

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

**Contaminação por protozoários potencialmente
patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da
Laguna dos Patos, Rio Grande, RS**

Ricardo Luiz Ricci Falchi

Pelotas, 2006

RICARDO LUIZ RICCI FALCHI

**CONTAMINAÇÃO POR PROTOZOÁRIOS POTENCIALMENTE
PATOGÊNICOS AO HOMEM NA ÁGUA DE DIFERENTES PONTOS
DA LAGUNA DOS PATOS, RIO GRANDE, RS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Parasitologia).

Orientador: Prof. Dr. Carlos James Scaini

Co-Orientador: Prof.Dr. Claudiomar S. Brod

Pelotas, 2006

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F178c Falchi, Ricardo Luiz Ricci
Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS / Ricardo Luiz Ricci Falchi; ; orientador Carlos James Scaini; co-orientador Claudiomar S. Brod. – Pelotas, 2006. – 90f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2006.

1. *Cryptosporidium*. 2. *Acanthamoeba*. 3. *Naegleria*.
4. Contaminação da água. 5. Protozoários. 6. Parasitologia.
I. Scaini, Carlos James. II. Brod, Claudiomar S. III. Título.

CDD: 616.0160981658

Banca examinadora:

Profª. Drª. Gertrud Muller

Profª. Drª. Nara A. R. Farias

Prof. Dra. Lulie Rosane Odeh Susin

Prof. Dr. Carlos J. Scaini
(Orientador)

Prof. Dr. Claudiomar S. Brod
(Co-orientador)

À minha esposa, Patrícia,
dedico este trabalho como forma
de reconhecimento pelo amor,
compreensão e incentivo para a
realização profissional e pessoal.

Agradecimentos Especiais

Às minhas filhas, Maria do Carmo e Ana Maria, por compreenderem os momentos de ausência durante a realização deste, pelo amor e pela alegria que me recebiam ao retornar dos trabalhos em Rio Grande.

Aos meus pais, Nair e Miguel, por terem me dado a vida, não somente no sentido de trazer ao mundo, mas uma vida com honestidade, seriedade, humildade e pelo exemplo de dedicação à família.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade oferecida para a realização deste Curso de Pós-Graduação.

À Fundação Universidade do Rio Grande, por permitir o uso do laboratório de Parasitologia para o desenvolvimento da parte prática deste estudo.

À Universidade Católica de Pelotas, pela concessão do auxílio para a qualificação docente.

Ao Prof. Dr. Carlos James Scaini, pelos ensinamentos, confiança e orientação no desenvolvimento deste estudo.

À Prof. Dra. Iraci de Lourdes Pacholski, diretora da Escola de Farmácia da Universidade Católica de Pelotas, pelo incentivo e pelo auxílio na disponibilidade de horários.

Ao Prof. Dr. Claudiomar S. Brod pela análise estatística realizada e por esclarecimentos prestados.

Aos amigos e colegas de mestrado pela companhia, estímulo e amizade, em especial a amiga Michele pela sua incansável dedicação.

Aos professores e funcionários do laboratório de Parasitologia da FURG, em especial a amiga Lourdes Helena Martins pelo auxílio na preparação do material a ser analisado.

À Prof^a. Carolina Alicia Coch Gioia responsável pelas análises microbiológicas das amostras.

À Prof^a. Éren Melo Moraes Pasquali pelo auxílio nas traduções de textos e correções efetuadas neste trabalho.

RESUMO

FALCHI, Ricardo Luiz Ricci. **Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS.** 2006. 90f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Nos países em desenvolvimento uma das principais causas de doenças é a contaminação da água devido às deficiências dos serviços de esgotamento sanitário. A cidade de Rio Grande, localizada ao sul do Rio Grande do Sul, assim como a maioria dos municípios brasileiros, também apresenta limitações na colheita e tratamento do esgoto cloacal. Esta deficiência faz com que parte dos dejetos da população seja eliminada diretamente na Laguna dos Patos, a qual desempenha importante papel na atividade pesqueira, além de ser usada como local para banho, nos meses de verão, pela população residente nos seus arredores. Este estudo teve como objetivos investigar a presença de parasitos patogênicos ao homem e de parasitos que são indicadores de contaminação fecal em amostras de água colhidas em diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS. No período de janeiro a dezembro de 2005, foram colhidas, mensalmente, amostras de 500 mL de água em 12 pontos da Laguna. As amostras foram filtradas através de membrana de acetato de celulose (0,45 µm), sob pressão negativa para a retenção do material. Após eluição do material, através da solução de Tween 80 a 0,1%, o material foi concentrado por centrifugação a 1500 rpm, por 15 minutos. Para a pesquisa inicial de protozoários, foi realizado o exame direto a fresco do material, bem como do material concentrado pela técnica de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco. Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp., foram realizadas simultaneamente as técnicas de concentração de centrífugo-flutuação de Sheather e de centrífugo-sedimentação pelo formol-éter, com posterior coloração com a técnica de Kinyoun. Para a pesquisa de amebas de vida livre, foi feito o cultivo de uma alíquota de cada amostra de água em meio de ágar não nutriente com *Escherichia coli* inativada. Alíquotas provenientes do material eluído da membrana e do cultivo foram coradas pelo tricrômio, para diagnóstico de cistos de protozoários. Nos locais de colheita das amostras foram medidos pH, salinidade e temperatura da água. A pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada pela técnica dos tubos múltiplos. Na análise dos 12 pontos, durante os 12 meses de colheita de água, foi observado que 91,7% (11/12) estavam contaminados com protozoários que podem infectar seres humanos; *Cryptosporidium* spp. (16,7%), *Acanthamoeba* spp. (91,7%), *Naegleria* spp. (25%) e *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (8,3%). Coliformes totais (superior a 5.000/100mL) e *Escherichia coli* (superior a 1.000/100mL) foram isolados em todas as amostras colhidas, demonstrando contaminação da água por esgoto cloacal. A temperatura, salinidade e pH da água, não influenciaram na detecção dos protozoários, exceto para *Acanthamoeba* spp. que apresentou maior frequência quando a salinidade da água estava menