* spp. em crianças e adultos (funcionários) de uma creche na cidade de Rafard, região de Piracicaba, SP, sendo que a fonte de veiculação parasitária foi a água destinada ao abastecimento público (CVE, 2017b).

3.2.4 *Giardia* spp.

Taxonomicamente, *Giardia* pertence ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Diplomonadida, família Hexamitidae, gênero *Giardia* (MOLINARO, 2012; NETO, 2008).

Giardia foi observado pela primeira vez em 1681 por Antony van Leeuwenhoek, em suas próprias fezes, porém foi Lambl que o descreveu mais detalhadamente em 1859, sendo inicialmente denominado *Cercomonas intestinalis*. Foi renomeado *Giardia lamblia* por Stiles em 1915 em homenagem ao Professor Alfred Giard, de Paris e ao Doutor Lambl, de Praga (CDC, 2017b; NETO, 2008). Apesar de ser possivelmente o primeiro protozoário intestinal humano a ser conhecido, ainda hoje continua sendo um dos parasitas mais comumente relatados em seres humanos de todo o mundo (ROBERTSON et al., 2010).

Muitos autores consideram *Giardia* spp. um parasita re-emergente devido ao constante

aumento dos números de casos de infecção, particularmente, em crianças que frequentam ou vivem em ambientes coletivos bem como pela alta prevalência que tem sido observada em animais de estimação (THOMPSON et al., 2000).

Atualmente, são aceitos pela maioria dos pesquisadores, sete espécies de *Giardia* spp., (Tabela 4).

Tabela 4- Espécies de *Giardia* spp. segundo hospedeiros.

Espécies	Genótipos	Hospedeiros
<i>Giardia agilis</i>		Anfíbios
<i>Giardia ardeae</i>		Aves
<i>Giardia psittaci</i>		
<i>Giardia microti</i>		Ratazanas
<i>Giardia muris</i>		Roedores
<i>Giardia paramelis</i>		Marsupiais
<i>Giardia lamblia</i> *	A*	Humanos, primatas não humanos, ruminantes, porcos, cavalos, cachorro doméstico e selvagem, gatos, furões, roedores, marsupiais
	B*	Humanos, primatas não humanos, cachorros, cavalos, coelhos, gados
	C	Cachorro doméstico e selvagem
	D	Cachorro doméstico e selvagem
	E	Ruminantes, porcos
	F	Gatos
	G	Ratos
	H	Focas

*Espécie e genótipo que já foram relatadas em humanos. Fonte: Adaptado de Feng e Xiao (2011); Ryan e Cacciò (2013).

Giardia lamblia, especificamente os genótipos A e B, é a única espécie encontrada em seres humanos e em outros mamíferos, com potencial de ser transmitida zoonoticamente (FENG et al., 2013; MONIS et al., 2003; RYAN; CACCIÒ, 2013).

No seu ciclo de vida, *Giardia* spp. apresenta duas formas evolutivas: o cisto, que é a forma infectante, e o trofozoíto que é a forma evolutiva responsável pela patogenia. Os cistos são estruturas de resistência, possuem formato oval ou elipsoide, quatro núcleos e medem de 8 a 14 µm de comprimento por 6 a 10 µm de largura, como apresentado na Figura 3 (MOLINARO, 2012).

Figura 3- Cistos de *Giardia* spp. em lâminas preparadas com lugol, coradas com tricromo e sob microscopia de contraste de fase.

Fonte: CDC (2017b).

Os trofozoítas são piriformes, apresentam simetria bilateral e dois núcleos, medindo entre 9 e 20 μm de comprimento por 5 a 10 μm de largura. Possuem um disco adesivo ou ventral em sua metade anterior que facilita a adesão do protozoário às células do epitélio intestinal. Como estrutura de locomoção, apresentam quatro pares de flagelos (dois anteriores, dois laterais, dois ventrais e dois posteriores) (MOLINARO, 2012). A Figura 4 apresenta trofozoítos de *Giardia* spp. obtidos por diferentes técnicas de análise.

Figura 4- Trofozoítos de *Giardia* spp. em lâminas preparadas com lugol, coradas com Giemsa e sob microscopia de contraste de fase.

Fonte: CDC (2017b).

A infecção ocorre pela via fecal-oral e resulta da ingestão de cistos por meio do consumo de água ou alimentos contaminados com fezes bem como por contato direto com pessoas e/ou animais infectados (CDC, 2017b; XIAO et al., 2008).

Para haver a contaminação de um hospedeiro susceptível, a dose média infecciosa é de 25 a 100 cistos, sendo que a ingestão de 10 cistos já foi relatada como causador de infecção (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007; RENDTORFF, 1954).

Após a ingestão do cisto pelo hospedeiro, é iniciado o desencistamento no meio ácido do estômago e completado no duodeno, onde cada cisto maduro libera dois trofozoítos. Os trofozoítos se multiplicam por divisão binária longitudinal e assim colonizam o intestino

delgado permanecendo aderidos à mucosa intestinal pelo disco ventral. O ciclo se completa pelo encistamento do trofozoíto no cólon, e sua eliminação para o meio exterior por meio das fezes (CDC, 2017b; FENG, et al., 2011; NETO, 2008). Os cistos podem ser eliminados em grandes quantidades nas fezes (300 milhões a 14 bilhões por dia), com períodos de interrupção de sete a 10 dias na eliminação (SANTANA et al., 2014).

O cisto é a fase mais comumente encontrada nas fezes não diarreicas, enquanto que os trofozoítos são encontrados em grande quantidade na fase aguda da doença, quando o indivíduo apresenta diarreia aquosa (ARRUDA, 2008; SANTANA et al., 2014).

A doença apresenta um quadro clínico diverso, que varia desde indivíduos assintomáticos até um quadro de diarreia aquosa e autolimitante, ou um quadro de diarreia persistente e crônica, podendo levar à síndrome da má absorção caracterizada pela anorexia, perda de peso, desnutrição, raquitismo, que muitas vezes não responde aos tratamentos específicos (NEVES, 2011; SANTANA et al., 2014). Hass et al. (2014) estimaram que a taxa de morbidade de pessoas infectadas com *Giardia* é de 50%.

As prevalências de giardíase em seres humanos geralmente são de 0,4% a 7,5% em países desenvolvidos e de 8% a 30% em países em desenvolvimento (FENG; XIAO, 2011). De acordo com Fletcher et al. (2012), *Giardia* spp. é responsável por 20-30% dos episódios de diarreia em crianças de países em desenvolvimento e de 2-7% de países desenvolvidos.

No primeiro relatório emitido pelo CDC e USEPA (1771-1772), foram notificados nos EUA, três surtos de giardíase devido a contaminação da água para consumo, sendo dois no Estado do Colorado e um em Utah, totalizando 112 casos de gastroenterite. No ano de 1985 o CDC relatou o primeiro surto atribuído à ingestão acidental de água destinada à recreação, contaminada com cistos de *Giardia* spp, com 24 casos de doença gastrointestinal.

Adam et al. (2016) analisaram os dados sobre todos os surtos de giardíase ocorridos nos Estados Unidos e relatados pelo CDC entre os anos de 1971-2011. No total, foram notificados 242 surtos envolvendo aproximadamente 41 mil pessoas. A maioria dos surtos (74,8%) foram devido à veiculação hídrica de cistos de *Giardia*, sendo que desta porcentagem, 74,6% foram associados à água potável, 18,2% à água recreativa e 7,2% a outras águas.

Evidências científicas mostraram que de 381 surtos de doenças de veiculação hídrica causadas por protozoários, ocorridos em nível mundial entre os anos de 2011 e 2016, *Giardia* apareceu como o segundo agente etiológico principal (37%) (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017).

3.3 Monitoramento de bioagentes em águas superficiais

As águas doces no Brasil são classificadas, segundo a qualidade requerida para os seus usos. No estado de São Paulo, a maioria são classificadas como Classe 2 (CETESB, 2017), e de acordo com a Resolução nº 375/2005 do CONAMA podem ser destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional;
- b) à proteção das comunidades aquáticas;
- c) à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA nº 274, de 2000;
- d) à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e
- e) à aquicultura e à atividade de pesca.

A qualidade microbiológica da água é comumente avaliada usando organismos indicadores para contaminação fecal, uma vez que não é viável detectar todos os agentes patogênicos presentes. O grupo de coliformes termotolerantes, (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) ou somente a espécie *Escherichia coli* são utilizados por mais de um século na avaliação da qualidade microbiológica de amostras ambientais como indicadores de contaminação fecal (CETESB, 2009).

De acordo com a CETESB (1993), vários autores sugerem o uso de *Salmonella* como indicador de contaminação microbiológica de origem fecal em águas destinadas ao abastecimento público e recreacional, uma vez que, em determinadas circunstâncias, essas bactérias podem sobreviver durante um maior período de tempo do que os coliformes. Contudo, o principal argumento contra a utilização de *Salmonella* para avaliar a qualidade das águas é que este bioagente é um patógeno, e, portanto, sua detecção seria só para confirmar o agente etiológico de uma epidemia ou surto. Sua ausência em águas, também não significa que esta esteja segura para consumo, e sua concentração é normalmente baixa em relação aos coliformes.

No Brasil, as águas superficiais, devem atender aos parâmetros de coliformes termotolerantes estabelecidos na Resolução nº 357/2005 do CONAMA, sendo que *E. coli* poderá ser determinada em substituição a este, de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

O monitoramento de *E. coli* e/ou coliformes termotolerantes em águas superficiais usadas para abastecimento público ou recreação de contato primário é estabelecida pela legislação de diversos países (BRASIL, 2000; BRASIL, 2005; EP, 2006; USEPA 1986).

Dessa forma, as águas superficiais, Classe 2, destinadas ao abastecimento público, conforme Resolução nº 357/2005 do CONAMA e equivalência da Decisão de Diretoria nº 112/2013/E (CETESB, 2013), serão consideradas impróprias para este uso, caso ultrapassem 600 UFC de *E. coli*/ 100 mL em 20% ou mais, de pelo menos seis amostras, coletadas durante o período de um ano, no mesmo local, com frequência bimestral.

Para as águas superficiais Classe 2, destinadas à recreação de contato primário, serão consideradas impróprias para este uso quando houver densidade de *E. coli* maior que 800 UFC/100 mL, em mais de 20% de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, coletadas no mesmo local (BRASIL, 2005; BRASIL, 2000). A CETESB, porém, estabeleceu valores mais restritivos, sendo consideradas impróprias para este uso, quando houver densidade de *E. coli* maior que 600 UFC/100 mL em mais de 20% de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, do mesmo local (CETESB, 2013).

Neste sentido, Araújo et al., 2015 avaliaram a contribuição de seis rios do município de São Gonçalo (RJ) sobre a qualidade das águas da Baía de Guanabara, todos utilizados para atividades de recreação de contato primário. A análise de coliformes termotolerantes identificou valores acima do que é estabelecido pela Resolução nº 274/2000 do CONAMA. Assim, concluíram que as águas analisadas dos seis rios não devem ser destinadas à balneabilidade, assim como à outros fins, e contribuem negativamente para a qualidade da águas da Baía de Guanabara e saúde de banhistas.

Desde 2009, a Agência Europeia do Ambiente, “*European Environment Agency* (EEA)”, e o seu Centro Temático Europeu sobre Águas Internas, Costeiras e Marinhas prepararam o relatório em cooperação com a Direção Geral do Ambiente da Comissão Europeia. Este relatório fornece um resumo abrangente da qualidade das águas balneárias de 28 Estados Membros da União Europeia. No ano de 2016, 96,3% de todas as águas balneárias analisadas se encontraram dentro dos padrões mínimos de qualidade estabelecidos pela UE para uso recreacional (≤ 900 UFC/100 mL), sendo que 69% dos pontos eram de água salgada e 31% de água doce, como rios e lagos (EEA, 2017).

Cabe ressaltar que diversos autores afirmam que a análise de coliformes termotolerante e/ou *Escherichia coli*, não é suficiente para a proteção da saúde humana em relação às doenças de veiculação hídrica. A ausência de indicadores bacterianos de contaminação fecal em corpos de água superficiais ou águas tratadas não garante que patógenos como protozoários (*Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp.), vírus e helmintos não estejam presentes (CETESB, 2009; GERBA; ROSE, 2003; IGNOTO, 2010; WHO, 2016). De

acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016), surtos de doenças transmitidas pela água ocorreram quando a água atendia as diretrizes para as bactérias indicadoras de contaminação fecal, inferindo a contaminação por outros bioagentes.

Levando isto em consideração, as regulamentações de alguns países exigem o monitoramento de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas brutas e tratadas. Nos EUA, as fontes de água potável dos sistemas que atendem mais de 10.000 pessoas devem ser monitoradas para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Para sistemas que servem menos de 10.000 pessoas, o monitoramento de protozoários é necessário se houver concentrações elevadas de *E. coli* (HADI et al., 2016; KRKOSEK et al., 2016). Em Ontário (Canadá) e no Reino Unido, as análises de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas superficiais destinadas ao abastecimento público se baseiam nos resultados do monitoramento de *E. coli* (KRKOSEK et al., 2016). No Irã, não existe um requisito obrigatório para o monitoramento de protozoários parasitas nas águas de brutas e tratadas. No entanto, os padrões nacionais adotaram coliformes fecais como o critério de qualidade microbiológica e não exigiu a procura por outros bioagentes, em qualquer circunstância (HADI et al., 2016). Na orientação australiana (NHMRC-NRMMC 2011), não existem recomendações para o monitoramento de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. devido à falta de um método de rotina para identificar cepas infecciosas humanas na água potável. Entretanto, para minimizar o risco desses protozoários, é realizado a aplicação da abordagem de barreira múltipla que opera desde a captação até a torneira. Na orientação australiana, a proteção das bacias hidrográficas de resíduos humanos e animais está no topo das prioridades (NHMRC-NRMMC 2011; HADI et al., 2016).

No Brasil, A Portaria do Ministério da Saúde nº 2914 de 12 de dezembro de 2011, “Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade”. Dessa maneira, os sistemas e soluções alternativas coletivas de abastecimento de água que utilizam mananciais superficiais devem realizar o monitoramento de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., no(s) ponto(s) de captação de água, quando for identificada média geométrica anual maior ou igual a 1.000 *Escherichia coli*/100mL (BRASIL, 2011).

3.4 Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico

A avaliação dos riscos desempenha um papel central nas diretrizes de qualidade da água da Organização Mundial da Saúde, que recomendam uma abordagem preventiva

baseada em risco para o gerenciamento da qualidade da água, cobrindo da fonte até a exposição. Diretrizes assim formuladas proporcionam a seus países membros, como o Brasil, elementos para o estabelecimento de padrões nacionais de qualidade de água (WHO, 2016).

Uma das abordagens de avaliação de risco que está em uso, é a Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM), proposta pela primeira vez no início da década de 1990, para o gerenciamento da segurança da água (REGLI et al., 1991; WHO, 2016). Este tipo de avaliação permite estimar o risco de infecção, doença ou morte em decorrência da exposição à bioagentes patogênicos ao longo de um determinado período de tempo. Como vantagem, os resultados de exposição à bioagentes patogênicos podem ser expressos quantitativamente em termos de probabilidade, calculados por meio de uma modelagem matemática (WHO, 2016).

A AQRM tem sido aplicada mundialmente por pesquisadores, organizações e agências regulatórias e seu estudo engloba não somente a estimativa de risco à saúde humana relacionada às águas de consumo, mas também as águas para fins recreacionais, águas residuárias, alimentos, ar e biossólidos (GEMMELL; SCHIMIDT, 2013; IGNOTO, 2010; STALEY, 2012). Esta abordagem é ainda pouco utilizada no Brasil e o tema pouco frequente nas publicações brasileiras.

Para águas destinadas ao consumo humano e recreação de contato primário, a relevância da aplicação da AQRM se deve ao possível estabelecimento de valores-limite e padrões para presença de patógenos em águas, para a formulação e revisão de legislações, bem como fornecer subsídios aos gestores nas tomadas de decisão frente às políticas públicas (IGNOTO, 2010).

Hass, Rose e Gerba (1999) estruturam a AQRM em quatro etapas principais, sendo relevante mencionar no estudo com águas de destinadas ao consumo humano e recreação de contato primário, as seguintes características:

3.4.1 A identificação do perigo

A identificação do perigo consiste na descrição dos efeitos agudos e crônicos à saúde associados ao bioagente de interesse no estudo, incluindo desde a via de exposição até o hospedeiro (RAZZOLINI; NARDOCCI, 2006). É predominantemente um processo qualitativo destinado a identificar os bioagentes de interesse.

Sabe-se que não é possível considerar todos os patógenos entéricos humanos em uma AQRM. Portanto, são escolhidos patógenos de referência que são particularmente relevantes para as vias de exposição e o contexto da avaliação de risco (WHO, 2016). Os patógenos de

referência (*Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica*, *Cryptosporidium* spp. *Giardia lamblia*, *Adenovirus*, *Norovirus* e *Rotavirus*) são adotados como modelo por possuírem características de resistência e persistência no ambiente aquático, bem como pela alta infecciosidade (SOLLER et al., 2010; SOLLER et al., 2011; MC BRIDE; 2013). Assim, se o patógeno for controlado, é assumido que outros patógenos também sejam.

A maioria dos estudos tem usado *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para abordagem da AQRM em águas superficiais destinadas ao abastecimento público, devido especialmente à alta resistência aos processos de desinfecção por cloro em Estações de Tratamento de Água, uma vez que, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7 e *Salmonella enterica*, possuem baixa resistência a esses processos de desinfecção e *Adenovirus*, *Norovirus* e *Rotavirus* resistência moderada (PETTERSON; ASHBOLT, 2016; WHO, 2016).

3.4.2 Avaliação da exposição

A exposição ao bioagente pode ocorrer quando uma única dose de patógenos é ingerida em um determinado momento, sendo que cada exposição é um evento independente e não cumulativo (IGNOTO, 2010; RAZZOLINI; NARDOCCI, 2006). Para avaliação da exposição a bioagentes patogênicos na água de consumo, é necessário determinar as rotas de transmissão, a distribuição e a concentração dos bioagentes de interesse na água, devendo considerar os padrões de consumo da população na região de estudo (taxas de ingestão para crianças e adultos).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) assumiu uma taxa de ingestão de água potável de 2 L/dia para adultos e 1 L/dia para lactentes e crianças menores de 10 anos, sendo que o consumo diário de água pode variar com os níveis de atividade física e as flutuações na temperatura e umidade (USEPA, 2011).

Em estudo realizado por Sato et al. (2013), a taxa de consumo de água para a população brasileira na região sudeste do Brasil foi estimada com base nos dados de Kahn e Stralka (2009) que levaram em conta o consumo de água por peso e idade. Foram consideradas duas faixas etárias: crianças (<5 anos) que representam a população mais sensível, e adultos (> 21 anos) que representam a população em geral. Os dados da taxa de consumo foram ajustados (distribuição lognormal) com média e desvio padrão de 0,44 L/dia (0,92 L/dia) para crianças e 1,5 L/dia (SD 0,8 L/dia) para adultos. Ademais, quando se realiza a pesquisa de protozoários em água bruta, é preciso considerar a eficiência de remoção de

(oo)cistos pelo tratamento convencional da água.

O requisito de redução mínima de protozoários em águas destinadas ao abastecimento público varia de acordo com a legislação de cada país. Para *Cryptosporidium*, uma redução mínima de 3 *log* é requerida pela Health Canada, British Columbia, Yukon, Alberta, Saskatchewan, Nova Escócia e Reino Unido (KRKOSEK; REED; GAGNON, 2016). Já a USEPA, Manitoba, Quebec e Ontário exige em suas regulamentações uma remoção de 2 *log* para o mesmo. Para *Giardia*, é necessário uma redução de 3 *log* em todas essas legislações (KRKOSEK; REED; GAGNON, 2016). No Brasil, estudos de avaliação de risco têm adotado remoção de 2 *log* para *Cryptosporidium* spp. e 3 *log* para *Giardia* spp., considerando o processo convencional do tratamento de água (HASS, 1996; SATO et al., 2013).

Para avaliação da exposição a bioagentes patogênicos em água destinada à recreação de contato primário, é necessário determinar as rotas de transmissão, a distribuição, a concentração dos bioagentes de interesse na água, devendo considerar a duração e frequência da exposição bem como os diferentes volumes de água ingeridos acidentalmente por crianças e adultos.

Nota-se a carência de estudos relacionados ao uso recreacional de água doce no Brasil, sendo que não existem na literatura e nos documentos oficiais, valores para volumes de ingestão de água para crianças e adultos, duração e frequência da exposição.

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003) assume o volume de ingestão acidental devido à práticas recreativas, de 20 a 50 mL por hora de banho. Nos Estados Unidos, Dufour et al. (2006) conduziram um estudo com nadadores em piscinas com o objetivo de determinar o volume de água ingerido durante atividades de natação. Os resultados do estudo indicaram que os não-adultos (≤ 18 anos) ingeriram cerca de duas vezes mais água do que os adultos. A quantidade média de água engolida por não adultos e adultos foi de 49 mL/h e 21 mL/h, respectivamente. Os autores destacaram que o comportamento da ingestão de água de piscina é similar ao de água doce.

Schets et al. (2011) realizaram um estudo na Holanda a fim coletar dados de exposição para nadadores em água doce, água do mar e piscinas, ou seja, volume de água ingerido acidentalmente, frequência e duração dos eventos de natação. Estes resultados foram diferentes para homens (adultos), mulheres (adultos) e crianças (< 15 anos) e variaram entre os tipos de água de banho. As diferenças entre homens e mulheres foram pequenas, mas as crianças nadavam com mais frequência, permaneciam mais tempo na água e engoliam mais água. As piscinas foram visitadas com maior frequência, em média 13 a 24 vezes ao ano, com maior duração de natação (em média 67 e 81 min). Em média, os locais de água doce e de

água do mar foram visitados 6 a 8 vezes ao ano e as visitas duraram 41 a 79 min. Dependendo do tipo de água, homens engoliram em média 27 a 34 ml por evento de natação, mulheres 18 a 23 ml e crianças 31 a 51 ml.

3.4.3 Avaliação da dose-resposta

A relação dose-resposta visa obter uma relação matemática entre a concentração de um determinado agente etiológico ao qual uma pessoa está exposta (dose) e os efeitos resultantes para saúde (infecção, doença ou morte). Geralmente são obtidos por dados de estudos em humanos e animais, e que permitem a construção de modelos matemáticos para prever a resposta de dose (CAMRA, 2017).

Os modelos de β -Poisson e exponencial são os mais comumente utilizados para relacionar a dose ingerida de determinado bioagente à infecção em humanos. O modelo exponencial estima o risco de infecção por protozoários, como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., em humanos, associado a uma única exposição, representado pela ingestão destes por meio da água (probabilidade diária de infecção). Neste modelo, é assumido que todos os organismos estão distribuídos uniformemente e que cada um tem uma probabilidade de sobrevivência idêntica (r) (USEPA, 2012a).

Para água destinada ao consumo humano, aplica-se o modelo exponencial:

$$P_i = 1 - \exp(-r \times D)$$

Onde, P_i é a probabilidade de infecção diária; r é a probabilidade de um bioagente específico iniciar uma infecção; D é a dose (dada pela C - concentração do bioagente pesquisado $\times$ TI - taxa de ingestão de água).

Para água destinada à recreação de contato primário (ingestão acidental), aplica-se o modelo exponencial, levando-se em consideração a duração da exposição (horas):

$$P_i = 1 - \exp(-r \times D \times DE)$$

Onde, P_i é a probabilidade de infecção diária; r é a probabilidade de um bioagente específico iniciar uma infecção; D é a dose (dada pela C - concentração do bioagente pesquisado $\times$ TI - taxa de ingestão de água); DE é a duração da exposição (horas).

3.4.4 Caracterização do risco

A caracterização do risco representa a integração das etapas anteriores- identificação do perigo, avaliação da exposição, avaliação da dose-resposta- para estimar o risco, ou seja, a probabilidade de infecção, doença ou morte.

Depois de aplicado o modelo de dose-resposta e partindo da probabilidade diária de infecção, é possível calcular a probabilidade anual de infecção, segundo a equação:

$$Pa = 1 (1 - Pi)^F$$

Onde, Pa é a probabilidade de uma ou mais infecções durante o ano; Pi é a probabilidade diária de infecção. F é a frequência de exposição (dias/ano).

Os riscos de doença podem ser estimados mediante a incorporação de taxas de doença relacionadas ao bioagente em questão:

$$Pd = Pa \times I$$

Onde, Pd é a probabilidade de doença; I é o percentual de infecção que resulta em doença.

Na etapa de caracterização do risco, é extremamente relevante considerar as incertezas, que é inerente a todos os passos da AQRM. Para tratar as incertezas, é geralmente utilizado a Simulação de Monte Carlo, assumindo-se que todos os parâmetros são aleatórios ou incertos, por meio de um programa computacional (USEPA, 2012a). Assim, ao invés de variar cada um desses parâmetros separadamente, os dados distribuídos são selecionados aleatoriamente e utiliza funções matemáticas a cada tempo repetidas vezes (10.000 ou 100.000 vezes, por exemplo). Os resultados são então obtidos, com grau de confiança de 95% (RAZZOLINI, NARDOCCI, 2006).

3.5 Situação dos Recursos Hídricos no Brasil

A água é um recurso natural fundamental à existência de vida. Estima-se que o volume total de água na Terra seja de 1,4 bilhões de km^3 , sendo que apenas 0,3% de toda água doce do planeta está disponível em fontes superficiais, como lagos e rios (VICTORINO, 2007;

SABESP, 2015).

O Brasil possui 13% de todas as reservas de água doce disponíveis do planeta, o que o enquadra em uma situação satisfatória em relação aos outros países. No entanto, 81% de todo esse volume encontra-se na Bacia Amazônica, região com o menor contingente populacional (5% da população brasileira) e consequentemente com a menor demanda (ANA, 2015). Já na região Sudeste, se concentra o maior contingente populacional, e dessa forma, as pressões antrópicas e a demanda de água são elevadas. Neste contexto, algumas localidades apresentaram recentemente um quadro de escassez de água, levantando discussões sobre uso racional da água, reúso e os cuidados relacionados à qualidade da água de abastecimento (ANA, 2015).

Nas últimas décadas, a preocupação do ser humano com a água cresceu muito. A distribuição desigual das águas superficiais, seu uso inadequado, bem como a diversidade de interesses em relação aos seus usos, estão sendo motivos de conflitos e de ameaças à garantia desse recurso para as gerações presentes e futuras (ANA, 2011).

Neste sentido, em 1997, foi promulgada a Lei nº 9.433, que instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos, criando o Sistema Nacional de Gerenciamento dos Recursos, alavancando uma nova fase na administração das águas no país. Dessa forma, optou-se pela Bacia Hidrográfica como unidade básica de planejamento e gestão, com a criação dos Comitês de Bacias Hidrográficas (ANA, 2015).

Os Comitês de Bacias Hidrográficas discutem sobre os usos da água na Bacia, promovendo a conservação e a recuperação dos recursos hídricos e garantindo assim, a sua utilização de forma racional e sustentável, por meio de uma gestão participativa (poderes públicos, usuários e sociedade civil) e descentralizada (ANA, 2015).

Antes de sua criação, o gerenciamento da água era feito de forma isolada por municípios e estado. As informações estavam dispersas em órgãos técnicos e os dados não eram sempre compatíveis. Essa falta de políticas públicas integradas e eficientes para o manejo dos recursos naturais provocou a degradação de muitos rios.

Cabe destacar que existem Comitês de Bacias Estaduais, Interestaduais e Comitês Únicos (quando tanto as Bacias Estaduais e Interestaduais apresentam uma única instância deliberativa). A composição diversificada e democrática dos Comitês contribui para que todos os setores da sociedade com interesse sobre a água tenham representação e poder de decisão sobre sua gestão (CBH, 2017).

Com a criação dos Comitês, o estado de São Paulo foi dividido em 22 unidades de gerenciamento, de acordo com as bacias hidrográficas e afinidades geopolíticas. Cada uma

dessas bacias passou a se chamar Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) (CETESB, 2014). A Figura 5 apresenta as Bacias Hidrográficas do estado de São Paulo.

Figura 5- Bacias Hidrográficas do estado de São Paulo.

Fonte: SIGRH (2017).

3.6 Bacia Hidrográfica do Rio Pardo

A Bacia Hidrográfica do Rio Pardo faz parte da UGRHI 4 (Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 4), localizada na região Hidrográfica da Vertente Paulista do Rio Grande, que abrange todo o trecho à montante do rio Pardo, a partir da sua confluência com o Rio Mogi-Guaçu (SIGRH, 2017).

O Comitê da Bacia Hidrográfica do Pardo foi instalado em 12 de junho de 1996, com sede da Secretaria Executiva na cidade de Ribeirão Preto.

A Bacia integra 23 municípios com sede na UGRHI 4 e um elevado contingente populacional com 1.154.658 habitantes (CETESB, 2017). O maior município é Ribeirão Preto, com uma população estimada de mais de 600 mil habitantes, ou seja, abrange mais da

Tabela 5- Municípios pertencentes à UGRHI 4 e suas respectivas fontes de abastecimento de água, demanda de abastecimento, porcentagem da população atendida pela coleta e tratamento de esgoto.

Município	Fonte de Abastecimento	Demanda do Abastecimento	Coleta de esgoto	Tratamento de esgoto*
Altinópolis	Água Subterrânea	Satisfatório	100%	100%
Brodowski	Água Subterrânea	Requer ampliação do sistema- novos poços	100%	100%
Caconde	Ribeirão Della Torre, Ribeirão São Miguel	Requer novo manancial- Córrego São João	100%	0%
Cajuru	Ribeirão Vermelho	Ampliação do sistema existente	95%	100%
Casa Branca	Córrego Lar Esperança; Córrego Desterro; Água Subterrânea	Requer novo manancial- Ribeirão dos Congonhas	100%	100%
Cássia dos Coqueiros	Rio Cubatão	Satisfatório	86%	100%
Cravinhos	Água Subterrânea	Satisfatório	99%	100%
Divinolândia	Córrego Santo Ambrósio	Requer novo manancial- Rio do Peixe	85%	88%
Itobi	Rio Doce	Satisfatório	85%	100%
Jardinópolis	Água Subterrânea; Nascente	Satisfatório	100%	0%
Mococa	Rio Canoas	Satisfatório	95%	100%
Ribeirão Preto	Água Subterrânea	Requer novo manancial- Rio Pardo	99%	100%
Sales Oliveira	Água Subterrânea	Satisfatório	95%	100%
Santa Cruz da Esperança	Água Subterrânea	Satisfatório	100%	100%
Santa Rosa de Viterbo	Ribeirão Quebra Cuia	Satisfatório	96%	100%
São José do Rio Pardo	Rio Pardo (82%); Rio Fatura (18%)	Satisfatório	92%	13%
São Sebastião da Gramma	Ribeirão Anhumas	Satisfatório	100%	10%
São Simão	Água Subterrânea; Nascente	Satisfatório	99%	0%
Serra Azul	Água Subterrânea	Satisfatório	81%	100%
Serrana	Água Subterrânea	Requer novo manancial- Ribeirão das Figueiras	100%	0%
Tambaú	Rio Arrepentida	Satisfatório	100%	100%
Tapiratiba	Ribeirão Soledade	Satisfatório	100%	85%
Vargem Grande do Sul	Rio Verde Barragem	Satisfatório	100%	90%

* Tratamento de esgoto: porcentagem relativa à coleta. Fonte: Adaptado de ANA (2017); CETESB (2017).

É possível observar que quatro municípios não possuem sistemas de tratamento de esgoto (Caconde, Jardinópolis, São Simão e Serrana) e que dois municípios possuem sistemas de tratamento que atendem a 13% (São José do Rio Pardo), e 10% da população (São Sebastião da Gramma), índices considerados ruins (<50%) (CETESB, 2017).

Quanto à demanda de água, a Bacia se enquadra como “em industrialização”, apresentando uma disponibilidade hídrica razoável quando comparada a outras bacias do estado, com qualidade de água que varia de média a boa (SIGRH, 2015). De acordo com a Tabela 5, é possível verificar que sete municípios da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo necessitam de um novo manancial ou a ampliação do sistema já existente para atender a demanda do abastecimento de água. Cabe destacar que o Comitê de Bacia Hidrográfica do Rio Pardo faz um alerta especial, devido à disponibilidade hídrica, para os municípios de Ribeirão Preto (situação crítica) e Serrana (em atenção), que apresentam valores internacionalmente compreendidos como merecedores de atenção especial dos gestores hídricos (CBH-PARDO, 2016).

Neste sentido, existem esforços para ampliação de estudos da qualidade da água do rio Pardo devido a eminente necessidade de utilização dessa fonte de água para abastecimento público na cidade de Ribeirão Preto e região, atualmente abastecida pelo Aquífero Guarani, que está sofrendo um rebaixamento do nível de água (DANTAS et al., 2009, ANA, 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento da pesquisa

Trata-se de uma pesquisa de caráter descritivo-exploratório para identificação e quantificação de bioagentes presentes na água do rio Pardo, Brasil, e estimativa de risco microbiológico para seres humanos expostos à água do rio, a partir da abordagem da Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico.

4.2 Local de estudo e pontos de coleta

O local de estudo é compreendido pelo rio Pardo, o qual possui nascentes no Planalto Sul de Minas (nasce na Serra de Ipuíuna, município de Ipuíuna, MG) e se dirige para o rio Grande acompanhando a inclinação do relevo. Trata-se do maior afluente do rio Grande pela margem esquerda, ao qual se lança após um curso de cerca de 550 km de extensão. Apesar de nascer em Minas Gerais, 84% do seu curso desenvolve-se no Estado de São Paulo (CBH-GRANDE, 2017; SIGHR, 2017).

O rio Pardo faz parte da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo integrando 23 municípios com sede na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 4 (UGRHI 4) e um elevado contingente populacional com 1.154.658 habitantes (CETESB, 2017).

O rio Pardo, segundo a classificação do CONAMA nº 357, trata-se de um rio classe 2, podendo ser utilizado para diversos fins, incluindo a recreação de contato primário, a irrigação, a atividade de pesca e o abastecimento público após o tratamento convencional da água (BRASIL, 2005).

Para o presente estudo foram selecionados seis pontos de coleta ao longo do rio Pardo sendo que os Pontos 1, 2, 4 e 5 são rotineiramente monitorados pela CETESB, o Ponto 3 é o provável local de captação de água para o município de Ribeirão Preto, SP, (ANA, 2013) e o Ponto 6 corresponde confluência do rio Pardo com o rio Grande (fz). Os pontos de coleta de no rio Pardo, municípios próximos aos pontos e localização geográfica estão inseridos na Tabela 6. A Figura 7 apresenta o mapa com os pontos de coleta.

Tabela 6- Pontos de coleta de dados no rio Pardo, municípios próximos aos pontos e localização geográfica. 2015-2016.

Pontos	Municípios	Longitude	Latitude
1	Caconde, SP/São José do Rio Pardo	W46° 50' 07.9"	S21° 34' 18.7"
2	Mococa, SP/Casa Branca, SP	W47° 02' 34.8"	S21° 37' 22.7"
3	Ribeirão Preto, SP (captação)	W47° 41' 26.1"	S21° 07' 56.4"
4	Ribeirão Preto, SP (clube de recreação)	W47° 45' 27.3"	S21° 06' 12.2"
5	Pontal, SP/ Cândia, SP	W48° 01' 35.4"	S20° 57' 57.6"
6	Colômbia, SP (foz)	W48° 38' 27.3"	S20° 10' 22.8"

Figura 7- Representação gráfica dos pontos de coleta ao longo do rio Pardo, Brasil. Ribeirão Preto. 2015-2016.

Fonte: Adaptado de Alves (2014).

4.3 Períodos de coleta de amostras da água do rio Pardo

Durante os anos de 2015 e 2016, foram realizadas seis coletas de amostras da água do rio Pardo, nos seis pontos estabelecidos, totalizando 36 amostras. Três coletas foram realizadas no período chuvoso (março/2015, dezembro de 2015 e fevereiro de 2016) e três coletas foram realizadas no período seco (junho de 2015, agosto de 2015 e julho de 2016). A Figura 8 representa as chuvas mensais do ano de 2015 e de 2016 na cidade de Ribeirão Preto, levando em consideração que os locais onde foram realizadas as coletas possuíam perfil de

precipitações semelhantes a este município (CIIAGRO, 2017).

Figura 8- Gráfico relativo aos meses de coleta de amostras da água do rio Pardo nos meses de chuva e seca. Ribeirão Preto. 2015-2016.

4.4 Coleta das amostras da água do rio Pardo

As técnicas de coleta, preservação e transporte de amostras foram baseadas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

Para análise de *E. coli* e *Salmonella* Não Tifóide foram coletados respectivamente 100 mL e 200 mL de amostras de água do rio Pardo em recipientes individuais e estéreis (NASCO, USA). Para análise de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram coletados 10 L de amostra de água do rio Pardo em garrafas de polietileno estéreis (NALGENE, USA). Posteriormente as amostras foram encaminhadas sob refrigeração, ao Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (LEPA-EERP/USP) para realização das análises, dentro de um período máximo de 24h.

4.5 Análises de amostras da água do rio Pardo

4.5.1 Identificação e quantificação da densidade de *Escherichia coli*

A identificação e quantificação de *E. coli* em amostras de água foi realizada de acordo

com a Técnica da CETESB (2012) L5.230 “*E. Coli* – Determinação pela técnica de membrana filtrante em amostras de águas – Método de ensaio”, com utilização do meio de cultura ágar m-Tec Modificado (Difco, USA).

Neste método as bactérias *E. coli* que contém a enzima D- glucoronidase, transforma o substrato bromo 6 cloro 3 indolil β -D-glicuronidase, contido no ágar m-Tec Modificado, em ácido glucurônico, liberando um metabólito de coloração vermelha ou magenta (BOUYD; WAINWRIGHT, 1996).

Inicialmente foram estipulados para análise diferentes volumes da amostra pura (50mL, 20mL, 10mL, 1mL) bem como volumes com diferentes diluições da amostra (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) a fim de selecionar para leitura apenas aquele(s) que fornecera(m) contagem de colônias típicas dentro dos limites aceitáveis (20-80). Estes volumes e diluições foram selecionados por meio de um teste piloto para padronização da técnica nas amostras de água superficial do local em estudo.

4.5.1.1 A preparação da amostra

Os volumes de amostra de 50 mL, 20 mL e 10 mL, foram distribuídos em provetas graduadas estéreis, para posterior filtração. O volume de 1 mL da amostra foi adicionado em um frasco contendo 90 mL de água de diluição estéril. Este volume de água de diluição foi apenas de suporte para que as possíveis bactérias existentes na amostra se distribuíssem uniformemente na superfície da membrana ao ser efetuada a filtração. Para volumes decimais da amostra (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), as diluições foram preparadas transferindo 10 mL da amostra pura em um frasco contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril (10^{-1}). Posteriormente, foram transferidos 10 mL da diluição 10^{-1} para um frasco contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril (10^{-2}). Da mesma forma, foram transferidos 10 mL da diluição 10^{-2} para um frasco contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril (10^{-3}). Depois de preparadas as diluições, foi retirado 1 mL de cada amostra preparada e adicionado a um frasco contendo 90 mL de água de diluição para que as possíveis bactérias existentes na amostra se distribuíssem uniformemente na superfície da membrana ao ser efetuada a filtração.

4.5.1.2 Filtração da amostra

A filtração da amostra foi realizada por um sistema de filtração à vácuo em membrana

de mistura de acetato de celulose e nitrato de celulose, com 47 mm de diâmetro e 0,45 μm de porosidade, brancas, quadriculadas e estéreis (Sartorius, Alemanha). O volume da amostra (pura ou diluída) foi transferido para o porta-filtro e efetuado a filtração. Após a filtração da amostra, o porta-filtro foi lavado três vezes com porções de 20-30 mL de água de diluição estéril, para evitar a retenção de bactérias nas paredes internas do mesmo. Após o término, o vácuo foi imediatamente desligado evitando a secagem excessiva da membrana. Assim, obedecendo aos cuidados de assepsia, a membrana foi transferida para a placa de Petri (49x13 mm) contendo o meio ágar m-Tec modificado (Difco, USA).

4.5.1.3 Incubação da amostra

As placas contendo as amostras foram inicialmente incubadas a $35 \pm 0,5$ °C por 2 h em estufa de cultura, seguindo-se de incubação a $44,5 \pm 0,2$ °C, durante 22-24 h, em estufa de cultura com bandejas forradas com material absorvente embebido em água, para fornecer a umidade requerida.

4.5.1.4 Leitura e cálculo da densidade de *E. coli*

Transcorrido o período de incubação, foram selecionadas para contagem a(s) placa(s) que apresentara(m) de 20-80 colônias típicas de *E. coli*, ou seja (coloração vermelha ou magenta). A Figura 9 apresenta colônias típicas de *E. coli* dentro do limite aceitável de leitura.

Figura 9- Colônias típicas para *E. coli* em meio ágar m-Tec modificado pela técnica de membrana filtrante.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

Quando unicamente uma placa apresentou contagem dentro da faixa de 20-80 colônias, foi realizado o seguinte cálculo:

$$E. coli / 100 \text{ mL} = \frac{n^{\circ} \text{ total de colônias típicas}}{\text{Volume filtrado da amostras (mL)}} \times 100$$

Quando mais de uma placa apresentou contagem de colônias dentro da faixa de 20-80, foi realizado o seguinte cálculo:

$$E. coli / 100 \text{ mL} = \frac{\text{somatória das colônias típicas}}{\text{somatória dos volumes correspondentes (ml)}} \times 100$$

A densidade de *E. coli* foi expressa em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *E. coli* por 100 mL de amostra.

4.5.1.5 Teste de Controle de Qualidade para *Escherichia coli*

Para a verificação das colônias típicas para *Escherichia coli* em meio m-TEC foi realizado testes de controle de qualidade para verificar o desempenho do método, como recomendado.

A partir da placa de uma das amostras, foi selecionado um número de 10 colônias típicas bem isoladas, obtidas por meio da Norma Técnica L5.230 da CETESB (2012). Cada colônia foi inoculada em um cartão de identificação bacteriana automatizada para 47 testes bioquímicos com substratos específicos para bactérias Gram-negativas (BIOMERIEUX®, Marcy l'Etoile, Rhone, France; VITEK2-Compact). Nestes testes a identificação bacteriana se dá em nível de gênero e espécie, sendo que a confiabilidade é acima de 90%.

Como resultado do teste de controle de qualidade, todas as colônias inoculadas no cartão foram identificadas como *Escherichia coli* com uma probabilidade alta de confiabilidade variando de 93% a 99%.

4.5.2 Identificação e quantificação da densidade de *Salmonella* Não Tifóide

A identificação e quantificação de *Salmonella* Não Tifóide em água superficial foi realizada segundo o método “Método 1200 EPA- Protocolo analítico para quantificação

(NMP) de *Salmonella* Não Tifóide em água potável e água superficial”, descrito pela USEPA (2012b). Esta análise segue distintas etapas, como apresentado abaixo:

4.5.2.1 Inoculação em Caldo Trípico de Soja (*Tryptic Soy Broth*- TSB)

Inicialmente, foram organizados três séries de cinco frascos ou tubos de Caldo Trípico de Soja (*Tryptic Soy Broth*- TSB) (Difco, Detroit, EUA), contendo respectivamente, 10 ml de TSB concentração tripla (3X), 5 ml de TSB concentração tripla (3X) e 10 ml de TSB concentração simples (1X). As amostras foram homogeneizadas e na primeira série de frascos (10 mL de 3X TSB) foram inoculados 20 ml da amostra não diluída, na segunda série de tubos (5 mL de 3X TSB) foram inoculados 10 mL de amostra e na terceira série de tubos (10 mL de 1X TSB), 1 mL da amostra.

Os frascos e tubos foram incubados a $36,0 \pm 1,5$ °C durante 24 ± 2 h, com homogeneização horizontal. A seguir, foram selecionados os frascos e tubos de TSB exibindo crescimento (turvação do meio), nesse período (Figura 10).

Figura 10- Frascos e tubos com o meio TSB exibindo crescimento para *Salmonella* Não Tifóide (turvação)

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

4.5.2.2 Isolamento em placas com meio Semissólido Rappaport Vassiliadis Modificado (*Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis*- MRSV)

Após a incubação, seis gotas (30 µL) de cada frasco e tubo com TSB positivo foram transferidas para placas com meio Semissólido Rappaport Vassiliadis Modificado (*Modified*

Semisolid Rappaport-Vassiliadis- MRSV) (Difco, Detroit, EUA) suplementado com novobiocina. As gotas foram espaçadas uniformemente na placa (Figura 11).

Figura 11- Caldo TSB positivo em meio MRSV para análise de *Salmonella* Não Tifóide

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

As placas permaneceram por 1 h à temperatura ambiente (sem inverter) para permitir que o meio absorva as gotas. Depois foram incubadas à $42,0 \pm 0,5$ °C durante 16-18 h. A novobiocina adicionada ao meio inibe o crescimento de bactérias gram-positivas. O aspecto semissólido do MRSV permite a motilidade de bactérias do gênero *Salmonella* no meio, o que resulta na formação de um halo esbranquiçado ao redor da gota de inoculação (USEPA, 2012) (Figura 12).

Figura 12- Placa com o meio MRSV sem crescimento típico para *Salmonella* Não Tifóide (A) e com crescimento típico para *Salmonella* Não Tifóide (formação de halo esbranquiçado) (B).

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016

As colônias que apresentaram crescimento típico para *Salmonella* (formação de halo esbranquiçado) foram inoculadas em placas com o meio XLD.

4.5.2.3 Isolamento em placas com meio ágar Desoxicolato Lisina Xilose (*Xylose Lysine Desoxycholate* Agar- XLD)

Utilizando uma alça de inoculação, a borda do halo da colônia foi inoculada por esgotamento em meio ágar Desoxicolato Lisina Xilose (*Xylose Lysine Desoxycholate* Agar- XLD) (Difco, Detroit, EUA). As placas foram incubadas a $36,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 h.

O meio XLD possui sacarose, xilose e lactose como substrato. O meio também contém lisina, sal férrico e o indicador de pH é o vermelho de fenol. A maioria das espécies de *Salmonella* não fermentam a sacarose e a lactose, mas fermentam a xilose e descarboxilam a lisina. Portanto, após utilizar a xilose do meio, as colônias descarboxilam a lisina e adquirem coloração rosada ou vermelha. *Salmonella* utilizam o sal férrico para a produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), apresentando um pigmento negro no centro da colônia ou a colônia se torna enegrecida. A Figura 14 representa uma placa com o meio XLD e uma placa com o meio XLD apresentando crescimento típico para *Salmonella* (Figura 13).

Figura 13- Placa com o meio XLD apresentando crescimento típico para *Salmonella* Não Tifóide

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

Foi escolhida uma colônia bem isolada típica de *Salmonella* da placa com o meio XLD para inocular nos meios TSI (Ágar ferro triplo açúcar), LIA (Ágar Ferro Lisina), e caldo de ureia.

4.5.2.4 Inoculação nos meios: Ferro Triplo Açúcar (*Triple Sugar Iron* – TSI), Ágar Ferro Lisina (*Lysine Iron Agar* – LIA), e caldo de ureia.

Ferro Triplo Açúcar (*Triple Sugar Iron – TSI*) (Difco, Detroit, EUA): Com uma agulha estéril, a colônia típica foi inoculada em meio TSI (inclinado), evitando condições anaeróbias. O tubo foi incubado à $36,0 \pm 1,5$ °C por 24 ± 2 h. O meio TSI é composto por três açúcares sendo, 0,1% glicose, 1,0% lactose e 1,0% sacarose; vermelho de fenol (indicador de pH) para detecção da fermentação de carboidratos indicada pela mudança da cor do indicador de vermelho (básico) para amarelo (ácido) e sulfato de ferro para detecção da produção de sulfato de hidrogênio indicado pela cor preta na base do tubo (BRASIL, 2011a).

Reações típicas para *Salmonella* em meio TSI se dão por rampa alcalina (vermelha), fundo ácido (amarelo) evidenciado pela fermentação da glicose (presente em baixa concentração), e com ou sem produção de H_2S (escurecimento do ágar). A Figura 14 exibe o meio TSI sem inoculação e com inoculação e reação típica para *Salmonella* (BRASIL, 2011a; USEPA, 2012b).

Figura 14- Meio TSI sem inoculação representado pela coloração vermelho laranja, levemente opalescente (A) e meio TSI com reação típica para *Salmonella* Não Tifóide (B)

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

Ágar Ferro Lisina (*Lysine Iron Agar – LIA*) (Difco, Detroit, EUA): Com uma agulha estéril, a colônia típica é inoculada em meio LIA (inclinado), evitando condições anaeróbias. O tubo é incubado à $36,0 \pm 1,5$ °C por 24 ± 2 h. Neste meio, o bromocresol roxo é o indicador de pH que é amarelo em meio ácido e roxo em meio alcalino. A bactéria fermenta a glicose mudando a cor do meio para amarelo (geralmente na base). Depois que acaba a glicose, a *Salmonella* vai utilizar a lisina (descarboxilação da lisina) virando a cor do meio para púrpura novamente. A desaminação da lisina é visualizada no ápice (vermelho-cobreado) e a produção de H_2S (negro), usualmente, da base até a porção central do tubo (BRASIL, 2011a, USEPA, 2012).

Dessa forma, reações típicas para *Salmonella* em meio LIA são caracterizados por fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração da cor do meio), com ou sem a produção de H_2S (escurecimento do meio). A Figura 15 exibe o meio LIA sem inoculação e com inoculação e reação típica para *Salmonella*.

Figura 15- Meio LIA sem inoculação (A) e meio LIA com reação típica para *Salmonella* Não Tifóide (B)

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

Caldo Ureia (Difco, Detroit, EUA).: Com uma agulha estéril, a colônia típica foi inoculada em caldo ureia, evitando condições anaeróbias. O tubo foi incubado à $36,0 \pm 1, 5^\circ C$ por 24 ± 2 h. A urease é uma enzima presente em muitas espécies de micro-organismos que podem hidrolisar a ureia. Se a bactéria é urease-positiva, vai hidrolisar a ureia no caldo, o que resultará na produção de amoníaco, alcalino. O aumento do pH do meio provoca a mudança de cor do caldo para rosa ou vermelho-púrpura. Um teste negativo de urease vai apresentar nenhuma mudança de cor. *Salmonella* são urease-negativa (BRASIL, 2011a; USEPA, 2012b). A Figura 16 apresenta reações de urease-negativa, sem mudança na coloração do caldo ureia (característico de *Salmonella*) e de urease positiva, com mudança na coloração do caldo ureia.

Figura 16- Urease negativa (A) e Urease positiva (B)

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

4.5.2.5 Teste sorológico

Nos tubos com os meios TSI ou LIA que apresentaram crescimento característico, foi adicionada solução salina fisiologia estéril (0,85%), e então homogeneizados para formar uma suspensão. Em seguida, foi transferida 1 gota da cultura em uma das células da placa de Kline e adicionado 1 gota do soro anti-*Salmonella* polivalente flagelar (Probac do Brasil, Brasil). Em uma segunda célula da placa de Kline, foi transferida mais uma gota da suspensão e adicionada 1 gota do soro anti-*Salmonella* polivalente somático (Probac do Brasil, Brasil). A seguir, foi verificada a ocorrência de aglutinação (Figura 17). Ocorrendo a aglutinação nas duas células foi considerado *Salmonella* Não Tifóide positiva. O controle negativo foi realizado por meio da adição de solução salina fisiologia estéril em uma das células da placa de Kline.

Figura 17- Sorologia negativa (A) e sorologia positiva (B) para análise de *Salmonella* Não Tifóide

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016

A estimativa da densidade de bactérias foi determinada com base no número de tubos positivos para *Salmonella* que resultaram de testes positivos tanto por resultados morfológicos, bioquímicos e sorológicos. Os resultados foram calculados a partir da Tabela de Número Mais Provável (NMP) e o valor encontrado foi multiplicado por 100 (USEPA, 2012b). A densidade de *Salmonella* Não Tifóide foi expressa em NMP de *Salmonella* por 100 mL de amostra.

4.5.2.6 Teste de Controle de Qualidade para *Salmonella* Não Tifóide

O controle de qualidade da detecção e quantificação de SNT foi realizado conforme o

Método 1200/USEPA (USEPA, 2012b). As amostras de águas superficiais utilizadas no controle de qualidade foram mantidas refrigeradas (0-10°C) e processadas dentro de um período de 6 horas após a coleta. Para o controle positivo foi utilizado a cepa *Salmonella Typhimurium*- ATCC 14028; NCTC 12023 (BTF Biomérieux, Sydney, Austrália).

O controle de qualidade é subdividido em três procedimentos: Precisão e Recuperação Inicial (PRI), Precisão e Recuperação em Curso (PRC) e Semeadura da Matriz (SM).

Para o cálculo da porcentagem de recuperação (R) foi utilizada a seguinte equação:

$$R = \frac{100 \times (Ns - Nu)}{T}$$

Onde:

Ns= Número Mais Provável na amostra com semeadura experimental

Nu= Número Mais Provável na amostra sem semeadura experimental

T= Concentração de *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028; NCTC 12023) na solução semeada com *BioBall* (BTF Biomérieux, Sydney, Austrália (30UFC/200mL).

Para o cálculo de desvio padrão relativo (DPR), utilizou-se a equação abaixo:

$$DPR = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

4.5.2.6.1 Precisão e Recuperação Inicial (PRI)

O teste de Precisão e Recuperação Inicial (PRI) foi realizado antes do monitoramento das amostras de água do rio Pardo com a finalidade de demonstração inicial da capacidade laboratorial. Para este teste, o critério de PRI utilizado foi o de 0 horas, uma vez que, todas as análises de amostras de água do rio foram realizadas dentro de 6 h após a coleta e o PRI dentro de 30 minutos. Foram preparadas quatro frascos com 200 mL de PBS (Tampão Fosfato-Salina) inoculadas com *BioBall* (BTF Biomérieux, Sydney, Austrália) contendo 30 UFC de *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028; NCTC 12023). As amostras foram homogeneizadas e analisadas conforme o Método 1200 da USEPA (2012b). A Tabela 7 apresenta os resultados dos ensaios de Precisão e Recuperação Inicial (PRI) para *Salmonella* Não Tifóide, Média, Desvio Padrão (DP) e Desvio Padrão Relativo (DPR).

Tabela 7- Resultados dos ensaios de Precisão e Recuperação Inicial (PRI) para *Salmonella* Não Tifóide, Média, Desvio Padrão (DP) e Desvio Padrão Relativo (DPR).

Ensaio (PBS)	% Recuperação
1	120,8
2	147,82
3	98,77
4	153,00
Média (%)	130,1
DP	25,20
DPR (%)	19,38

A taxa de recuperação inicial considerada aceitável segundo o método 1200 da USEPA (2012b) está na faixa de 61% a 151%. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo estiveram dentro do aceitável (130,1%). A precisão é dada pelo DPR, sendo estabelecido pelo método de referência um valor máximo de 67% para. No presente estudo, este resultado de precisão foi de 19,38%, estando dentro do valor máximo aceito.

4.5.2.6.2 Precisão e Recuperação em Curso (PRC)

O teste de Precisão e Recuperação em Curso (PRC) foi realizado após a análise de 18 amostras de água do rio Pardo para a demonstração da capacidade laboratorial em curso. A PRC é indicada a cada 20 amostras coletadas e analisadas da matriz ambiental.

O procedimento seguiu os mesmos passos que a PRI, ou seja, uma amostra de PBS foi inoculada com *BioBall* (BTF Biomérieux, Sydney, Austrália) contendo 30 UFC de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028; NCTC 12023), homogeneizada e analisada conforme o Método 1200 da USEPA (2012b). O resultado para a recuperação foi de 120,8%, estando dentro do intervalo de valores que o método determina como aceitável (20% a 191%).

4.5.2.6.3 Semeadura da Matriz (Spike)

A etapa de semeadura da matriz tem como objetivo avaliar o efeito da amostra de água bruta (matriz) sobre a recuperação *Salmonella* Não Tifóide, com base na contaminação artificial da amostra. Foram reservadas duas amostras de 200 mL de água do rio Pardo, sendo que em uma delas foi inoculada *BioBall* (BTF Biomérieux, Sydney, Austrália) contendo 30 UFC de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028; NCTC 12023). Ambas as amostras

analisadas conforme procedimento descrito. O intervalo de recuperação aceitável é de detectável a 150%. O resultado obtido foi de 32,5%, estando dentro do intervalo estabelecido.

4.5.3 Identificação e quantificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

A análise de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em água superficial foi realizada segundo o método 1623 descrito pela USEPA (2005) “*Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA*”, incluindo as etapas de filtração, eluição, concentração, separação imunomagnética, dissociação térmica e microscopia de imunofluorescência, descritas a seguir:

4.5.3.1 Filtração

A etapa de filtração foi realizada por meio do sistema Filta-Max (IDEXX, USA), ajustando a passagem de água pelo filtro em um fluxo de 1 a 4 L/min (Figura 18).

Figura 18- Sistema de filtração (Filta-Max) para análise de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

4.5.3.2 Eluição

Depois de proceder a filtração de toda a amostra, o filtro de espuma foi retirado do porta-filtro e colocado em um saco plástico estéril, onde foram adicionados 400 mL de PBST (solução salina tamponada com fosfato e Tween). O saco plástico foi homogeneizado em Stomacher (MK 1204, Boitton) durante 5 minutos e o eluído foi transferido para o interior de

um béquer com capacidade para 2 litros. O saco plástico contendo a esponja foi espremido com as mãos a fim de retirar o máximo do eluído possível (Figura 19).

Figura 19- Etapa de eluição para análise de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

O mesmo procedimento foi repetido para uma segunda homogeneização da amostra e o eluído foi transferido para o interior do mesmo béquer.

4.5.3.3 Concentração da amostra

Todo eluído do béquer de 2 L foi transferido para tubos cônicos de 50mL e submetidos a centrifugação a 1500g. durante 15 minutos. Após este período, por meio de um sistema à vácuo, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado até restar 5 mL acima do sedimento no tubo cônico. Cada tubo foi homogeneizado no vortex até o *pellet* ficar completamente ressuspendido. Os volumes ressuspendidos de cada tubo da mesma amostra foram transferidos para um único tubo cônico de 50 mL, que foi centrifugado a 1500g. durante 15 minutos. Por meio de um sistema à vácuo, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado até restar 5 mL acima do sedimento (Figura 20).

Figura 20- Etapa de concentração para análise de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

4.5.3.4 Separação Imunomagnética

O tubo cônico foi agitado no vortex para ressuspender o *pellet* e todo o material foi transferido para um tubo de Leighton individual com o auxílio de uma pipeta de vidro. No tubo de Leighton contendo a amostra concentrada, foram adicionados 1 mL de Buffer A (10x), 1 mL de Buffer B (10x), 100 μ L de *Dynabeads Crypto* e 100 μ L de *Dynabeads Giardia* (LIFE TECHNOLOGIES, USA). O tubo de Leighton foi então fixado no agitador rotatório (modelo AP22, Phoenix) durante 1 h / 18 rotações por minutos em temperatura ambiente. Após rotação de 1 h, o tubo foi removido do agitador e colocado no concentrador de partículas magnéticas (MPC-1) com o lado plano do tubo voltado para o magneto. Gentilmente o tubo foi agitado em ângulo de aproximadamente 90°, inclinando a tampa e a base do tubo para cima e para baixo durante 2 minutos. Imediatamente a tampa foi removida e o sobrenadante desprezado deixando escorrer do lado oposto ao imã. O tubo de Leighton foi retirado da barra magnética e lavado com 1,5 mL do tampão SL-A 1x, utilizando pipeta de vidro de Pasteur. Este líquido contendo a amostra foi transferido para um tubo de microcentrífuga. O tubo de microcentrífuga foi colocado no concentrador magnético MPC-M e agitado suavemente a 180°, por 1 minuto. O sobrenadante foi aspirado e descartado. Posteriormente foi retirado o MPC-M (Figura 21).

Figura 21- Etapa de separação imunomagnética para análise de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

4.5.3.5 Dissociação térmica

Para a dissociação dos cistos e oocistos dos beads foram adicionados 100 μ L de água destilada ao tubo de microcentrífuga, que foi agitado suavemente no vortex. O tubo de microcentrífuga foi então colocado em banho úmido (modelo IT2002H, Bioplus) a 80 °C/10 min (Figura 46). Transcorrido o tempo, o tubo de microcentrífuga foi retirado do banho e homogeneizado no vortex. O tubo de microcentrífuga foi colocado no MPC-M com a barra magnética no lugar. O sobrenadante foi então transferido para uma das cavidades da lâmina de imunofluorescência devidamente identificada com o número da amostra. Foi realizada uma segunda lavagem com mais 100 μ L de água destilada e posterior dissociação. O sobrenadante foi então transferido para a segunda cavidade da lâmina de imunofluorescência. A lâmina contendo a amostra foi deixada *overnight* para completa secagem (Figura 22).

Figura 22- Etapa de dissociação térmica para análise de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

4.5.3.6 Microscopia de imunofluorescência

Inicialmente foi adicionado 10 µl de metanol em cada cavidade da lâmina a fim de fixar a amostra. Depois de seca, foram aplicados 50 µl de anticorpo monoclonal anti-*Giardia* e anti-*Cryptosporidium* conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína - FITC (A100FLR-1X, Aqua-Glo™ G/C) em cada cavidade e assim a lâmina foi transferida para uma câmara úmida e escura a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente as cavidades foram lavadas com 100 µL de PBS e adicionados 100 µL de corante 4',6-diamidino-2-fenilidol (DAPI), agindo por 5 minutos. As cavidades foram lavadas novamente com 100 µL de PBS. Depois foi adicionado 1 gota de DABCO/ glicerol (óleo de montagem) em cada cavidade da lâmina. A lâmina foi coberta com uma lamínula e selada.

As observações foram realizadas empregando-se os aumentos de 250x, 400x e 600x, em microscópio com filtros apropriados de epifluorescência (filtro de excitação: 450-490 nm; filtro de barreira: 520 nm) para a contagem do número de (oo)cistos presentes nas diversas preparações. Também foram realizadas observações com microscopia de contraste de fase e filtro DAPI para confirmação de detalhes morfológicos.

Critérios de positividade para *Cryptosporidium* spp. (Figura 23): imunofluorescência: grau de fluorescência definida pela intensidade verde-maçã brilhante, tamanho de 4-6 µm, formato esférico; Teste confirmatório utilizando DAPI: coloração dos núcleos em azul-céu, sendo estes visualizados dentro de um único oocisto; Contraste de fase: presença de sutura para oocistos.

Figura 23- Coloração FITC (A), DAPI (B) e DIC (C) para amostras positivas de *Cryptosporidium* spp.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

Critérios de positividade para Giardia spp. (Figura 24): imunofluorescência: grau de fluorescência definida pela intensidade verde-maçã brilhante, tamanho de 8-12 µm, formato esférico ou ovalado; Teste confirmatório utilizando DAPI: coloração dos núcleos em azul-céu, sendo estes visualizados dentro de um único cisto; Contraste de fase: presença de axonema e visualização dos núcleos.

Figura 24- Coloração FITC (A), DAPI (B) e DIC (C) para amostras positivas de *Giardia* spp.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

O cálculo é dado da seguinte forma:

$$N^{\circ} \text{ de (oo)cistos por Litro} = \frac{N^{\circ} \text{ de (oo)cistos confirmados}}{V}$$

Onde, V = volume em litros de amostra filtrada (10L).

Os resultados foram expressos em números de (oo)cistos de *Cryptosporidium* ou *Giardia* por litro de amostra (concentração).

4.5.3.7 Teste de Controle de Qualidade para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

O controle de qualidade da detecção e quantificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foi realizado conforme o Método 1623 da USEPA (2012). Para aferição da confiabilidade dos resultados de quantificação de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. descritos, foram realizados testes de Precisão e Recuperação Inicial (PRI), Precisão e Recuperação em Curso (PRC) bem como Semeadura da Matriz (SM).

4.5.3.7.1 Precisão e Recuperação Inicial (PRI)

Os testes de precisão e recuperação inicial foram realizados com água destilada, e dessa forma, com a finalidade de atestar a habilidade de execução do método de detecção, livre de interferências da matriz como, por exemplo, a turbidez.

Para o estudo, quatro amostras de água destilada foram contaminadas artificialmente utilizando suspensão padronizada Easy Seed™ (BTF, Austrália) contendo 100 oocistos de *Cryptosporidium* e 100 cistos de *Giardia*. Cada suspensão padronizada foi adicionada a 10L de água destilada seguindo as instruções do fabricante e posteriormente o procedimento foi realizado de acordo com o método 1623 da USEPA (2005). Para o controle negativo, foi processada uma amostra de água destilada sem contaminação.

Para determinação da taxa de recuperação foi calculado a média de quatro ensaios realizados, bem como o Desvio Padrão (DP) e o Desvio Padrão Relativo (DPR).

A taxa de recuperação (R) foi calculada conforme a seguinte equação:

$$R = \frac{\text{Número de (oo)cistos recuperados}}{\text{Número de (oo)cistos da suspensão padronizada}} \times 100$$

Para o cálculo de desvio padrão relativo (DPR), utilizou-se a equação abaixo:

$$DPR = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

A Tabela 8 exibe os resultados dos quatro ensaios realizados para recuperação e precisão inicial de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., bem como a média, Desvio Padrão (DP) e Desvio Padrão Relativo (DPR).

Tabela 8. Resultados dos ensaios de Precisão e Recuperação Inicial (PRI) para (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., Média, Desvio Padrão (DP) e Desvio Padrão Relativo (DVR).

Ensaio	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> (%)	Cistos de <i>Giardia</i> (%)
1	69	58
2	65	57
3	68	68
4	68	62
Média (%)	67,5	61,3
DP	1,7	5,0
DPR (%)	2,6	8,1

A recuperação inicial considerada aceitável segundo o método 1623 da USEPA (2005) está na faixa de 24% a 100%, tanto para oocistos de *Cryptosporidium* quando para cistos de *Giardia*. Dessa forma, os resultados de recuperação obtidos no presente estudo (67,5% para *Cryptosporidium* e 61,3% para *Giardia*) estão dentro do aceitável.

A precisão é dada pelo DPR, sendo estabelecido pelo método de referência um valor máximo de 55% para *Cryptosporidium* e 49% para *Giardia*. No presente estudo, estes resultados de precisão foram de 2,6% para *Cryptosporidium* e 8,1% para *Giardia*, estando dentro dos valores máximos estabelecidos para cada protozoário.

4.5.3.7.2 Precisão e Recuperação em Curso (PRC)

A PRC é indicada a cada 20 amostras analisadas da matriz ambiental, sendo que no presente estudo, foi realizada após a análise de 18 amostras de água do rio Pardo. O procedimento seguiu os mesmos passos que a PRI, sendo que uma amostra de 10 L de água destilada foi semeada utilizando suspensão padronizada Easy SeedTM (BTF, Austrália) contendo 100 oocistos de *Cryptosporidium* e 100 cistos de *Giardia*. Os valores obtidos foram de 69% para *Cryptosporidium* e 68% para *Giardia*, estando dentro dos quais o método determina como aceitável (11% a 100% para *Cryptosporidium* e de 14% a 100% para *Giardia*).

4.5.3.7.3 Semeadura da Matriz (SM)

A etapa de recuperação da matriz tem como objetivo avaliar o efeito da amostra de água bruta sobre a recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* e os cistos de *Giardia*, com

base na contaminação artificial dessas amostras.

Para a realização da etapa de precisão e recuperação da matriz, foram coletadas duas amostras de 10 L de água superficial do rio Pardo, no mesmo local e dia. Após a terceira coleta (18 amostras) foi realizado o mesmo procedimento. No momento da análise, em um dos fracos adicionou-se a suspensão padronizada de Easy Seed™ (BTF, Austrália) com 100 cistos de *Giardia* e 100 oocistos de *Cryptosporidium*. No outro, seguiu-se o procedimento, sem adição de (oo)cistos. Para o cálculo da porcentagem de recuperação foi utilizada a seguinte equação:

$$R = 100 \times \frac{(N_{sp} - N_s)}{T}$$

Onde:

R(%) = Recuperação

N_{sp} = número de (oo)cistos na amostra com semeadura experimental (Spike)

N_s = número de (oo)cistos na amostra sem semeadura experimental

T = número de (oo)cistos contidos na solução padronizada

Para oocistos de *Cryptosporidium* a média de recuperação da matriz pode variar de 13 a 111%, enquanto que para cistos de *Giardia* pode variar de 15 a 118%. No presente estudo os valores obtidos foram de 39% para *Cryptosporidium* e para 63% para *Giardia*, estando dentro dos valores aceitáveis.

4.6 Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM)

A estimativa de probabilidade de infecção e doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. devido exposição à água do rio Pardo foi realizada com a utilização da abordagem da Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM). Para o presente estudo foi levado em consideração o uso da água do rio Pardo para abastecimento público após tratamento convencional e o uso da água do rio Pardo para recreação de contato primário. A abordagem da AQRM foi conduzida de acordo com as etapas de identificação do perigo (patógenos), avaliação da exposição, avaliação da dose resposta e caracterização do risco (HAAS, 1999).

Os bioagentes patogênicos de interesse para AQRM foram *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. devido à persistência no ambiente aquático, à resistência ao processo

convencional de tratamento de água e ao tratamento de esgoto por Lodos Ativados, bem como pela baixa dose de infecção em hospedeiros humanos. Ademais, ambos os patógenos estão associados à doenças e surtos de veiculação hídrica em nível mundial, sendo relevante sua pesquisa tanto em águas de abastecimento público, quanto em águas recreacionais.

4.6.1 Uso da água do rio Pardo para abastecimento público após tratamento convencional

A AQRM foi abordada mediante duas questões principais: Qual a probabilidade de infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para crianças e adultos por consumir a água do rio Pardo após tratamento convencional? Qual a probabilidade de crianças e adultos adoecerem por criptosporidiose ou giardíase por ingerir a água do rio Pardo após tratamento convencional?

A Figura 25 apresenta resumidamente o modelo conceitual de exposição à protozoários patogênicos devido ao consumo da água do rio Pardo após tratamento convencional, desde as fonte prováveis de contaminação até o receptor.

Figura 25- Modelo conceitual de exposição à *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. devido ao consumo da água do rio Pardo após tratamento convencional.

O cenário proposto para caracterização do risco utilizou as concentrações de médias de

(oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. de seis amostras de água do rio Pardo coletadas em seis pontos. Nos locais e coletas em que não foram detectados (oo)cistos, para o cálculo da média, adotou-se metade do Limite de Detecção.

Foram consideradas duas faixas etárias: Crianças (<5 anos) e adultos (> 21 anos). O grupo de crianças foi avaliado porque representa a população mais sensível, enquanto que o grupo de adulto representa a população em geral. Os valores para volumes de ingestão de água para crianças e adultos e suas distribuições foram adotados de acordo com Sato et al. (2013) baseado em Kahn e Stralka (2009) para população da região Sudeste do Brasil (Tabela 9). Os parâmetros de exposição relacionados ao consumo da água do rio Pardo contaminada com *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9- Parâmetros de exposição para uso da água do rio Pardo para abastecimento público após tratamento convencional da água.

Variável	Descrição	Valor	Distribuição	Parâmetros de distribuição	Referência
C	Concentração	Média (oo)cistos/L	-	-	Presente estudo
TI	Taxa de Ingestão	Criança: 0,44L/dia Adulto: 1,50 L/dia	Log- normal	$\sigma=0,92$ $\sigma=0,8$	Kahn; Stralka (2009); Sato et al. (2013)
F	Frequência da exposição	365 dias/ano	-	-	-

Com relação ao modelo de dose resposta, tanto para *Cryptosporidium* quanto para *Giardia* foi utilizado o modelo exponencial, com parâmetros $r= 0,00419$ (DUPONT et al., 1995) e $r=0,01982$ (ROSE et al., 1991), respectivamente. A probabilidade de infecção para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. devido ao consumo da água do rio Pardo, após tratamento convencional, foi estimado por meio da concentração de (oo)cistos utilizando modelo de dose resposta exponencial.

Para água destinada ao consumo humano, aplicou-se o modelo exponencial:

$$Pi = 1 - \exp(-r \times D)$$

Onde, Pi é a probabilidade de infecção diária; r é a probabilidade de um bioagente específico iniciar uma infecção; D é a dose (dada pela C- concentração do bioagente pesquisado x TI - taxa de ingestão de água).

Foram consideradas remoção de 3 log para cistos de *Giardia* spp. e 2 log para oocistos de *Cryptosporidium* spp., considerando o tratamento convencional da água bruta do rio do

Pardo para o consumo humano (Nieminski, 1997).

Partindo da probabilidade diária de infecção, foi possível calcular a probabilidade anual de infecção, segundo a equação:

$$Pa = 1 (1 - Pi)^F$$

Onde, Pa é a probabilidade de infecções durante o período ; Pi é a probabilidade diária de infecção; F é a frequência de exposição (365 dias ao ano).

Os riscos de doenças foram estimados mediante a incorporação de taxas de doenças relacionadas aos bioagentes em questão:

$$P \text{ doença} = Pa \times I$$

Onde, I é o percentual de infecção que resulta em doença, sendo considerado para o presente estudo, 39% para *Cryptosporidium* spp. e 50% para *Giardia* spp.

Para tratamento das incertezas foi utilizado a Simulação de Monte Carlo por meio do software Crystal Ball® (Decisioneering, Inc., Denver, CO, USA), fornecendo 100.000 interações. Os resultados obtidos equivalem aos valores médios de riscos e ao intervalo de probabilidade de 95%.

4.6.2 Uso da água do rio Pardo para recreação de contato primário

A AQRM foi abordada mediante duas questões principais: Qual a probabilidade de infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para crianças e adultos por ingerir acidentalmente água do rio Pardo após atividades de recreação por contato primário? Qual a probabilidade de crianças e adultos adoecerem por criptosporidiose ou giardíase por ingerir acidentalmente água do rio Pardo após atividades de recreação por contato primário?

A Figura 26 apresenta resumidamente o modelo conceitual de exposição à protozoários patogênicos devido às atividades de recreação de contato primário desde as fonte prováveis de contaminação até o receptor.

Figura 26- Modelo conceitual de exposição à *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. devido às atividades de recreação de contato primário

O cenário proposto para caracterização do risco utilizou as concentrações de médias de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. de seis amostras de água do rio Pardo coletadas em seis pontos. Nos locais e coletas em que não foram detectados (oo)cistos, para o cálculo da média, adotou-se metade do Limite de Detecção. As taxas de ingestão, duração e frequência da exposição foram consideradas diferentes para adultos (homens e mulheres) e crianças.

Foram consideradas duas faixas etárias: Crianças (<15 anos) e adultos (≥ 15 anos). O grupo de crianças foi avaliado porque representa a população mais sensível, enquanto que o grupo de adulto representa a população em geral (Schets et al., 2011). Os valores para volumes de ingestão de água para crianças e adultos (homens e mulheres), duração da exposição, frequência da exposição bem como as distribuições e parâmetros de distribuição, foram adotados com base no trabalho de Schets et al. (2011), de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10- Parâmetros de exposição para uso da água do rio Pardo para recreação de contato primário.

Variável	Descrição	Valor	Distribuição	Parâmetros de distribuição	Referência
C	Concentração	Média (oo) cistos/L	-	-	Presente estudo
TI	Taxa de Ingestão	Criança: 37 mL Homem: 27 mL Mulher :18 mL	Gamma	$r=0,64; \lambda=58$ $r=0,45; \lambda=60$ $r=0,51; \lambda=35$	Schets et al. 2011
ED	Duração da exposição	Criança: 79 min Homem: 54 min Mulher: 54 min	Log-normal	$\mu=4,1; \sigma=0,8$ $\mu=3,6; \sigma=0,85$ $\mu=3,5; \sigma=0,94$	Schets et al. 2011
F	Frequência da exposição	Criança: 8 dias/ano Homem: 7 dias/ano Mulher: 7 dias/ano	Binomial negativa	$r=1,3; \lambda=0,14$ $r=1,2; \lambda=0,15$ $r=1,3; \lambda=0,17$	Schets et al. 2011

Com relação ao modelo de dose resposta, tanto para *Cryptosporidium* quanto para *Giardia* foi utilizado o modelo exponencial, com parâmetros $r= 0,00419$ (DUPONT et al., 1995) e $r= 0,01982$ (ROSE et al., 1991), respectivamente.

A probabilidade anual de infecção para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. devido às atividades de recreação de contato primário na água do rio Pardo foi estimada por meio da concentração de (oo)cistos utilizando modelo dose resposta exponencial.

Primeiro, foi calculado a probabilidade diária de infecção:

$$Pi = 1 - \exp(-r \times D \times DE)$$

Onde, Pi é a probabilidade de infecção diária; r é a probabilidade de um bioagente específico iniciar uma infecção; D é a dose (dada pela C- concentração do bioagente pesquisado x TI - taxa de ingestão de água); DE é a duração da exposição (horas).

Partindo da probabilidade diária de infecção, foi possível calcular a probabilidade anual de infecção, segundo a equação:

$$Pa = 1 (1 - Pi)^F$$

Onde, Pa é a probabilidade de infecções durante o ano; Pi é a probabilidade diária de infecção. F é a frequência de exposição (dias/ano).

Os riscos de doença foram estimados mediante a incorporação de taxas de doença relacionadas ao bioagente em questão:

$$P \text{ doença} = Pa \times I$$

Onde, I é o percentual de infecção que resulta em doença, sendo considerado para o presente estudo, 39% para *Cryptosporidium* spp. e 50% para *Giardia* spp.

Para tratamento das incertezas foi utilizado a Simulação de Monte Carlo por meio do software Crystal Ball®, fornecendo 100.000 interações. Os resultados obtidos equivalem aos valores médios de riscos e ao intervalo de probabilidade de 95%.

4.7 Análise dos dados

Para os cálculos estatísticos, os resultados de *Escherichia coli*, *Salmonella* Não-Tifóide, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. que se apresentaram abaixo do limite de detecção, foi considerado a concentração de metade dos valores dos limites. Foi empregado o teste de Mann-Whitney para a comparação dos bioagentes na água do rio Pardo entre os períodos chuvoso e seco, por meio do software BioEstat 5.0. Além disso, os resultados obtidos foram discutidos com os valores máximos estabelecidos pelas legislações brasileiras e parâmetros internacionais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos pontos de amostragem no rio Pardo

Levando em consideração que o rio Pardo é um importante recurso hídrico da região nordeste do estado de São Paulo amplamente utilizado pela população para diversas atividades, dentre as quais merecem destaque o abastecimento público e a recreação de contato primário, a seguir é apresentada uma caracterização dos pontos de amostragem ao longo do rio Pardo e os usos da água pela população ao entorno, apontando as possíveis fontes de contaminação por bioagentes.

5.1.1 Ponto 1

O Ponto 1 está localizado na ponte da rodovia SP-350, no trecho que liga os municípios de Caconde, SP à São José do Rio Pardo, SP (CETESB, 2017). A Figura 27 apresenta a vista parcial do local de coleta no Ponto 1, nos períodos chuvoso e seco, respectivamente. A Figura 28 exibe a imagem de satélite próximo ao local.

Figura 27- Vista parcial do Ponto 1 no rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

Figura 28. Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 1.

Fonte: Google Earth (2017).

O município de Caconde (SP) possui aproximadamente 13 mil habitantes e se localiza a montante do Ponto 1. Todo esgoto gerado pela população do município é despejado sem tratamento no rio Pardo (CETESB, 2017). Este ponto, ainda, recebe água do rio do Peixe pela margem direita, que é um dos principais afluentes do rio Pardo. O rio do Peixe nasce no Estado de Minas Gerais, atravessa a cidade de Divinolândia (SP), onde é lançado parte do esgoto que não é tratado (12%), e deságua no rio Pardo. Ao entorno do Ponto 1, existem construções habitacionais afastadas das cidades utilizadas para moradia e lazer (áreas de recreação, ranchos, chácaras e sítios) (Figura 28) e regiões de pastagens com criação animal

(IBGE, 2017). As plantações extensivas de cana-de-açúcar substituíram as matas ciliares e ocuparam as Áreas de Preservação Permanente e, assim, o local próximo ao Ponto 1, encontra-se em desacordo com o Código Florestal Brasileiro (BRASIL, 2012; MACHADO et al., 2015).

5.1.1.1 Uso do rio Pardo próximo ao Ponto 1

Abastecimento público: À jusante do ponto 1 se localiza a cidade de São José do Rio Pardo, com uma população estimada de aproximadamente 54 mil habitantes (IBGE, 2017), onde o rio Pardo é utilizado para abastecimento público municipal, atendendo à demanda de 81% da população. As águas são tratadas em quatro Estações de Tratamento de Água (ETA João de Souza, ETA Centra, ETA Santo Antônio e ETA Cassucci) (ANA, 2017). A Figura 13 representa o mapa do município de São José do Rio Pardo, com as respectivas localizações dos pontos de captação de água para abastecimento público.

Figura 29- Mapa do município de São José do Rio Pardo, com as respectivas localizações dos pontos de captação de água para abastecimento público.

(a) ETA João Souza; (b) ETA Central; (c) ETA Santo Antônio; (d) ETA Carlos Cassucci. Fonte: Google Mapa, 2017; ANA, 2007.

Recreação de contato primário: À montante do Ponto 1, a água do rio Pardo é utilizada para recreação de contato primário, onde existe uma praia de água doce, denominada Parque Prainha, Caconde, SP. O parque possui uma estrutura para 3.000 visitantes e 150 barracas de camping, tendo principal movimentação ao longo da primavera e do verão, nos feriados e

finais de semana (SILVA; DALEFFI; BOZZINI, 2016) (Figura 30).

Figura 30. Rio Pardo sendo usado para atividades de recreação de contato primário próximo ao Ponto 1.

Fonte: Drone Phantom 2 Vision Plus.2016.

5.1.2 Ponto 2

O Ponto 2 está localizado na ponte da rodovia SP-340, no trecho que liga os municípios de Casa Branca, SP à Mococa, SP (CETESB, 2017). A Figura 31 apresenta a vista parcial do local de coleta no Ponto 2, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente, e a Figura 32 exibe a imagem de satélite próxima ao ponto.

Figura 31- Vista parcial do Ponto 2 no rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

Figura 32- Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 2.

Fonte: Google Earth (2017).

O Ponto 2 se localiza após São José do Rio Pardo, o segundo maior município da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo, abrangendo uma população de mais de 54 mil habitantes (IBGE, 2017). A maior parte do esgoto gerado em São José do Rio Pardo (87%) é lançado diretamente no rio Pardo, sem passar por qualquer tratamento (CETESB, 2017). Antes de atingir o Ponto 2, as águas do rio Pardo, passam por dois reservatórios: Armando Salles de Oliveira (Limoeiro) e Euclides da Cunha).

Próximo ao Ponto 2, existem construções habitacionais afastadas das cidades utilizadas para moradia e lazer (áreas de recreação, ranchos, chácaras e sítios) (Figura 32) e

regiões de pastagens com criação animal e regiões de pastagens com criação animal (IBGE, 2017; LOPES et al., 2014). Na margem direita deste ponto do rio Pardo, a Área de Preservação Permanente (APP) está de acordo com o Código Florestal Brasileiro ultrapassando 100 m. Na margem esquerda, porém, a presença de APP é menor de 100 m (MACHADO et al., 2015).

5.1.2.1 Uso do rio Pardo próximo ao Ponto 2

Recreação de contato primário: existem relatos da utilização da água do rio Pardo para atividades de recreação, próximo a este ponto (GLOBO.COM, 2014). Além disso, a existência de áreas de lazer, ranchos, chácaras e sítios que facilitam o acesso das pessoas ao rio.

5.1.3 Ponto 3

O Ponto 3 se situa na região leste do município de Ribeirão Preto, em área rural. A Figura 33 apresenta a vista parcial do local de coleta no Ponto 3, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente, e a Figura 34 exibe a imagem de satélite próxima ao ponto.

Figura 33- Vista parcial do Ponto 3 no rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

Figura 34- Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 3.

Fonte: Google Earth (2017).

Serrana (SP) se localiza à montante do Ponto 3, abrangendo uma população de quase 43 mil habitantes. Todo esgoto gerado pela população de Serrana, é despejado sem tratamento no rio Pardo (CETESB, 2017). Entretanto, segundo Decreto Municipal emitido em junho de 2017, a Estação de Tratamento de Esgoto está em fase de construção (SERRANA, 2017).

Próximo ao Ponto 3, existem extensos cultivos de cana-de-açúcar (MACHADO et al., 2015) e áreas de pastagens com criação animal (IBGE, 2017). À margem esquerda do rio houve remoção da mata ciliar para a construção de habitações afastadas das cidades utilizadas para moradia e lazer (áreas de recreação, ranchos, chácaras e sítios) (Figura 34), sendo que a

APP não respeita as exigências do Código Florestal Brasileiro (BRASIL, 2012; MACHADO et al., 2015).

5.1.3.1 Uso do rio Pardo próximo ao Ponto 3

Abastecimento público: este trecho é o local previsto para ser o ponto de captação de água para abastecimento público do município de Ribeirão Preto, SP, de acordo com a Resolução nº 1.021, de 6 de agosto de 2013. A autorização para este uso do rio Pardo foi obtida no ano de 2013 (ANA, 2013).

Recreação de contato primário: existem relatos da utilização da água do rio Pardo para atividades de recreação, próximo a este ponto. Além disso, há a existência de construções habitacionais afastadas das cidades utilizadas para moradia e lazer (espaços de recreação, ranchos, chácaras e sítios) (Figura 34) o que facilita o acesso das pessoas ao rio. A Figura 35 apresenta o rio Pardo sendo utilizado para recreação de contato primário em local próximo ao Ponto 3.

Figura 35- Rio Pardo sendo utilizado para recreação de contato primário entre os Pontos 3 e 4. 2015.

Fonte: Jornal da EPTV. 2015.

5.1.4 Ponto 4

O Ponto 4 se localiza à margem esquerda, em um clube de recreação privado no município de Ribeirão Preto (CETESB, 2017). A Figura 36 apresenta a vista parcial do local de coleta no Ponto 4, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente, e a Figura 37 exibe a imagem de satélite próxima ao ponto.

Figura 36- Vista parcial do Ponto 4 no rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

Figura 37- Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 4.

Fonte: Google Earth (2017).

O Ponto 4 se localiza após a Estação de Tratamento de Esgoto Caiçara (ETE Caiçara). A ETE Caiçara tem capacidade para tratar 14% dos esgotos gerado, provenientes dos bairros da zona leste do município. A tecnologia empregada para o tratamento dos esgotos é Lodos Ativados (DAERP, 2017). Cabe destacar, porém, que o processo de tratamento de esgoto lança no rio Pardo uma carga orgânica remanescente (SIGRH, 2017).

À margem esquerda deste ponto, houve desmatamento da mata ciliar para a construção do clube privado. Também existem construções habitacionais afastadas das cidades utilizadas para moradia e lazer (áreas de recreação, ranchos, chácaras e sítios) (Figura 37) e regiões de pastagens com criação animal (IBGE, 2017).

A vegetação ao entorno é especialmente constituída por espécies exóticas, como gramíneas. Assim, o trecho próximo a este ponto encontra-se em desacordo com o Código Florestal Brasileiro (BRASIL, 2012; MACHADO et al., 2015).

5.1.4.1 Uso do rio Pardo próximo ao Ponto 4

Recreação de contato primário: O clube de recreação privado está instalado na área urbana de Ribeirão Preto desde 1933, cujo histórico é de atividades de natação, navegação e pesca no rio Pardo (SAMPAIO, 2012).

A existência de construções habitacionais afastadas das cidades utilizadas para moradia e lazer (áreas de recreação, ranchos, chácaras e sítios) facilita o acesso das pessoas ao rio Pardo para uso recreacional (Figura) (IBGE, 2017).

A Figura 38 apresenta o rio Pardo sendo utilizado para atividades de recreação de contato primário.

Figura 38- Rio Pardo sendo utilizado para recreação de contato primário próximo ao Ponto 4.

Fonte: Folha de São Paulo (2014).

5.1.5 Ponto 5

O Ponto 5 é o local de coleta que se situa à margem direita, a 50 m da ponte da rodovia que liga Pontal, SP a Cândia, SP, próximo ao município de Ribeirão Preto (CETESB, 2017). A Figura 39 apresenta a vista parcial do local de coleta no Ponto 5, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente, e a Figura 40 exibe a imagem de satélite próxima ao ponto.

Figura 39- Vista parcial do Ponto 5 no rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

Figura 40- Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 5

Fonte: Google Earth (2017).

Ribeirão Preto é a cidade mais populosa da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo, com aproximadamente 673 mil habitantes. O Ponto 5, se localiza à jusante de Ribeirão Preto e neste local, o rio Pardo já recebeu as águas do Córrego Ribeirão Preto, corpo hídrico que atravessa o município. De acordo com o Relatório de Situação dos Recursos Hídricos (2016), o córrego Ribeirão Preto recebe esgoto bruto, em decorrência do extravasamento da rede e da falta de interceptores ao longo de vários corpos hídricos do município. Neste mesmo sentido, em um estudo realizado por ALVES et al., 2013, o Córrego Ribeirão Preto apresentou elevadas densidades bacteriológicas e parasitológicas e os resultados inferiram descargas de

esgoto doméstico e comercial em suas águas, o que acaba por provocar a contaminação do rio Pardo por esses bioagentes.

Trata-se também de um ponto que se situa a jusante da Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto, a maior da cidade, com capacidade para tratar 84% do esgoto do município. A ETE Ribeirão Preto emprega a mesma tecnologia de tratamento da ETE Caiçara, e da mesma forma, acaba por lançar no rio Pardo uma carga remanescente do processo de tratamento de esgoto (CBH-PARDO, 2016).

O Ponto 5, se localizado em área rural com predomínio da cultura da cana-de-açúcar, áreas de pastagens com criação animal (IBGE, 2016), bem como construções habitacionais afastadas das cidades utilizadas para moradia e lazer (áreas de recreação, ranchos, chácaras e sítios) (Figura 40). Além disso, as margens ao entorno são cobertas por espécies exóticas como gramíneas e bambus, sendo que houve a degradação da mata ciliar. A APP está em desacordo com o Código Florestal Brasileiro (MACHADO et al., 2015; BRASIL, 2012).

5.1.5.1 Uso do rio Pardo próximo ao Ponto 5

Recreação de Contato primário: a existência de áreas de recreação, ranchos, chácaras e sítios facilita o acesso das pessoas ao rio Pardo para uso recreacional. A Figura 41 apresenta o rio Pardo sendo utilizado para atividades recreacionais de contato primário (natação) próximo ao ponto 5.

Figura 41. Rio Pardo sendo utilizado para recreação de contato primário próximo ao Ponto 5.

Fonte: Andrucioli, 2011. <https://www.youtube.com/watch?v=ad2okKILHQE>, 2017.

5.1.6 Ponto 6

O Ponto 6 corresponde à confluência do rio Pardo com o rio Grande e se situa na UGRHI-12. Este ponto foi escolhido para o presente estudo para analisar a situação microbiológica do rio Pardo ao encontrar o rio Grande. A Figura 42 apresenta a vista parcial do local de coleta no Ponto 6, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente, e a Figura 43 exibe a imagem de satélite próxima ao ponto.

Figura 42- Vista parcial do local de coleta no Ponto 6 do rio Pardo. Ribeirão Preto. 2015-2016.

Foto: LEPA-EERP/USP. Ribeirão Preto, SP. 2015-2016.

Figura 43- Imagem de satélite demonstrando o rio Pardo próximo ao Ponto 6.

Fonte: Google Earth (2017).

Neste ponto, o rio Pardo já recebeu as águas do seu maior afluente, o rio Mogi-Guaçu. Ao entorno, existem áreas onde houve a remoção da APP, sendo que a vegetação predominante é de gramíneas e culturas de cana-de-açúcar, estando em desacordo com o Código Florestal (MACHADO et al., 2015). Há também a presença de construções habitacionais afastadas das cidades utilizadas para moradia e lazer (áreas de recreação, ranchos, chácaras e sítios) (Figura 43) e regiões de pastagens com criação animal (IBGE, 2017).

5.1.6.1 Uso do rio Pardo próximo ao Ponto 6

Recreação de contato primário: a existência de áreas de recreação, ranchos, chácaras e sítios que facilita o acesso das pessoas ao rio Pardo para uso recreacional.

5.2 Monitoramento de *Escherichia coli*, *Salmonella* Não Tifóide, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. na água do rio Pardo

5.2.1 *Escherichia coli* na água do rio Pardo

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos da densidade de *E. coli* (UFC/100mL) na água do rio Pardo nos seis pontos de coleta no período chuvoso e seco e suas respectivas médias e desvio padrão.

Tabela 11- Densidade de *Escherichia coli* (UFC/100mL) na água do rio Pardo nos seis pontos de coleta nos períodos chuvoso e seco e suas respectivas médias e desvio padrão. 2015-2016.

Pontos	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL) - Período Chuvoso				
	Primeira coleta	Segunda coleta	Terceira coleta	Média	DP
1	$1,30 \times 10^3$	$8,40 \times 10^2$	$2,70 \times 10^3$	$1,61 \times 10^3$	$9,69 \times 10^2$
2	$1,29 \times 10^2$	$4,27 \times 10^2$	$9,00 \times 10^2$	$4,85 \times 10^2$	$3,89 \times 10^2$
3	$4,80 \times 10^2$	$1,58 \times 10^3$	$1,16 \times 10^3$	$1,07 \times 10^3$	$5,56 \times 10^2$
4	$2,20 \times 10^3$	$4,70 \times 10^3$	$7,70 \times 10^3$	$4,87 \times 10^3$	$2,75 \times 10^3$
5	$1,30 \times 10^3$	$1,02 \times 10^4$	$6,70 \times 10^3$	$6,07 \times 10^3$	$4,48 \times 10^3$
6	$2,77 \times 10^2$	$5,33 \times 10^2$	$9,80 \times 10^2$	$5,97 \times 10^2$	$3,56 \times 10^2$
Pontos	<i>E. coli</i> (UFC/100 mL) - Período Seco				
	Primeira coleta	Segunda coleta	Terceira coleta	Média	DP
1	$8,70 \times 10^1$	$8,60 \times 10^1$	$4,13 \times 10^2$	$1,95 \times 10^2$	$1,89 \times 10^2$
2	$6,40 \times 10^1$	$1,13 \times 10^2$	$2,00 \times 10^1$	$6,57 \times 10^1$	$4,65 \times 10^1$
3	$7,07 \times 10^2$	$4,46 \times 10^2$	$3,45 \times 10^2$	$4,99 \times 10^2$	$1,87 \times 10^2$
4	$6,50 \times 10^3$	$2,20 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$3,90 \times 10^3$	$2,29 \times 10^3$
5	$3,30 \times 10^3$	$1,30 \times 10^3$	$3,70 \times 10^3$	$2,77 \times 10^3$	$1,29 \times 10^3$
6	$2,67 \times 10^2$	$2,20 \times 10^1$	$4,00 \times 10^1$	$1,10 \times 10^2$	$1,37 \times 10^2$

Os valores médios para *E. coli* variaram de $6,57 \times 10^1$ UFC/100 mL a $6,07 \times 10^3$ UFC/100 mL, apresentando diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os períodos chuvoso e seco. Em todos os pontos de coleta, as médias foram maiores para o período de chuva, inferindo especialmente a contaminação da água do rio Pardo por cargas

poluidoras urbanas e rurais carregadas pelas águas das chuvas (fontes difusas). Além disso, sabe-se que existem fontes pontuais de despejo de esgoto doméstico e efluentes de ETEs que são lançados no rio ou em seus afluentes (ALVES, 2013). No estado de São Paulo, a estação chuvosa apresenta maiores temperaturas, o que também pode ter influenciado no crescimento de *E. coli* (NORTH et al., 2014; STALLARD et al., 2016).

Semelhante ao presente estudo, O'Neill et al. (2013) avaliaram *E. coli* em águas superficiais de Las Vegas, EUA, e encontraram diferença estatisticamente significativa entre os períodos de chuva e de seca, sendo que a precipitação aumentou a densidade bacteriana, em decorrência da provável lavagem do solo pelas águas das chuvas. No mesmo sentido, estudos evidenciaram correlação entre as precipitações e a densidade de *E. coli* em águas de rios no Brasil (ABREU; CUNHA, 2017; OLIVEIRA; CUNHA, 2014; SILVA; GASPARETTO, 2016). Em contrapartida, STALLARD et al. (2016) analisaram dados referentes à concentração de *E. coli* encontradas em águas superficiais de três bacias de Nashville, EUA, no período de 2007 a 2012. Os resultados apontaram maiores valores no período seco, e seus achados foram atribuídos aos baixos níveis de água e consequente aumento da concentração local de bactérias e/ou à replicação de *E. coli* devido ao aumento da temperatura (verão).

De acordo com a Tabela 11, pode-se observar que o Ponto 2 apresentou menores valores médios para *E. coli*, tanto no período chuvoso, como no período seco. Apesar do rio Pardo receber descarga de esgoto doméstico à montante deste ponto, (CETESB, 2017), a passagem da água pelos reservatórios possibilita a recuperação da sua qualidade pelos processos naturais de autodepuração, em relação ao parâmetro *E. coli* (CBH-PARDO, 2015). Além disso, em uma das margens deste ponto, há a presença de mata ciliar, o que pode contribuir para a melhor qualidade da água neste ponto, uma vez que estas funcionam como barreiras para a passagem de fontes de poluição difusa (MACHADO et al., 2015). Neste sentido, estudo realizado pela Fundação SOS Mata Atlântica (2015), mostrou que a melhor qualidade microbiológica das águas superficiais dos estados de SP, RJ, RS, MG, SC e Distrito Federal, estavam em áreas protegidas com matas ciliares preservadas.

Os Pontos 4 e 5 apresentaram as maiores densidade de *E. coli* (Tabela 11), o que pode ser resultado do recebimento de fontes difusas, cargas remanescentes de ETEs e lançamentos de esgotos *in natura*, além de serem áreas que apresentam degradação da mata ciliar. À montante do Ponto 4 se localiza a Estação de Tratamento de Esgoto Caiçara de Ribeirão Preto, que acaba por lançar no rio Pardo uma carga orgânica remanescente (DAERP, 2017; CETESB, 2017). O Ponto 5, se localiza após a confluência do Córrego Ribeirão Preto com o

rio Pardo. Em estudo realizado por Alves (2012) o Córrego Ribeirão Preto apresentou elevadas densidades de *E. coli* e os resultados inferiram descargas de esgoto doméstico em suas águas, o que pode provocar a contaminação do rio Pardo. Ademais, o Ponto 5 se situa à jusante da Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto, e recebe cargas remanescentes de esgoto. Semelhante ao presente estudo, Lenart-Boroń et al. (2017) analisaram águas superficiais na região de Podhale, Polônia, e seus achados revelaram uma grande diversidade da concentração média de *E. coli* nos pontos amostrados, visto que a maior contaminação foi observada nas áreas urbanizadas, com impacto dos efluentes de ETEs e de atividades agrícolas. Em contraste, as áreas cobertas com vegetação nativa apresentaram melhor qualidade microbiológica das águas.

Os Pontos 1, 3, 4 e 5 não atenderam ao padrão estabelecido para *E. coli* em corpos hídricos superficiais Classe 2, destinados ao abastecimento público após tratamento convencional, excedendo os limites de 600 UFC/100 mL em 20% ou mais de pelo menos seis amostras coletadas (BRASIL, 2005; CETESB, 2013). Entretanto, esses resultados não são conclusivos, uma vez que, no presente estudo não se obedeceu as frequências e o período de amostragem para os seis pontos de coleta. Estes mesmos pontos, não atenderam ao padrão estabelecido para *E. coli* pela Resolução nº 274/2000 do CONAMA com base na Decisão de Diretoria nº 112/2013/E de 09/04/2013 em corpos de águas superficiais destinados à recreação de contato primário, que considera impróprias para este uso, quando houver densidade de *E. coli* maiores que 600 UFC/100 mL em mais de 20% de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, do mesmo local (CONAMA, 2000; CETESB, 2013). Os resultados também não são conclusivos por não atenderem as frequências de coletas e análises.

No ano de 2016, a CETESB (2017) realizou o monitoramento de *E. coli* em 10 pontos de captação de água superficial destinadas ao abastecimento público, priorizando as captações com as maiores médias geométricas observadas em ano anterior. Todos os pontos avaliados não atenderam a Resolução nº 357/2005 do CONAMA com base na Decisão de Diretoria nº 112/2013/E de 09/04/2013, sendo que as concentrações de *E. coli* atingiram a ordem de 1×10^4 UFC/100 mL e 1×10^5 UFC/100mL, valores maiores do que os observados no presente estudo.

5.2.2 *Salmonella* Não Tifóide na água do rio Pardo

A Tabela 12 apresenta a densidade de *Salmonella* Não Tifóide (NMP/100 mL) em amostras de água do rio Pardo, nas seis campanhas de coleta, nos seis pontos. Para as amostras que se apresentaram negativas, o resultado foi expresso como densidade de *Salmonella* Não Tifóide <0,6473 NPM (limite de detecção), para cada 100 mL de amostra.

Tabela 12- Densidade de *Salmonella* Não Tifóide (NMP/100mL) na água do rio Pardo nos seis pontos de coleta no período chuvoso e seco. 2015-2016.

Pontos	<i>Salmonella</i> Não Tifóide (NMP/100 mL)					
	Período Chuvoso			Período Seco		
	Primeira coleta	Segunda coleta	Terceira coleta	Primeira coleta	Segunda coleta	Terceira coleta
1	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473
2	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473
3	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473
4	0,72	0,72	<0,6473	<0,6473	<0,6473	0,72
5	0,72	1,55	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473
6	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473	<0,6473

De acordo com os resultados apresentados, *Salmonella* Não Tifóide foi detectada somente em amostras dos Pontos 4 e 5, sendo que esteve mais presente no período chuvoso (quatro amostras) do que no período seco (uma amostra) (Tabela 12). A análise dos dados não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os períodos de chuva e de seca ($p > 0,05$), o que pode ser devido ao número de amostras com valores abaixo do limite de detecção (<0,6473NMP/100 mL).

As densidades de *Salmonella* Não Tifóide foram baixas (<0,6473 a 1,55 NMP/100 mL), com uma frequência de 13,9% das amostras positivas. Silva (2015) analisou *Salmonella* Não Tifóide em águas superficiais da Região Metropolitana de São Paulo, encontrando concentrações que variaram de <0,6473 a 0,67 NMP/100 mL, com apenas 4% das amostras positivas, em períodos de chuvas. Assim como no presente estudo, apesar da baixa frequência e densidade, a detecção de *Salmonella* Não Tifóide em águas, evidencia a circulação desse patógeno no ambiente, em animais e/ou entre as populações. No presente estudo, a positividade de *Salmonella* Não Tifóide em amostras de água do rio Pardo, pode ser justificada especialmente pela lavagem do solo pelas águas da chuva (fontes difusas). Por aparecer somente nos Pontos 4 e 5, pode também ser decorrente de lançamentos de esgotos *in natura* e de cargas remanescentes de ETEs.

Estudos demonstram a divergência dos achados de *Salmonella* Não Tifóide em águas superficiais de diferentes países. Rajabi et al. (2011) examinaram a distribuição de *Salmonella*

enterica (Não Tifóide) em água superficial do rio Suwannee, México, utilizado para a irrigação regional e atividades recreativas, sendo que os achados revelaram 96% de amostras positivas para a bactéria. Hsu et al. (2011) estudaram a ocorrência de *Salmonella* em cinco rios da cidade de Taiwan (China), e os resultados apontaram 8,6% das amostras positivas. Em um estudo sobre a ocorrência de *Salmonella* em águas superficiais de três rios localizados no México, América Central, os autores evidenciaram 45% das amostras positivas com ampla variação das suas concentrações (<300 NMP/L a 46000 NMP/L) (KIMENEZ; CHAIDEZ, 2012). A divergência dos resultados encontrados pelos diferentes autores reflete a influencia das fontes de contaminação das águas superficiais, como descarga de esgoto, escoamento de águas pluviais, presença de mata ciliar, vida selvagem ao entorno, clima, pressão antrópica e práticas agrícolas (MC EGAN et al., 2014).

5.2.3 *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. na água do rio Pardo

A Tabela 13 apresenta a concentração de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* spp. na água do rio Pardo nos seis pontos de coleta no período chuvoso e seco.

Tabela 13- Concentração de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* spp. na água do rio Pardo nos seis pontos de coleta no período chuvoso e seco, e médias dos pontos. 2015-2016.

Pontos	Cryptosporidium (oocistos/L)							
	Período Chuvoso			Período Seco			Média	Média Redução 2 log*
	Primeira coleta	Segunda coleta	Terceira coleta	Primeira coleta	Segunda coleta	Terceira coleta		
1	<0,1	0,2	<0,1	<0,1	<0,1	0,3	0,12	0,0012
2	<0,1	<0,1	0,2	<0,1	<0,1	<0,1	0,08	0,0008
3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	-	-
4	<0,1	<0,1	<0,1	0,3	<0,1	<0,1	0,09	0,0009
5	<0,1	<0,1	<0,1	0,4	<0,1	<0,1	0,11	0,0011
6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	-	-
Pontos	Giardia spp. (cistos/L)							
	Período Chuvoso			Período Seco			Média	Média Redução 3 log*
	Primeira coleta	Segunda coleta	Terceira coleta	Primeira coleta	Segunda coleta	Terceira coleta		
1	<0,1	0,8	<0,1	<0,1	<0,1	3,2	0,70	0,0007
2	<0,1	<0,1	0,6	<0,1	<0,1	<0,1	0,14	0,00014
3	<0,1	<0,1	0,6	<0,1	<0,1	<0,1	0,14	0,00014
4	0,2	4,4	3,2	2,7	1,0	2,4	2,32	0,00232
5	<0,1	1,2	1,2	1,4	0,4	2,2	1,08	0,00108
6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	-	-

*Média usada para a AQRM na água do rio Pardo destinada ao abastecimento público levando em consideração a redução de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. no processo convencional de tratamento da água.

De acordo com os resultados, 13,9% das amostras (Pontos 1, 2, 4 e 5) apresentaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. acima do limite de detecção ($\geq 0,1$), sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos de chuva e seca ($p > 0,05$). As concentrações encontradas foram baixas, variando de $<0,1$ a 0,4 oocistos/L (Tabela 12). Em relação à *Giardia* spp., 41,7% das amostras (Pontos 1, 2, 3, 4 e 5) apresentaram concentração de cistos acima do limite de detecção ($\geq 0,1$), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os períodos chuvoso e seco ($p > 0,05$). As concentrações encontradas foram maiores que as de *Cryptosporidium* spp. e variaram de $<0,1$ à 4,4 cistos/L (Tabela 13).

Julio et al. (2012) analisaram patógenos entéricos em rios portugueses utilizados para recreação, e assim como no presente estudo, não encontraram diferenças estatisticamente significantes de número de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. entre os períodos de chuva e de seca ($p > 0,05$). Entretanto, pesquisas tem demonstrado a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. associada a eventos de chuva (ROSADO-GARCÍA et al., 2017).

A terceira coleta do período chuvoso, foi a campanha com maior número de pontos que apresentaram cistos de *Giardia* spp., sendo relevante mencionar que foi o mês de coleta com maior índice pluviométrico (Figura 8). A explicação provável para este fato é que as águas das chuvas provocam a ressuspensão de (oo)cistos, que ficam agregados à matéria orgânica particulada no leito do rio, aumentando assim a concentração destes na água (NETO et al., 2010).

Os Pontos 4 e 5 foram os que apresentaram maiores concentrações de *Giardia* spp. O único ponto que não foi detectado (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e/ou *Giardia* spp. em todas as coletas, foi o Ponto 6, que corresponde à confluência do rio Pardo com o rio Grande (fz) (Tabela 13). Este ponto é o que apresenta a maior extensão do rio Pardo (MACHADO et al., 2015), com grande volume de água, o que pode contribuir para a diluição de (oo)cistos no rio dificultando sua detecção, ou ainda, facilitar os processos naturais de autodepuração.

A presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água do rio Pardo, indica a contribuição de esgotos domésticos que podem ser decorrentes de lançamentos de esgotos *in natura*, bem como de cargas remanescentes de ETEs (Pontos 4 e 5). O recebimento de cargas difusas em virtude da lavagem do solo pelas águas das chuvas, também pode ser evidenciado, visto que, os pontos estudados são próximos à regiões de pastagens (IBGE, 2017). Ademais, nestes trechos foram evidenciados desmatamento da mata ciliar e vegetação ao entorno constituída por espécies exóticas (MACHADO et al., 2015). A presença de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas superficiais e a sua relação com

as áreas de preservação permanente já foi demonstrada em estudo de Toledo et al. (2017).

Evidências científicas mostram a presença de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em diversas fontes de água superficiais usadas para consumo humano e recreação de contato primário (AZMAN; INIT; WAN YUSOFF, 2009; EHSAN et al., 2015; FREGONESI et al., 2012; ONICHANDRAN et al., 2014; ROSADO-GARCÍA et al., 2017).

As legislações pertinentes à temática vêm apresentando avanços recentes com a inclusão da recomendação para o monitoramento de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em associação com outros micro-organismos indicadores. Nessa perspectiva, a Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011b) estabelece que os mananciais superficiais utilizados para abastecimento público sejam avaliados quanto às concentrações desses parasitas quando a média geométrica das concentrações de *Escherichia coli* no ponto de captação tenha apresentado valores superiores a 1000 UFC/100 mL no período de um ano, com amostras mensais (BRASIL, 2011b; CETESB, 2017). Dessa forma, os resultados do presente estudo, se comparados à legislação para o Ponto 3, que é o provável local para captação de água no município de Ribeirão Preto com finalidade de abastecimento público, a média geométrica das concentrações de *E. coli* não ultrapassaram 1000 UFC/100 mL (Tabela 13) e dessa forma, as análises de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. neste ponto não seriam necessárias. A Tabela 13 mostra que não foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras coletadas neste local. Entretanto, em uma das coletas (terceira do período chuvoso) foram detectados 0,6 cistos/L de *Giardia* spp., que correspondeu ao período com maior índice pluviométrico, mostrando a importância de monitoramentos mais contínuos para a verificação da presença destes parasitas, especialmente em eventos de chuva.

5.3 Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM)

Para a AQRM foram utilizados os resultados dos valores médios de cada ponto do estudo, sem considerar a sazonalidade, levando em conta que não houve diferença estatisticamente significativa da concentração de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., nos períodos de chuva e seca.

5.3.1 Estimativa de risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. devido à ingestão da água do rio Pardo usada para abastecimento público municipal

A Tabela 14 apresenta a probabilidade anual de infecção e doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para crianças e adultos devido à ingestão da água do rio Pardo. Para a estimativa de risco, foi considerado a redução de 2 log e 3 log nos valores médios de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. de *Giardia* spp., respectivamente (Tabela 12). No Brasil não existem referências para valores toleráveis de risco anual de infecção, e dessa forma, os poucos estudos de AQRM conduzidos se baseiam em limites estabelecidos por agências internacionais, como a USEPA. Assim, o risco anual de infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para crianças e adultos que ingerem água de abastecimento público, foram comparados com o valor tolerável pela USEPA, de 1×10^{-4} , ou seja, a probabilidade de infecção não deve ser maior do que 1 caso em cada 10.000 pessoas expostas (USEPA, 1998).

Tabela 14- Probabilidade anual de infecção (Pa) e de doença (Pd) por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em crianças e adultos devido à ingestão da água do rio Pardo, após tratamento convencional da água. 2015-2016.

Pontos	<i>Cryptosporidium</i> spp (oocistos/L)			
	Crianças (< 5 anos)		Adultos (> 21 anos)	
	Pa	Pd	Pa	Pd
1	$8,09 \times 10^{-4}$	$3,15 \times 10^{-4}$	$2,75 \times 10^{-3}$	$1,07 \times 10^{-3}$
2	$5,37 \times 10^{-4}$	$2,09 \times 10^{-4}$	$1,83 \times 10^{-3}$	$7,14 \times 10^{-4}$
3	-	-	-	-
4	$6,02 \times 10^{-4}$	$2,35 \times 10^{-4}$	$2,07 \times 10^{-3}$	$8,06 \times 10^{-4}$
5	$7,41 \times 10^{-4}$	$2,89 \times 10^{-4}$	$2,52 \times 10^{-3}$	$9,84 \times 10^{-4}$
6	-	-	-	-
Pontos	<i>Giardia</i> spp. (cistos/L)			
	Crianças (< 5 anos)		Adultos (> 21 anos)	
	Pa	Pd	Pa	Pd
1	$2,20 \times 10^{-3}$	$1,10 \times 10^{-3}$	$7,56 \times 10^{-3}$	$3,78 \times 10^{-3}$
2	$4,45 \times 10^{-4}$	$2,22 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-3}$	$7,61 \times 10^{-4}$
3	$4,45 \times 10^{-4}$	$2,22 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-3}$	$7,61 \times 10^{-4}$
4	$7,23 \times 10^{-3}$	$3,62 \times 10^{-3}$	$2,48 \times 10^{-2}$	$1,24 \times 10^{-2}$
5	$3,42 \times 10^{-3}$	$1,71 \times 10^{-3}$	$1,16 \times 10^{-2}$	$5,81 \times 10^{-3}$
6	-	-	-	-

A probabilidade anual de infecção para *Cryptosporidium* spp. variou de $5,37 \times 10^{-4}$ a $8,09 \times 10^{-4}$ para crianças e de $1,83 \times 10^{-3}$ a $2,75 \times 10^{-3}$ para adultos. A probabilidade anual de infecção para *Giardia* spp. foi de $4,45 \times 10^{-4}$ a $7,23 \times 10^{-3}$ para crianças e de $1,52 \times 10^{-3}$ a $2,48 \times 10^{-2}$ para adultos. O risco anual de infecção (média) por ambos os protozoários para crianças e adultos foi superior ao risco anual tolerável pela USEPA (1×10^{-4}) em todos os pontos de

amostragem, exceto nos Pontos 3 e 6 para *Cryptosporidium* spp. e no Ponto 6 para *Giardia* spp., devido a ausência de amostras positivas (Tabela 14).

A probabilidade anual de infecção para *Cryptosporidium* spp. foi maior para adultos ($1,83 \times 10^{-3}$ a $2,75 \times 10^{-3}$) do que para crianças ($5,37 \times 10^{-4}$ a $8,09 \times 10^{-4}$), em decorrência do maior consumo de água ao dia. Sato et al. (2013) realizaram uma pesquisa de avaliação de risco para crianças e adultos devido à exposição por *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais utilizadas como fonte de abastecimento público, em quatro regiões densamente urbanizadas do Estado de São Paulo, Brasil. A concentração de (oo)cistos variou de $<0,1$ a 6 oocistos/L, e as taxas de consumo de água para crianças e adultos foram de 0,44 L e 1,5 L, respectivamente. Os resultados foram semelhantes aos obtidos no presente estudo, apresentando risco de infecção para *Cryptosporidium* spp. de $1,5 \times 10^{-3}$ a $2,9 \times 10^{-3}$ para adultos, e de 4×10^{-4} a 8×10^{-4} para as crianças, sendo que em ambos os casos, o risco anual calculado ultrapassou o que é definido como tolerável pela USEPA (1×10^{-4}).

Apesar do pequeno número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. encontradas nas amostras analisadas e da detecção em menor número amostral, os resultados devem ser consideradas relevantes para o cálculo de risco, devido à alta virulência, infectividade e resistência ambiental desse parasita (SATO et al., 2013).

HAAS et al. (1996) utilizaram a avaliação de risco microbiológico para determinar a concentração máxima de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em águas de consumo (tratada) considerando que o risco anual de infecção não seja superior a 1×10^{-4} . Os autores concluíram que a concentração de oocistos de *Cryptosporidium parvum* deve ser igual ou inferior a 0,00003 oocistos/L. Esses achados corroboram com os resultados obtidos nas amostras analisadas, em que a concentração de oocistos média estimada na água do rio Pardo após tratamento convencional (redução de 2 log), apresentou valores superiores (0,0008 oocistos/L a 0,0012 oocistos/L). A probabilidade anual de infecção, portanto, ultrapassou o valor tolerável pela USEPA.

A probabilidade média de infecção por *Giardia* spp. foi maior para adultos ($1,52 \times 10^{-3}$ a $2,48 \times 10^{-2}$) do que para crianças ($4,45 \times 10^{-4}$ a $7,23 \times 10^{-3}$) (Tabela 14). Resultados semelhantes foram obtidos por Sato et al. (2013), que estimaram o risco de infecção por *Giardia* spp. devido ao consumo de águas superficiais utilizadas como fonte de abastecimento público, em que a probabilidade de infecção por *Giardia* spp. variou de 8×10^{-4} a 7×10^{-3} para crianças e de $2,9 \times 10^{-3}$ a $2,47 \times 10^{-2}$ para adultos.

Razzolini et al. (2016) analisaram o risco de infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. de amostras de água tratada, coletadas em uma Estação de Tratamento de Água

da região metropolitana do sudeste do Brasil. Para análise de risco, foi utilizado modelo exponencial de dose-resposta e diferentes taxas de consumo para crianças (<5 anos) e adultos (>21). A concentração de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. variou de 0 a 0,01 oocistos/L e de *Giardia* spp. de 0- 0,06 cistos/L. O risco anual de infecção por *Cryptosporidium* spp. foi de $1,2 \times 10^{-3}$ para crianças e de $4,0 \times 10^{-3}$ para adultos, enquanto que o risco anual médio de infecção por *Giardia* spp. foi de $2,2 \times 10^{-2}$ para crianças e $7,1 \times 10^{-2}$ para adultos. Esses achados apresentaram probabilidade de infecção maior do que os resultados do presente estudo, o que pode ser devido a maior concentração de (oo)cistos encontrados nas amostras de água tratada.

Xião et al. (2013) analisaram amostras de água superficial do Reservatório das Três Gargantas, China, utilizada como fonte de abastecimento público e estimaram o risco anual de infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., levando em consideração o tratamento da água antes do consumo e o consumo diário de aproximadamente 1L. A média da concentração de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. encontrada nas amostras foi de 0,1347 oocistos/L e de 0,1095 cistos/L, respectivamente. A probabilidade de infecção anual por *Cryptosporidium* spp. foi de $1,3 \times 10^{-1}$ e por *Giardia* spp. foi de $2,35 \times 10^{-2}$, valores de risco superiores aos estimados no presente estudo.

Por outro lado, Ryu e Abbaszadegan (2008) realizaram avaliação quantitativa de risco por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas superficiais destinadas ao abastecimento público no Arizona, EUA, considerando a taxa de ingestão de 2L de água ao dia e a remoção de 3 log para ambos os protozoários durante o processo de tratamento da água. A concentração de *Cryptosporidium* spp. foi de 0,002 a 0,003 oocistos/L e de *Giardia* spp. de 0,027 a 0,058 cistos/L. A probabilidade anual de infecção para *Cryptosporidium* spp. foi menor do que os resultados do presente estudo, estando abaixo do limite tolerável pela USEPA. Para *Giardia* spp. a probabilidade anual de infecção variou de $2,66 \times 10^{-4}$ a $5,70 \times 10^{-4}$, valores superiores ao limite tolerável pela USEPA e menores do que os resultados do presente estudo. No estudo de Ryu e Abbaszadegan (2008) foram levados em conta na AQRM, apenas uma fração dos (oo)cistos encontrados em água, considerando que nem todos são viáveis, o que pode ter levado a uma menor estimativa de risco além da redução de 3 log para *Cryptosporidium* spp.

No Brasil, ainda não foi estabelecido valor tolerável de risco para casos de gastroenterites associados ao consumo de água de abastecimento público. Os Pontos 4 e 5 foram os que apresentaram um maior risco de doença (giardíase), sendo $1,24 \times 10^{-2}$ e $5,81 \times 10^{-3}$, respectivamente (Tabela 14).

Valores maiores de estimativa de risco de criptosporidiose e giardíase em pessoas que consomem águas de abastecimento público têm sido relatados na literatura. Balderrama-Carmona et al. (2015) avaliaram os riscos de doenças por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em pessoas que consomem água potável de um poço comunitário no México, em situação de vulnerabilidade. Para abordagem da AQRM, utilizaram modelo exponencial de dose-resposta, considerando a ingestão média de 1,46 L/ dia de água. Os resultados indicaram riscos anuais de 99:100 (0,99) para criptosporidiose e 1:1 (1,0) para a giardíase. Em estudo de Xião et al. (2013), a probabilidade de doença por *Cryptosporidium* spp. foi de $6,13 \times 10^{-2}$ e por *Giardia* spp. de $7,05 \times 10^{-3}$ para população que consome água superficial do Reservatório das Três Gargantas na China.

À jusante do Ponto 1 e à montante do Ponto 2, o rio Pardo é utilizado como fonte de abastecimento público no município de São José do Rio Pardo. Ambos os pontos apresentaram (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp. e os cálculos evidenciaram probabilidade anual de infecção maior que limite tolerável pela USEPA (1×10^{-4}), para crianças e adultos que consomem a água do rio Pardo após tratamento convencional. Apesar das análises do presente estudo não terem sido realizadas em amostras retiradas diretamente dos locais de captação da água (ETAs), é provável a presença desses parasitas entre os Pontos 1 e 2, visto que há contaminações pontuais (despejo de esgoto) e difusas na região. Perante esta realidade, torna-se relevante priorizar os recursos para implantação de estações de tratamento de esgotos em municípios que não as possuem e naqueles que necessitam de ampliação e complementação, a fim de prevenir as doenças de veiculação hídrica em populações que precisam da água do rio Pardo para consumo. Além disso, mostram a necessidade de avaliação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. diretamente nos pontos de captação de água, com a finalidade de adequar os processos de tratamento de água para a redução efetiva de protozoários patogênicos, se houver necessidade.

O Ponto 3 é o local previsto para a captação de água do município de Ribeirão Preto para abastecimento público, em virtude do rebaixamento do Aquífero Guarani. A questão da utilização da água do rio Pardo ainda gera controvérsias, embora a Agência Nacional das Águas e especialistas alertam para esta necessidade (ANA, 2017; A CIDADE, 2017). Em 2013, a ANA concedeu a outorga preventiva para a captação da água do rio Pardo, apresentando as coordenadas locais para a construção de uma Estação de Tratamento de Água, na zona leste do município (Ponto 3). Neste local, não foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em nenhuma das coletas realizadas. Com respeito a *Giardia* spp., no entanto, na terceira coleta do período chuvoso, que apresentou um maior índice

pluviométrico, foram encontrados 0,6 cistos/L de *Giardia* spp., o que resultou em um risco superior a 1×10^{-4} para crianças e adultos. Apesar das limitações do número amostral, estes dados podem fornecer subsídios para as autoridades gestoras municipais bem como para o Comitê de Bacia Hidrográfica do Rio Pardo (UGRHI 4), no que diz respeito à captação e tratamento da água do rio Pardo para fins de abastecimento público no município de Ribeirão Preto, contemplando períodos de chuva e seca e de seleção de tecnologias adequadas para o tratamento da água além da implementação de barreiras de proteção em eventos de chuvas fortes.

A Legislação Americana (USEPA, 2006b), que possui forte enfoque na tratabilidade da água, estabelece critérios de remoção de *Cryptosporidium* spp. nos sistemas de abastecimento de água, baseados em faixas de concentração média de oocistos obtidas nos mananciais superficiais (0,075 oocistos/L / $\geq 0,075$ a $<1,0$ oocistos/L / $\geq 1,0$ a $<3,0$ oocistos /L/ $\geq 3,0$ oocistos/L). Esses critérios foram desenvolvidos com base em estudos de AQRM, sendo o risco de infecção anual tolerável de 1×10^{-4} . Assim, as águas dos Pontos 1, 2, 4 e 5 que apresentaram concentração média de *Cryptosporidium* spp. na faixa de 0,075 a 1 oocisto/L, deveriam passar por processos de tratamento que garantissem remoção superior a 4,0 log.

O processo convencional de tratamento de água envolvendo as etapas de coagulação, floculação, sedimentação e filtração, seguido de desinfecção com cloro, é o mais utilizado no Brasil. Este tipo de tratamento pode atingir eficiência de remoção de 2,0 log (99%) para *Cryptosporidium* spp. e de 3,0 log (99,9%) para *Giardia* spp. nas concentrações e nos tempos de contato de cloro aplicáveis ao tratamento (HASS et al., 1996; SATO et al., 2013). Apesar das altas taxas de remoção, estas não são totalmente efetivas, considerando a baixa dose infecciosa desses parasitas. Dessa forma, novos estudos estão sendo desenvolvidos com a finalidade de propor tecnologias que promovam a remoção e/ou inativação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. para que haja um tratamento seguro da água destinada ao abastecimento público. Dentre essas tecnologias destacam-se as técnicas de filtração com eficiência aumentada nos sistemas de tratamento de água, a fim de assegurar uma adequada retenção na passagem dos referidos protozoários. Nesse mesmo contexto, a desinfecção da água por luz UV e o ozônio são vistos por pesquisadores como alternativas eficazes para inativar protozoários (BETANCOURT; ROSE, 2004; PEREIRA et al., 2008, WHO, 2016).

Os Pontos 4 e 5 foram os locais que apresentaram maior risco de infecção e de doença para *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp. em decorrência da maior concentração de (oo)cistos

(Tabela 14). Apesar de serem locais improváveis para captação de água destinada ao abastecimento público municipal, cabe ressaltar que existem inúmeras áreas de lazer, ranchos, chácaras e sítios próximos a esses pontos, o que pode favorecer a utilização desta água como fonte de consumo para população ao entorno. Assim, é relevante trabalhar na sensibilização da população para práticas locais de processo de inativação/remoção de parasitas, como a fervura da água antes do consumo e/ou utilização de filtros específicos.

5.3.2 Estimativa de risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para crianças e adultos devido à ingestão acidental da água do rio Pardo usada para recreação de contato primário

A Tabela 15 apresenta a probabilidade diária de infecção, a probabilidade anual de infecção e a probabilidade anual de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em crianças e adultos (homens e mulheres) devido à ingestão acidental da água do rio Pardo em atividades de recreação de contato primário.

No Brasil, os dados de AQRM são limitados e ainda não foram estabelecidos valores toleráveis de risco de infecção e doenças (gastroenterites) associados à atividades de recreação de contato primário. Ademais, as doenças causadas por águas de recreação não são de notificação compulsória, exceto quando se manifestam por surtos, o que dificulta avaliar o número real de casos.

O cálculo da estimativa de risco de infecção, diário e anual, foi incluído, para comparar os resultados com estudos nacionais e internacionais, considerando diferentes cenários. Entretanto, para a probabilidade de doenças, os resultados do presente estudo, foram comparados com o risco tolerável referenciado pela USEPA (2012a) de $3,6 \times 10^{-2}$ casos de doenças gastrointestinais em banhistas. Este valor significa que são toleráveis 36 casos de doenças gastrointestinais a cada 1.000 exposições à água de recreação de contato primário.

A probabilidade diária de infecção por *Cryptosporidium* spp. foi de $1,28 \times 10^{-5}$ a $1,92 \times 10^{-5}$ para crianças, de $9,8 \times 10^{-6}$ a $1,46 \times 10^{-5}$ para adultos/homens e de $7,07 \times 10^{-6}$ a $1,06 \times 10^{-5}$ para adultos/mulheres. A probabilidade diária de infecção por *Giardia* spp. foi maior para todas as populações do estudo e variou de $1,63 \times 10^{-4}$ a $2,7 \times 10^{-3}$ para crianças, de $8,09 \times 10^{-5}$ a $1,33 \times 10^{-3}$ para adultos/homens e de $5,4 \times 10^{-5}$ a $8,89 \times 10^{-4}$ para adultos/mulheres (Tabela 15). As estimativas de risco de infecção foram maiores para crianças, seguidos de adultos/homens e adultos/mulheres, sendo proporcional ao volume de água ingerido e à duração da exposição.

Schets et al. (2011) utilizaram modelo de dose-resposta hipergeométrico, por meio da abordagem da AQRM para estimar o risco de infecção diário por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para crianças e adultos expostos às águas recreacionais da Holanda, sendo que os dados de exposição foram os mesmos do presente estudo. A probabilidade de infecção por *Cryptosporidium* spp. foi de 9×10^{-5} a $4,9 \times 10^{-4}$ para crianças, de $1,2 \times 10^{-4}$ a $3,7 \times 10^{-4}$ para adultos/homens e de $8,1 \times 10^{-5}$ a $2,4 \times 10^{-4}$ para adultos/mulheres. A probabilidade de infecção por *Giardia* spp. variou de $7,6 \times 10^{-6}$ a 1×10^{-4} para crianças, de $6,9 \times 10^{-6}$ a $7,9 \times 10^{-5}$ para adultos/homens e de $3,6 \times 10^{-6}$ a $5,1 \times 10^{-5}$ para adultos/mulheres. Ao contrário do presente estudo, o risco de infecção por *Cryptosporidium* spp. foi maior do que para *Giardia* spp. Porém, corroboraram que as crianças se apresentaram como o grupo populacional mais vulnerável, devido ao maior volume de água ingerido durante as atividades de recreação e ao maior tempo de exposição.

Ehsum et al. (2015) investigaram a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em lagos recreativos na Bélgica e estimaram o risco de infecção diário associados à natação, utilizando modelo exponencial de dose-resposta. Os dados de exposição foram os mesmos do presente estudo, baseados na pesquisa de Schets et al. (2011). As concentrações de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram relativamente baixas (0,07-0,6 oocistos/L e 0,23-0,7 cistos/L). O risco médio de infecção para cada evento de exposição por *Cryptosporidium* spp. foi de $5,74 \times 10^{-5}$ para crianças, $4,13 \times 10^{-5}$ para adultos/homens e $2,79 \times 10^{-5}$ para adultos/mulheres, resultados semelhantes ao presente estudo. Para *Giardia* spp., o risco médio foi de $1,46 \times 10^{-4}$ para crianças, $1,08 \times 10^{-4}$ para adultos/homens e $7,04 \times 10^{-5}$ para adultos/mulheres, que representou um risco de infecção menor do os resultados do presente estudo, provavelmente devido à menor concentração de cistos encontrados nos lagos da Bélgica, em relação às águas do rio Pardo. Entretanto, em ambos, os resultados da

estimativa de risco foram maiores para crianças, seguido de adultos/homens e adultos/mulheres, devido ao volume de água ingerido e a duração da exposição.

A probabilidade anual de infecção para *Cryptosporidium* spp. em todos os pontos foi mais elevada para crianças ($7,81 \times 10^{-4}$ a $1,17 \times 10^{-3}$), seguido de adultos/homens ($3,42 \times 10^{-4}$ a $5,14 \times 10^{-4}$) e adultos/mulheres ($4,54 \times 10^{-5}$ a $6,86 \times 10^{-5}$). Da mesma forma, para *Giardia* spp. a probabilidade anual de infecção foi maior para crianças ($6,45 \times 10^{-3}$ a $9,95 \times 10^{-2}$), adultos/homens ($2,81 \times 10^{-3}$ a $4,49 \times 10^{-2}$) e adultos/mulheres ($1,88 \times 10^{-3}$ a $3,01 \times 10^{-2}$), respectivamente (Tabela 15).

Jacob et al. (2015) quantificaram (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. de três grandes rios recreativos da França e estimaram o risco de infecção anual, através de modelo exponencial de dose-resposta, levando em consideração que crianças e adultos frequentam os rios 5 vezes ao ano. Os volumes de ingestão médio considerados, foram semelhantes aos do presente estudo, sendo de 16 mL para adultos e 37 mL para crianças, e a duração da exposição foi de 45 minutos, de acordo com Dufour et al., (2006). Os resultados apontaram risco anual de infecção por *Cryptosporidium* spp. para crianças variando de $<1 \times 10^{-5}$ a $2,3 \times 10^{-4}$ e para adultos de $<1 \times 10^{-5}$ a 1×10^{-4} . O risco anual de infecção por *Giardia* spp. foi $1,47 \times 10^{-3}$ a $2,21 \times 10^{-3}$ para crianças e de $6,4 \times 10^{-4}$ a $9,6 \times 10^{-4}$ para adultos. Os resultados obtidos por Jacob et al. (2015) foram menores do que os encontrados no presente estudo, o que pode ser devido a menor frequência de exposição adotada.

A probabilidade anual de doença por *Cryptosporidium* spp. foi maior para crianças ($3,05 \times 10^{-4}$ a $4,57 \times 10^{-4}$), seguido de adultos/homens ($1,33 \times 10^{-4}$ a $2,00 \times 10^{-4}$) e adultos/mulheres ($1,77 \times 10^{-5}$ a $2,67 \times 10^{-5}$). Da mesma maneira, para probabilidade de doenças por *Giardia* spp. os valores foram maiores para crianças ($3,22 \times 10^{-3}$ a $4,97 \times 10^{-2}$) seguido de adultos/homens ($1,41 \times 10^{-3}$ e $2,24 \times 10^{-2}$) e adultos/mulheres ($9,40 \times 10^{-4}$ a $1,51 \times 10^{-2}$), respectivamente (Tabela 15). A probabilidade de doenças causadas por *Cryptosporidium* spp., estiveram abaixo do limite tolerável pela USEPA ($3,6 \times 10^{-2}$) para todas as populações estudadas. Os baixos valores de risco de infecção gerados pelo modelo decorrem das baixas concentrações de oocistos presentes no rio Pardo em relação ao volume de água que é ingerido acidentalmente. A probabilidade média de doenças por *Giardia* spp. esteve acima do valor tolerável pela USEPA apenas no Ponto 4 ($4,97 \times 10^{-2}$) para crianças. Os demais pontos apresentaram risco de doença abaixo de $3,6 \times 10^{-2}$, para crianças e adultos. O clima tropical favorece a busca por fontes de água doce para a prática de atividades de recreação, especialmente pelas pessoas que moram longe das áreas costeiras. Próximo ao Ponto 4, o rio Pardo é utilizado para recreação de contato primário e dessa forma, seria

necessário alertar os banhistas a permanecerem pouco tempo no rio, bem como a praticarem atividades recreacionais em locais mais afastados do clube de recreação, que recebe efluente da ETE- Caiçara do município de Ribeirão Preto, localizada a uma distância de 2 Km (CETESB, 2017; GOOGLE EARTH, 2017). Cabe ressaltar que os dados de exposição utilizados no presente estudo foram referenciados com base na pesquisa de Schets et al. (2011), para a população da Alemanha. Na literatura há poucos estudos de AQRM voltados para a exposição de crianças e adultos em águas doces devido à recreação de contato primário. Assim, as estimativas de risco podem ser maiores ou menores, de acordo com as práticas das populações locais, alertando para a necessidade de estudos relacionados a esta temática no Brasil. Neste contexto, Pinto (2016) estimou o risco de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em crianças (<18 anos) e adultos (>18 anos) após exposição à águas recreacionais costeiras, no Brasil, por meio da AQRM. Foi utilizado o modelo exponencial de dose-resposta que agregou informações de dados de exposição referenciados da literatura internacional (taxas de ingestão e duração da exposição), e a frequência de exposição foi assumida de acordo com os hábitos dos banhistas no estado de São Paulo. Assim, foi considerada a ingestão de água de 49 mL a 210 mL para crianças e de 21 mL a 71 mL para adultos, a duração da exposição foi de 60 a 180 minutos para crianças e de 25 a 60 minutos para adultos, e a frequência de exposição foi de 6 a 76 dias ao ano, para ambos. Os resultados de AQRM apontaram probabilidade média de doença por *Cryptosporidium* spp. abaixo de $3,6 \times 10^{-2}$ em todos os locais, para adultos e crianças, enquanto que probabilidade média de doença por *Giardia* spp. em alguns locais apontaram valores maiores do que o tolerável pela USEPA. Apesar dos diferentes cenários e em menor número amostral, os resultados foram semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Betancourt et al., 2014 avaliaram o risco de doenças gastrointestinais (criptosporidiose e giardíase) devido a atividades de recreação de contato primário em águas marinhas tropicais localizadas na costa central da Venezuela. Para os cálculos de estimativa de risco foram utilizados modelos exponenciais de dose-resposta, volume de ingestão de 100 mL e duração da exposição de 1 hora, com diferentes parâmetros e distribuições para adultos e crianças. Também foram considerados a porcentagem de (oo)cistos viáveis e os resultados dos métodos de recuperação. Para estimativa de doenças por *Cryptosporidium* e *Girdia* foi assumido que 39% e 50% de indivíduos infectados ficaram doentes, respectivamente (Haas et al., 1999). Os resultados mostraram que a probabilidade média de criptosporidiose em crianças foi de $2,2 \times 10^{-3}$ e em adultos de $9,3 \times 10^{-4}$, valores maiores do que os encontrados no presente estudo. A probabilidade média de giardíase em crianças foi de $1,1 \times 10^{-2}$ e em adultos foi de $5,5 \times 10^{-3}$,

sendo que em alguns pontos do presente estudo, os resultados foram semelhantes a estes (Ponto 1 para crianças e Pontos 1 e 5 para adultos) (Tabela 15). Cabe ressaltar que apesar dos diferentes cenários abordados na AQRM, em ambos os estudos, as estimativas de risco de doenças foram mais altas para *Giardia* spp. do que para *Cryptosporidium* spp., provavelmente devido às mais altas concentrações de cistos encontradas nas amostras. Todos os resultados de estimativa de risco de doenças no trabalho de Betancourt et al. (2014) estiveram abaixo do limite tolerável pela USEPA (2012b) de $3,6 \times 10^{-2}$.

5.4 Limitações do estudo e considerações finais

O monitoramento ambiental de *Salmonella* Não Tifóide, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. é relevante no contexto da saúde pública e ambiental, entretanto, precisa ser complementado por dados de incidência e prevalência das doenças de veiculação hídrica relacionadas a esses bioagentes, apontando para a intensificação de ações de vigilância em saúde no Brasil.

Para a detecção e quantificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água, o Método 1623 da USEPA (2005) e sua versão atualizada 1623.1 (2012), são reconhecidos internacionalmente, incluindo as fases de concentração, eluição, separação imunomagnética, dissociação térmica e microscopia de imunofluorescência. Sabe-se, porém, que para a implementação destes métodos, é requerida vasta experiência por parte dos analistas e investimentos econômicos consideráveis, levando em conta o alto custo dos insumos e dos equipamentos utilizados, sendo assim, inacessível para muitos laboratórios certificadores da água para consumo humano e recreacional, bem como para diversos centros de pesquisa.

No ano de 2009, o Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental (LEPA-EERP/USP), implementou o Método 1623 da USEPA (2005) e desde então vem avançando nos estudos de monitoramento de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em diferentes matrizes ambientais. Entretanto, devido à crise econômica que atinge o Brasil, a desvalorização da moeda e consequente aumento do valor dos insumos importados, o número amostral reduzido (36) foi considerado uma limitação para o presente estudo, podendo representar o rio Pardo apenas para o cenário proposto.

Como desvantagem analítica, este método não permite a identificação de espécies e/ou genótipos encontrados nas amostras de água, além de não determinar se os (oo)cistos são viáveis e infecciosos para humanos. Assim, os riscos de infecção e de doença reportados no presente estudo, podem estar superestimados, uma vez que todos os (oo)cistos foram

considerados viáveis e infecciosos para humanos. Para minimizar esta superestimação, as concentrações de (oo)cistos não foram ajustadas de acordo com as taxas de recuperação obtidas no método analítico (67,5% para *Cryptosporidium* spp. e 61,3% para *Giardia* spp.), conforme sugerido por Razzolini et al. (2016).

No Brasil, existem lacunas quanto aos dados de exposição em águas doces utilizadas para recreação de contato primário, como, volume de água ingerido, duração e frequência da exposição. O clima tropical favorece a busca por fontes de água doce para a prática de atividades de recreação, especialmente em pessoas que moram longe das áreas costeiras, fato que reforça a necessidade da condução de estudos de exposição voltados para a realidade brasileira.

Apesar das limitações existentes, a AQRM, quando leva em conta as incertezas de cada parâmetro analisado, mostra-se como uma ferramenta útil na criação de normas e padrões, de acordo com a realidade de cada país, oferecendo subsídios que contribuam com ações mitigadoras e de proteção à saúde humana e ambiental.

Nesse sentido, os resultados obtidos no presente estudo podem subsidiar na tomada de decisões para as autoridades gestoras municipais e regionais, bem como para o Comitê da Bacia Hidrográfica do rio Pardo (UGRHI 4), na definição de ações prioritárias e aplicação de recursos financeiros, a fim de proteger a saúde da população quanto às doenças de veiculação hídrica, com foco nos patógenos re-emergentes (*Salmonella* Não Tifóide, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÃO

6.1 A avaliação de bioagentes na água do rio Pardo permitiu concluir que:

- A presença de *Escherichia coli*, *Salmonella* Não Tifóide, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água do rio Pardo, pode estar relacionada à poluição das águas por fontes pontuais (esgoto *in natura* e tratado) e por fontes difusas (escoamento superficial).
- No período de chuvas, houve uma maior concentração de bioagentes na água do rio Pardo, o que reflete a influência das cargas difusas. Assim, o escoamento superficial e a remoção da mata ciliar podem estar contribuindo para a contaminação microbiológica das águas do rio Pardo.
- A contaminação da água do rio Pardo por bioagentes, de um modo geral, reflete a necessidade de priorizar os recursos para implantação de estações de tratamento de esgotos em municípios que não as possuem e naqueles que necessitam de ampliação e complementação, a fim de prevenir as doenças de veiculação hídrica em populações que utilizam a água do rio Pardo para abastecimento público e para recreação de contato primário.

6.2 A estimativa de risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para o uso da água do rio Pardo como fonte de abastecimento público, permitiu concluir que:

- Os Pontos 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram resultados de probabilidade de infecção por *Cryptosporidium* spp. e/ou *Giardia* spp. acima do valor tolerável pela USEPA, para o cenário estabelecido.
- Os resultados mostram a necessidade de avaliação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. diretamente nos pontos de captação de água, como medida de proteção à saúde da população, com a finalidade de adequar os processos de tratamento de água para a redução efetiva de protozoários patogênicos, se houver necessidade.

6.3 A estimativas de risco de infecção e de doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. para o uso da água do rio Pardo para recreação de contato primário, permitiu concluir que:

- De acordo com a AQRM, para o cenário estabelecido, os resultados inferem que a água do rio Pardo, pode ser utilizada pela população para recreação de contato primário em todos os pontos, excetuando o Ponto 4, considerando que a estimativa de risco não ultrapassou o valor tolerável pela USEPA, para adultos e criança.
- Os resultados apontaram para probabilidade de giardíase maior do que 3×10^{-2} , para crianças que utilizam a água do rio Pardo para uso recreacional no Ponto 4, para o cenário estabelecido.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

A CIDADE. **Água do Rio Pardo na sua casa é uma questão de tempo.** A cidade on line. Disponível em: <https://www.acidadeon.com/ribeiraopreto/cotidiano/cidades/NOT,2,2,1273876,Agua+do+Rio+Pardo+na+sua+casa+e+uma+questao+de+tempo.aspx>. Acesso em: 12 set. 2017.

ABREU, C.H.M.; CUNHA, A.C. Qualidade da água e índice trófico em rio de ecossistema tropical sob impacto ambiental. **Eng Sanit Ambient**, v.22, n.1, p.45-56, 2017.

ACIKGOZ, Y., OZKAYA, O., BEK, K., GENC, G., SENSOY, S. G. AND HOKELEK, M. (2012), Cryptosporidiosis: A rare and severe infection in a pediatric renal transplant recipient. **Pediatric Transplantation**, v. 16, n. 4, p. 115-19, 2012.

ADAM, E. A.; YODER, J. S.; GOULD, L. H.; HLAVSA, M. C.; GARGANO, J. W. Giardiasis outbreaks in the United States, 1971-2011. **Epidemiol Infect.**, v. 144, n. 13, p. 2790-2801, 2016.

ADELL, A. D.; MCBRIDE, G. WUERTZ, S.; CONRAD, P. A.; SMITH, W. A. Comparison of human and southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*) health risks for infection with protozoa in nearshore waters. **Water Res.**, v. 104, p. 220-230, 2016.

ALONSO, E.; SANTOS, A.; RIESCO, P. Micro-Organism Re-Growth in Wastewater Disinfected by UV Radiation and Ozone: A Micro-Biological Study', **Environmental Technology**, v. 25, n. 4, p. 433-441. 2004.

ALVES, R. I. S.; CARDOSO, O. O.; TONANI, K. A. A.; JULIÃO, F. C.; TREVILATO, T. M. B.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Water quality of the Ribeirão Preto Stream, a watercourse under anthropogenic influence in the southeast of Brazil. **Environ Monit Assess**, v. 185, p. 1151-1161, 2013.

ALVES, R. I.; SAMPAIO, C. F.; NADAL, M.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Metal concentrations in surface water and sediments from Pardo River, Brazil: human health risks. **Environ Res**, v.133, p. :149-155, 2014.

APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22^a ed. Washington DC: APHA INC. 1015, p. 1490. 2012.

ANA. **Atlas Brasil: abastecimento urbano de água: panorama nacional.** Agência Nacional de Águas - Brasília: ANA: Engecorps/Cobrape, 2010.

_____. **O Comitê de Bacia Hidrográfica: o que é e o que faz?** / Agência Nacional de Águas - Brasília: SAG, 2011.

_____. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: Informe 2014** - Brasília: ANA, 2015.

_____. **Outorgas ANA 2013.** Disponível em: www.ana.gov.br/. Acesso em: 21 jul. 2015.

_____. **Atlas Brasil: abastecimento urbano de água.** Disponível em: <http://atlas.ana.gov.br/Atlas/forms/analise/Geral.aspx?est=6>. Acesso em: 12 jun 2017.

ARAÚJO, F. V.; RIBEIRO, C. R. B.; JAYME, M. M. A.; CARVALHO, M. C. N. Avaliação da qualidade das águas de seis rios de São Gonçalo e do risco de contaminação à Baía de Guanabara, RJ. **Revista Biociências**, Taubaté, v.21, n. 1; p. 01-13, 2015.

ARRUDA, A.A.R.; QUADROS, R. M.; MARQUES, S. M. T.; ROCHA, G. C. Prevalência de giardíase em crianças e seus cães da periferia urbana de Lages, Santa Catarina. **Rev FZVA**, Uruguaiana, v.15, n.2, p.126-134. 2008.

AZMAN, J.; INIT, I.; WAN YUSOFF, W. S. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* (oo)cysts in the river water of two recreational areas in Selangor, Malaysia. *Trop Biomed.*, v. 26, n. 3, p. 289-302, 2009.

BALDERRAMA-CARMONA, A. P.; GORTÁRES-MOROYOQUI, P.; ÁLVAREZ-VALENCIA, L. H.; CASTRO-ESPINOZA, L.; BALDERAS-CORTÉS, J. D. E. J. MONDACA-FERNÁNDEZ, I.; CHAIDEZ-QUIROZ, C.; MEZA-MONTENEGRO, M. M. Quantitative microbial risk assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia* in well water from a native community of Mexico. *Int J Environ Health*, v. 25, n. 5, p. 570-582, 2015.

BETANCOURT, W. Q.; ROSE, J. B. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Vet Parasitol**, v. 126, n. 1-2, p. 219-234, 2004.

BETANCOURT, W.Q.; DUARTE, D. C.; VÁSQUEZ, R. C.; GURIAN, P. L. *Cryptosporidium* and *Giardia* in tropical recreational marine waters contaminated with domestic sewage: estimation of bathing-associated disease risks. **Mar Pollut Bull.**, v. 85, n. 1, p. 268-273, 2014.

BOUYD, S. H.; WAINWRIGHT, N. R. **Multiple chromogen enzyme targeting (MCET) for use in bacterial contamination monitoring.** US 5510243 A. Gelman Sciences, Inc.1996.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. **Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jan. 2001.

_____. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 mar. 2005.

_____. Lei nº 11.445, de 05 de janeiro de 2007. **Estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico e para a política federal de saneamento básico.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 06 jan. 2007.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella.** Brasília: Ministério da Saúde, 2011a. 60 p.

_____. Ministério da Saúde. Portaria n. 2.914, de 12 de dezembro de 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 dez. 2011b.

_____. Governo Federal. Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa. Diário Oficial da União, Brasília, 25 mai. 2012.

_____. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2015.** Brasília: SNSA/MCIDADES, 2017. 212 p. : il.

BRASIL. Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>. Acesso em: 4 jul. 2017.

CAMRA. **Center for Advancing Microbial Risk Assessment.** Disponível em: <http://www.camra.msu.edu/> Acesso em: 12 mai. 2017.

CACCIÒ, S.M.; WIDMER, G.W. 2014 *Cryptosporidium: parasite and disease*. Editora: Springer. 2014. 563p.

CBH. **Comitê de Bacias Hidrográficas.** Disponível em: <http://www.cbh.gov.br/>. Acesso em: 10 mar. 2017.

CBH-GRANDE. **Comitê de Bacias Hidrográfica dos afluentes mineiros dos rios Mogi-Guaçu- Pardo.** Diponível em: <http://www.grande.cbh.gov.br/>. Acesso em: 15 mai. 2017.

CBH-PARDO. **Relatório de situação dos recursos hídricos da bacia hidrográfica 2015** (ano base 2014) /Comitê da Bacia Hidrográfica do Pardo; Grupo de Trabalho Permanente do Relatório Anual de Situação dos Recursos Hídricos e Plano de Bacia/UGRHI-4 Pardo, Ribeirão Preto, 2015. 96 p.

CBH-PARDO. **Relatório de situação dos recursos hídricos da bacia hidrográfica 2016** (ano base 2015) /Comitê da Bacia Hidrográfica do Pardo; Grupo de Trabalho Permanente do Relatório Anual de Situação dos Recursos Hídricos e Plano de Bacia/UGRHI-4 Pardo - Ribeirão Preto, 2016. 111 p.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Foodborne and Waterborne Disease Outbreaks 1971-1972.** Disponível em: https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/pdf/mmwr/mmwr_wbdoss_summary_1971-1972.pdf. Acesso em: 23 abr. 2017.

_____. **Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks — United States, 1995–1996.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/pdf/ss4705.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2017.

_____. **Foodborne and Waterborne Disease Outbreaks 1975.** Disponível em: https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/pdf/mmwr/mmwr_wbdoss_summary_1975.pdf. Acesso em: 11 abr. 2017.

_____. **Water-related Diseases Surveillance Annual Summary 1978.** Disponível em: https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/pdf/mmwr/mmwr_wbdoss_summary_1978.pdf. Acesso em: 11 abr. 2017.

_____. **Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks — United States, 1991–1992.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/pdf/ss4205.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2017.

_____. **Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks -- United States, 1993-1994.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/pdf/ss4501.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2017.

_____. **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2017.

_____. **Parasites – *Cryptosporidium*.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/>. Acesso em: 11 abr. 2017a.

_____. **Parasites – *Giardia*.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/>. Acesso em: 11 abr. 2017b.

_____. ***E.coli (Escherichia coli)*.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/>. Acesso em: 11 abr. 2017c.

_____. ***Salmonella*.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/>. Acesso em: 11 abr. 2017d.

CETESB (São Paulo). Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Norma técnica L5-218: Salmonella - isolamento e identificação: método de ensaio.** CETESB. - - São Paulo : CETESB, 1993. 42 p.

_____. **Análises microbiológicas de amostras ambientais.** Setor de cursos e capacitação. São Paulo: CETESB, 2009. 134 p.

_____. **Norma Técnica L5 230. Escherichia coli: Determinação pela técnica de membrana filtrante em amostras de águas - método de ensaio.** 2012. 21p.

_____. **Decisão da Diretoria nº 112/2013/E,** de 9 de abril de 2013. CETESB, 2013.

_____. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2016.** CETESB, São Paulo: CETESB, 2017.

CIIAGRO. **Centro Integrado de Informações agrometeorológicas.** <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline>. Acesso em: 05 mar. 2017.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev.**, v. 26, n. 4, p. 822-80. 2013.

CRUMP, J. A.; SJÖLUND-KARLSSON, M.; GORDON, M. A.; PARRY, C. M. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. **Clin Microbiol Rev.**, v. 28, n. 4, p. 901-37, 2015.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". **Patógenos. Salmonella Enteritidis**. 2011. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/bacterias/2011_13senteritidis_revisado.pdf. Acesso em: 3 jun. 2017.

_____. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar**. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar/>. Acesso em: 3 jun. 2017a.

_____. **Surtos DTA**. <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar/dados-estatisticos/surtos-de-dtas/surtos-dta>. Acesso em 06 jun. 2017b.

DANTAS, A. D. B.; PASCHOALATO, C. F. P. R.; BALLEJO, R. R.; BERNARDO, L. D. Pré-oxidação e adsorção em carvão ativado granular para remoção dos herbicidas Diuron e Hexazinona de água subterrânea. **Eng. Sanit. Ambient.**, v.14, n. 3, p. 373-380, 2009.

DAERP. **Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto**. Disponível em: <http://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/daerp/>. Acesso em: 10 jul. 2017.

DENNO, D. M.; KEENE, W. E.; HUTTER, C. M.; KOEPSSELL, J. K.; PATNODE, M.; FLODIN-HURSH, D.; STEWART, L. K.; DUCHIN, J. S.; RASMUSSEN, L.; JONES, R.; TARR, P. I. Tri-county comprehensive assessment of risk factors for sporadic reportable bacterial enteric infection in children. **J Infect Dis.** , v. 199, n. 4, p. 467-476. 2009.

DRONE PHANTOM 2 VISION PLUS. 2016. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=lyJ6kQbyZYI>. Acesso em: 15 jul. 2017.

DUFOUR, A. P.; EVANS, O.; BEHYMER, T. D.; CANTÚ, R. Water ingestion during swimming activities in a pool: a pilot study. **J Water Health.**, v. 4, n. 4, p. 425-430, 2006.

DUPONT, H. L.; CHAPPEL, C. L.; OKHUYSEN, P. C.; ROSE, J. B.; JAKUBONSKI, W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. **The New England Journal of Medicine**, Melbourn, v. 332, n. 13, p. 855-859, 1995.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. **EFSA Journal**, v. 14, n. 12, 2016.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. **Water Res.**, v. 114, p.140-122, 2017.

EEA. European Environment Agency. **European bathing water quality in 2016**, EEA Report n° 5/2017, 2017.

EHSAN, M. A.; CASAERT, S.; LEVECKE, B.; VAN ROOY, L.; PELICAEN, J.; SMIS, A.; DE BACKER, J.; VERVAEKE, B.; DE SMEDT, S.; SCHOONBAERT, F.; LAMMENS, S.; WARMOES, T.; GEURDEN, T.; CLAEREBOU, E. *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational water in Belgium, **J Water Health**, v. 13, n. 1, p.870-878. 2015.

EP. European Parliament. **Directive 2006/EC of the European Parliament and of the council concerning the management of quality of bathing water**. 2006. Official Journal of the European Union. L64: 37-51, 2006.

FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C.; DIAS, A. M.; ALMEIDA, I. A.; MELO, L. C. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 48, n. 4, p. 179-184, 2006.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 1, p. 110-140, 2011.

FLETCHER, S. M.; STARK, D.; HARKNESS, J.; ELLIS, J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, p. 420–449, 2012.

FOLHA DE SÃO PAULO. **Redução de vazão em usinas pode causar prejuízos ao rio Pardo, diz comitê**. 2014. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/ribeiraopreto/2014/10/1534557-reducao-de-vazao-em-usinas-pode-causar-prejuizos-ao-rio-pardo-diz-comite.shtml>. Acesso em: 5 jun. 2017.

FRANCO, G. B.; BETIM, L. S.; MARQUES, E. A. G.; CHAGAS, C. S.; GOMES, R. L. Avaliação da qualidade sanitária da água na bacia hidrográfica do rio Almada – BA. **Caminhos de Geografia**, v. 16, n. 54, p. 254–262. 2015.

FREGONESI, B. M.; SAMPAIO, C. F.; RAGAZZI, M. F.; TONANI, K. A. A.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. *Cryptosporidium* e *Giardia*: desafios em águas de abastecimento público. **Mundo Saúde**, v. 36, n. 4, p. 602-609, 2012.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Análise da qualidade da água, 2015**. <https://www.sosma.org.br/102095/fundacao-divulga-qualidade-da-agua-em-111-rios-pais/>. Acesso em 20 jun. 2017.

GEMMELL, M. E.; SCHMIDT, S. Is the microbiological quality of the Msunduzi River (KwaZulu-Natal, South Africa) suitable for domestic, recreational, and agricultural purposes? **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 20, n. 9, p. 6551-6562, 2013.

GERBA, C. P.; ROSE, J. B. International guidelines for water recycling: microbiological considerations. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 3, n. 4, p. 311-316, 2003.

GLOBO.COM. Bombeiros encontram corpo de um dos jovens afogados no Rio Pardo. Disponível em: <http://g1.globo.com/sp/sao-carlos-regiao/noticia/2014/01/bombeiros-encontram-corpo-de-um-dos-jovens-afogados-no-rio-pardo.html>. Acesso em: 18 mar. 2017.

GOMES, T. A.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C.; GUTH, B. E.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M.; FERREIRA, L. C.; MARTINEZ, M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Braz J Microbiol**, v. 47, n. 1, 3-30, 2016.

GOOGLE EARTH. **Imagem de Satélite**. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/>. Acesso em: 12 jan. 2017.

GRABOW, W. O. K. Waterborne diseases: update on water quality assessment and control. **Water S.A**, Gezina, v. 22, n. 2, p. 193-202, 1996.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9th edition . 2007.

GUIRRO, M.; PIAZZA, R. M.; DE SOUZA, R. L.; GUTH, B. E.; Humoral immune response to Shiga Toxin 2 (Stx2) among Brazilian urban children with hemolytic uremic syndrome and healthy controls. **BMC Infect Dis.**, v. 14, n. 320, 2014.

HADI, M.; MESDAGHINIA, A.; YUNESIAN, M.; NASSERI, S.; NABIZADEH NODEHI, R.; TASHAUOEI, H.; JALILZADEH, E.; ZARINNEJAD, R.; Contribution of environmental media to cryptosporidiosis and giardiasis prevalence in Tehran: a focus on surface waters. **Environ Sci Pollut Res Int**. 2016, v. 23, n. 19, p. 19317-19329, 2016.

HARAMOTO, E.; YAMADA, K.; NISHIDA, K. Prevalence of protozoa, viruses, coliphages and indicator bacteria in groundwater and river water in the Kathmandu Valley, Nepal. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 12, p. 711-716, 2011.

HAAS, C. N.; CROCKETT, C. S.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P.; FAZIL, A. M. Assessing the Risk Posed by Oocysts in Drinking Water. **Journal - American Water Works Association**, v. 88, n. 9, p. 131-136, 1996.

HASS, C. N.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P. **Quantitative Microbial Risk Assessment**. New York: John Wiley e Sons, Inc., 1999.

HEALTH CANADA. Guidelines for Canadian Recreational Water Quality, Third Edition. Water, Air and Climate Change Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario (Catalogue No H129-15/2012E). 2012.

HENDRIKSEN, R. S., VIEIRA, A., KARLSMOSE, S., WONG, D. L. F., JENSEN, A. B., WEGENER, H. C., & AARESTRUP, F. M. Global Monitoring of *Salmonella* Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, n. 8, v. 8, 2011.

HIJJAWI, N. *Cryptosporidium*: new developments in cell culture. *Exp Parasitol.*, v.124, n. 1, p 54-60, 2010.

HORNE, S.; SIBAL, B.; SIBAL, N.; GREEN, H. K. *Cryptosporidium* outbreaks: identification, diagnosis, and management. **Br J Gen Pract.**, v. 67, n. 662, p. 425-426, 2017.

HSU BM1, HUANG KH, HUANG SW, TSENG KC, SU MJ, LIN WC, JI DD, SHIH FC, CHEN JL, KAO PM. Evaluation of different analysis and identification methods for *Salmonella* detection in surface drinking water sources. **Sci Total Environ.**, v. 409, n. 20, p. 4435-4441, 2011.

IBGE. Cidades 2016. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/v3/cidades/municipio/3549706>. Acesso em: 12 mai. 2017.

IGNOTO, R. F. **Avaliação quantitativa de risco microbiológico em águas e biossólidos: estado da arte.** 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)- Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

IRINO, K.; VAZ, T. M. I.; KATO, M. A. M. F.; LARA, R. R.; MARCO, M. E. C., et al. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 4, p. 446-447, 2002.

JANSSEN, B.; SNOWDEN, J. **Cryptosporidiosis.** StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017.

JIMENEZ, M.; CHAIDEZ, C. Improving *Salmonella* determination in Sinaloa rivers with ultrafiltration and most probable number methods, **Environ Monit Assess.**, v. 184, n. 7, p. 4271-4777, 2012.

JORNAL DA EPTV. **Chuvas elevam nível do Rio Pardo.** Disponível em: <http://g1.globo.com/sp/ribeirao-preto-franca/jornal-da-eptv-2edicao//videos/v/chuvas-elevam-nivel-do-rio-pardo-na-regiao-de-ribeirao-preto/4639503/>. Acesso em: 9 jan. 2016.

JÚLIO, C.; SÁ, C.; FERREIRA, I.; MARTINS, S.; OLEASTRO, M.; ANGELO, H.; GUERREIRO, J.; TENREIRO, R. Waterborne transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* at river beaches in Southern Europe (Portugal). **J Water Health.**, v. 10, n. 3., p. 484-496, 2012.

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

KARIUKI, S.; GORDON, M. A.; FEASEY, N.; PARRY, C. M. Antimicrobial resistance and management of invasive *Salmonella* disease. **Vaccine**, v. 19, n. 33. 2015.

KAHN, H.; 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 Exp Sci Environ Epidemiol**, v. 19, p. 396-404, 2009.

KONYA, T.; KOSTER, B.; MAUGHAN, H.; ESCOBAR, M.; AZAD, M. B.; GUTTMAN, D. S.; SEARS, M. R.; BECKER, A. B.; BROOK, J. R.; TAKARO, T. K.; KOZYRSKYJ, A. L.; SCOTT, J. A.; Associations between bacterial communities of house dust and infant gut. **Environ Res**, v. 131, p.25-30, 2014.

KÖRKOCA H, GÖZ Y, ATAŞ AD, KURTOĞLU MG, EKICI K, BERKTAŞ M. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in asymptomatic food workers. **Türkiye Parazit Derg**, v. 37, n. 4,

p. 241-4, 2013.

KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S., et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, p. 209-222, 2013.

KRKOSEK, W.; REED, V.; GAGNON, G. A. Assessing protozoan risks for surface drinking water supplies in Nova Scotia, Canada. **J Water Health**, v. 14, n. 1, p. 155-166, 2016.

KRZYZANOWSKI, F.; ZAPPELINI, L.; MARTONE-ROCHA, S.; DROPA, M.; MATTE, M.; H.; NACACHE, F.; RAZZOLINI, M. T. P. Quantification and characterization of *Salmonella* spp. isolates in sewage sludge with potential usage in agriculture. **BMC Microbiol.**, v. 14, p.263, 2014.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. Ed, 10. Porto Alegre: Artmed, 2010. 664p.

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

LENART-BORÓN, A.; WOLANIN, A.; JELONKIEWICZ, E.; ŻELAZNY M, The effect of anthropogenic pressure shown by microbiological and chemical water quality indicators on the main rivers of Podhale, southern Poland. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 24, n. 14, p.12938-12948, 2017.

LOPES, W. D. Z.; FELIPPELLI, G.; TEIXEIRA, W. F. P.; CRUZ, B. C.; MACIEL, W. G.; BUZZULINI, C.; MATOS, L. V. S.; GOMES, L. V. C.; PEREIRA, J. C. M.; FÁVERO, F. C.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Resistência de *Haemonchus placei*, *Cooperia punctata* e *Oesophagostomum radiatum* à ivermectina pour-on a 500mcgkg-1 em rebanhos bovinos no Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, n. 5, p. 847-853, 2014.

MACHADO, C. S.; ALVES, R. I. S.; FREGONESI, B. M.; BEDA, C. F.; SUZUKI, M. N.; TREVILATO, R. B. ; NADAL, M.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S.I. . Integrating three tools for the environmental assessment of the Pardo River, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment (Print)**, v. 187, p. 4788, 2015.

MACHADO, C. S.; FREGONESI, B. M.; ALVES, R. I. S.; TONANI, K. A A. A.; SIERRA, J. ; MARTINIS, B. S.; CELERE, B. S.; MARI, M.; SCHUHMACHER, M.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L. ; SEGURA-MUÑOZ, S. Health risks of environmental exposure to metals and herbicides in the Pardo River, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 1, p. 1-13, 2017.

MAJOWICZ, S. E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F. J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S. J.; JONES, T. F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R. M.; INTERNATIONAL COLLABORATION ON ENTERIC DISEASE 'BURDEN OF ILLNESS' STUDIES. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clin Infect Dis.**, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010.

MCBRIDE, G. B.; STOTT, R.; MILLER, W.; BAMBIC, D.; WUERTZ, S. Discharge-based QMRA for estimation of public health risks from exposure to stormwater-

borne pathogens in recreational waters in the United States. **Water Res.**, v. 47, n. 14, p. 5282-5287, 2013.

MC EGAN, R.; CHANDLER, J. C.; GOODRIDGE, L. D.; DANYLUK, M. D. Diversity of *Salmonella* isolates from central Florida surface waters. **Appl Environ Microbiol.**, v. 80, n. 21, p. 6819-6827, 2014.

MIRANDA, A. L.; CORDEIRO, S. M.; REIS, J. N.; CARDOSO, L.G.; GUIMARÃES, A.G. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* spp. isolated from foods and clinical samples in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p.1143-1153, 2017.

MOLINARO, E. M. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratório de Saúde**. v. 5, Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2012. 476p.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium* and *Giardia*- zoonoses: fact or fiction? **Infect Genet Evol.**, v. 3, n. 4, p. 233-244, 2003.

MOREIRA, N. A.; BONDELIND, M.; Safe drinking water and waterborne outbreaks. **J Water Health.**, v. 15, n. 1, p. 83-96, 2017.

NETO, V. A.; GRYSCHKEK, R. C. B.; AMATO, V. S.; TUON, F. F. **Parasitologia: Uma Abordagem Clínica**. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2008. 433p.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12ed. São Paulo; Editora Atheneu, 2011. 264p.

NASSER, A. M. Removal of *Cryptosporidium* by wastewater treatment processes: a review. **J Water Health**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2016.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev.**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NETO, V. A.; GRYSCHKEK, R. C. B.; AMATO, V. S.; TUON, F. F. **Parasitologia: Uma Abordagem Clínica**. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2008. 433p.

NETO, R. C.; DOS SANTOS, L. U.; SATO, M. I.; FRANCO, R. M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, southeast Brazil. **Water Sci Technol**, v. 62, n. 1, p. 217-222, 2010.

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

NIEMINSKI, E. C. **Removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* trough conventional water treatment and direct filtration**. EPA/600/SR-97/025, 1997.

NORTH, R. L.; KHAN, N. H.; AHSAN, M.; PRESTIE, C.; KORBER, D.R.; LAWRENCE, J. R.; HUDSON, J. J. Relationship between water quality parameters and bacterial indicators in a large prairie reservoir: Lake Diefenbaker, Saskatchewan, Canada. **Can J Microbiol.**, v. 60, n. 4, p. 243-249. 2014.

OLIVEIRA, B. S. S.; CUNHA, A. C. Correlação entre qualidade da água e variabilidade da precipitação no sul do Estado do Amapá. **Rev. Ambient. Água**, v. 9, n. 2, 2014

OLIVEIRA-SILVA, M. B. de; OLIVEIRA, L. R de; RESENDE, J. C. P.; PEGHINI, B. C.; RAMIREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E. et al. Seasonal profile and level of CD4+ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/AIDS patients in the Triângulo Mineiro region, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 5, p. 512-515, 2007.

O' NEILL, S.; ADHIKARI, A. R.; GAUTAM, M. R.; ACHARYA, K. Bacterial contamination due to point and nonpoint source pollution in a rapidly growing urban center in an arid region. **Urban Water Journal**, v.10 , n. 6, 2013.

ONU BRASIL. Organização das Nações Unidas- Brasil. **Objetivos do Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/pos2015/>. Acesso em: 02 abr. 2017.

ONICHANDRAN, S.; KUMAR, T.; SALIBAY, C. C.; DUNGCA, J. Z.; TABO, H. A.; TABO, N.; TAN, T. C.; LIM, Y. A.; SAWANGJAROEN, N.; PHIRIYASAMITH, S.; ANDIAPPAN, H.; ITHOI, I.; LAU, Y. L.; NISSAPATORN, V. Waterborne parasites: a current status from the Philippines. **Parasit Vectors.**, v. 28, n. 7, p. 244, 2014.

PEREIRA, J. T.; COSTA, A. O.; DE OLIVEIRA SILVA, M. B.; SCHUCHARD, W.; OSAKI, S. C.; DE CASTRO, E. A.; PAULINO, R. C.; SOCCOL, V. T. Comparing the efficacy of chlorine, chlorine dioxide, and ozone in the inactivation of *Cryptosporidium parvum* in water from Parana State, Southern Brazil. *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 151, n. 2-3, p. 464-473, 2008.

PEREIRA, J.; SOCCOL, V.; COSTA, A.; CASTRO, E.; OSAKI, S.; PAULINO, R. *Cryptosporidium* spp.: para controlar é necessário conhecer. **Rev Saúde e Amb.**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 13-25, 2010.

PETTERSON, S. R.; ASHBOLT, N. J. QMRA and water safety management: review of application in drinking water systems. **J Water Health.**, v. 14, n. 4, p. 571-589, 2016;

PINTO, K. C. **Estimativa de risco de infecção por *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp pela ingestão de água durante atividades de recreação de contato primário**. Tese (Doutorado em Saúde Pública)- Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

POPULIN, A. R. T.; CARVALHO, P. G.; NISHI, L.; NAKAMURA, C. V.; GUILHERME, A. L.F. Enteropatógenos relacionados à diarreia em pacientes HIV que fazem uso de terapia anti-retroviral. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v 42, n 5, p. 551-555, 2009.

RAJABI, M.; JONES, M.; HUBBARD, M.; RODRICK, G.;WRIGHT, A. C. Distribution and Genetic Diversity of *Salmonella enterica* in the Upper Suwannee River. **International Journal of Microbiology**, v. 2011, p. 9 pages, 2011.

RAMADAN, Q.; GIJS, M. A. M. Microfluidic applications of functionalized magnetic particles for environmental analysis: focus on waterborne pathogen detection. **Microfluid Nanofluidics.**, v. 13, p. 529–542, 2012.

RAZZOLINI, M. T. P.; MARDOCCI, A. C. Avaliação de Risco Microbiológico: etapas e sua aplicação na análise da qualidade da água. **Rev. de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v. 1, n. 2, 2006.

RAZZOLINI, M. T. P.; LAURETTO, M. S.; HACHICH, E. M.; SATO, M. I. Z.; NARDOCCI, A. C. *Giardia* and *Cryptosporidium* infection risk by simultaneous exposure to drinking water. **Microbial Risk Analysis**, v.4, p. 1-6, 2016.

RENDTORFF, R. C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. **Am J Hyg.**, v. 59, n. 2, p. 209-220, 1954.

REGLI, S.; ROSE, J. B.; HAAS, C. N.; GERBA, C. P.. Modeling the risk from *Giardia* and viruses in drinking water. **J Am Water Works Assoc.**, v. 83, n. 11, p. 76–84, 1991.

ROBERTSON, L. J.; HANEVIK K, ESCOBEDO, A. A.; MORCH, K.; LANGELAND, N. Giardiasis--why do the symptoms sometimes never stop?. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 75-82, 2010.

RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **Int J Parasitol**, v. 43, n. 12-13, p. 943-956. 2013.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology.**, v. 141, n. 13, p. 1667-1685, 2014.

RYAN, U.; HIJJAWI, N.; New developments in *Cryptosporidium* research. **Int J Parasitol**, v. 45, n. 6, p. 367-73, 2015.

RYU, H.; ABBASZADEGAN, M. Long-term study of *Cryptosporidium* and *Giardia* occurrence and quantitative microbial risk assessment in surface waters of Arizona in the USA. **J Water Health.**, v. 6, n. 2, p. 263-273, 2008.

ROSADO-GARCÍA, F. M.; GUERRERO-FLÓREZ, M.; KARANIS, G.; HINOJOSA, M. D. C.; KARANIS, P. Water-borne protozoa parasites: The Latin American perspective, **Int J Hyg Environ Health**, v. 220, n. 5, 2017.

ROSE, J.B.; HAAS, C.N.; REGLI, S. Risk assessment and control of waterborne giardiasis. **American Journal of Public Health**, v. 81, n. 6, p. 709-713. 1991

SANTANA, L. A.; VITORINO, R. R.; ANTONIO, V. E.; MOREIRA, T. R.; GOMES, A. P. Atualidades sobre giardíase. **JBM**, v. 102; n.7, 2014.

SATO, M. I. Z.; GALVANI, A. T.; PADULA, J. A.; NARDOCCI, A. C.; LAURETTO, M. S.; RAZZOLINI, M. T. P.; HACHICH, E. M. 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.**, v. 442, n. 2013, p. 389–396, 2013.

SCALLAN, E.; MAHON, B. E.; HOEKSTRA, R. M.; GRIFFIN, P. M. Estimates of illnesses, hospitalizations and deaths caused by major bacterial enteric pathogens in young children in the United States. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v. 32, p. 217–221, 2013.

SCHETS, F. M.; SCHIJVEN, J. F.; DE RODA HUSMAN, A. M. Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. **Water Res.**, v. 45, n. 7, p. 2392-2400, 2011.

SERRANA. **Decreto Municipal nº63/2017.** Disponível em: http://www.serrana.sp.gov.br/media/uploads/leis/decreto_63_-_utilidade_publica_ete.pdf. Acesso em: 02 set. 2017.

SILVA, L. Z. **Ocorrência e caracterização de Salmonella Não tifóide em esgotos brutos e águas superficiais da Região Metropolitana de São Paulo.** 2015. 115p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)- Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SILVA, V. B.; GASPARETTO, N. V. L. Qualidade da Água na Sub-Bacia do Rio do Campo-Campo Mourão-PR. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 9, n 2, 2016

SIGRH. Sistema Integrado de Gestão de Recursos Humanos. **Situação dos recursos hídricos no Estado de São Paulo: 2015** / Governo do Estado de São Paulo, Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos, Coordenadoria de Recursos Hídricos. – 6. ed. – São Paulo : Coordenadoria de Recursos Hídricos, 2017.

STALLARD, M. A.; OTTER, R. R.; WINESETT, S.; BARBERO, M.; BRUCE, M.; LAYTON, A.; BAILEY, F. C. A Watershed Analysis of Seasonal Concentration- and Loading-based Results for Escherichia coli in Inland Waters. **Bull Environ Contam Toxicol.** v. 97, n. 6, p. 838-842, 2016.

SUPPES, L. M.; CANALES, R. A.; GERBA, C. P.; REYNOLDS, K. A. *Cryptosporidium* risk from swimming pool exposures. **Int J Hyg Environ Health.**, v. 219, n. 8, p. 915-919, 2016.

ROSADO-GARCÍA, F. M.; GUERRERO-FLÓREZ, M.; KARANIS, G.; HINOJOSA, M. D. C.; KARANIS, P. Water-borne protozoa parasites: The Latin American perspective. **Int J Hyg Environ Health**, v. 220, n. 5, p. 783-798. 2017.

ROSE, J. B.; HUFFMAN, D. E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 26, n. 2, p. 113-123. 2002.

SAMPAIO, C. F. **Avaliação ambiental do Rio Pardo, Brasil: ênfase para Áreas de Preservação Permanente, ecossistemas aquáticos superficiais e condições físico-químicas da água.** Dissertação (Dissertação de Mestrado)- Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2012.

SANTANA, L. A.; VITORINO, R. R.; ANTONIO, V. E.; MOREIRA, T. R.; GOMES, A. P. Atualidades em giardíase. **J. bras. med**; v. 102, n. 1, p. 7-10, 2014.

SATO, M. I. Z.; GALVANI, A. T.; PADULA, J. A.; NARDOCCI, A. C.; LAURETTO, M. S.; RAZZOLINI, M. T. P; HACHICH, E. M. 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.**, v. 442, n. 2013, p. 389–396, 2013.

SOTO, F. R. M.; FONSECA, Y. S. K.; RISSETO, M. R.; ARINI, M. de L. B.; MARCHETTE, D. S.; CAMARGO, C. da C. Programa de saneamento da água de poços rasos de escolas públicas rurais do município de Ibiúna-SP. **Rev Ciência Ext.**, São Paulo, v.3, n.2, p.11, 2007.

SOLLER, J. A.; BARTRAND, T.; ASHBOLT, N. J.; RAVENSCROFT, J.; WADE, T. J. Estimating the primary etiologic agents in recreational freshwaters impacted by human sources of faecal contamination. **Water Res.**, v. 44, n. 16, p. 4736-4747, 2010.

SOLLER, J. A.; ASHBOLT, N. J.; SCHOEN, M.; RAVENSCROFT, J. **Use of QMRA to evaluate recreational water risks from human and non-human sources.** 2011. Disponível em: <http://water.epa.gov/type/oceb/beaches/upload/session8soller.pdf>. Acesso em: 02 set. 2014.

SOUZA, R. F. **Estudos evolutivos do divisoma, uma completo multiprotéico responsável pela divisão bacteriana.** 2007. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Bioquímica)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

STALEY, C.; GORDON, K. V.; SCHOEN, M. E; HARWOOD, V. J. Performance of two quantitative PCR methods for microbial source tracking of human sewage and implications for microbial risk assessment in recreational waters. **Appl Environ Microbiol.**, v.78, n. 20, p.7317-7326. 2012.

THOMPSON, R. C. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **Int J Parasitol.**, Oxford, v. 30, n. 12-13, p. 1259-1267, 2000.[

TOLEDO, R. D.; MARTINS, F. D.; FERREIRA, F. P.; DE ALMEIDA, J. C.; OGAWA, L.; DOS SANTOS, H. L.; DOS SANTOS, M. M.; PINHEIRO, F. A.; NAVARRO, I. T.; GARCIA, J. L.; FREIRE, R. L. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p.1-20, 2017.

TONANI, K. A. A.; PADULA, J. A.; JULIÃO, F. C.; FREGONESI, B. M.; ALVES, R. I. S.; SAMPAIO, C. F.; BEDA, C. F.; HACHICH, E. M.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Persistence of *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Rotavirus* and *Adenovirus* in Treated Sewage in São Paulo State. **Brazil. J Parasitol.**, v. 99, n. 6, p. 1144-1147. 2013.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. (1986). **Ambient Water Quality for Bacteria – 1986.** EPA 440/5-84-002. Disponível em: http://water.epa.gov/action/advisories/drinking/upload/2009_04_13_beaches_1986crit.pdf.

_____. **National primary drinking water regulations: interim enhanced surface water treatment rule; final rule.** 40 CFR parts 9, 141 and 142. December 16; 1998.

_____. Office of Water. Washington DC. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA.** EPA-821-R-01-025, 2005.

_____. **Method 1682: Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium.** EPA-821-R-06-14, 2006a.

_____. **National primary drinking water regulations: longterm 2 enhanced surface water treatment rule**; Final Rule. Part II. EPA, 40 CFR Parts 9, 141 and 142. Fed. Reg. 71(3), 654. 2006b.

_____. **Exposure Factors Handbook 2011 Edition (Final)**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-09/052F, 2011.

_____. **Microbial Risk Assessment Guideline: Pathogenic Organisms with Focus on Food and Water**. FSIS Publication n° USDA/FSIS/2012-001; EPA Publication No. EPA/100/J12/001. 2012a.

_____. **Method 1200: Analytical Protocol for Non-Typhoidal *Salmonella* in Drinking Water and Surface Water**, Office of Water. Washington DC. EPA 817-R-12-004, 2012b.

VALENZUELA, O.; GONZÁLEZ-DÍAZ, M.; GARIBAY-ESCOBAR A, BURGARA-ESTRELLA, A.; CANO, M.; DURAZO, M.; BERNAL, R. M.; HERNANDEZ, J.; XIAO, L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in children from Mexico. **PLoS One.**, v. 9, n. 4, 2014.

VICTORINO, C. J. A. **Planeta água morrendo de sede: uma visão analítica na metodologia do uso e abuso dos recursos hídricos**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 231p.

WHITE, A. C. Cryptosporidiosis and the ears of the hippopotamus. **Clin Infect Dis**, v, 50, p. 1373–1374, 2010.

WIDERSTRÖM, M.; SCHÖNNING, C.; LILJA, M.; LEBBAD, M.; LJUNG, T.; ALLESTAM, G. et al. Large Outbreak of *Cryptosporidium hominis* Infection Transmitted through the Public Water Supply, Sweden. **Emerg Infect Dis.**, v. 20, n. 4, p. 581-589, 2014.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for safe recreational water environments Volume 1: Coastal and fresh waters**. Geneva, WHO, 2003.

_____. **Risk assessment of cryptosporidium in drinking water**. Geneva : World Health Organization, 2009, 134 p.

_____. **Quantitative Microbial Risk Assessment: Application for Water Safety Management**. WHO, Geneva. 2016.

_____. **Sanitation**. <http://www.who.int/topics/sanitation/en/>. Acesso em: 15 jul. 2017a.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Exp Parasitol.**, v.124, n. 1, p. 80-9, 2010.

XIAO L, FAYER R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 11, p.1239–55, 2008.

XIAO, G.; QIU, Z.; QI, J.; CHEN, J.A.; LIU, F.; LIU, W.; LUO, J.; SHU, W. Occurrence and potential health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the Three Gorges Reservoir, China. **Water Res.**, v. 47, n. 7, p. 2431-2445, 2013.

ZAHEDI, A.; DURMIC, Z.; GOFTON, A.W.; KUEH, S.; AUSTEN. J.; LAWSON, M.; CALLAHAN, L.; JARDINE, J.; RYAN, U. *Cryptosporidium homai* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from the guinea pig (*Cavia porcellus*). **Vet Parasitol.**, v. 245, p. 92-101, 2017.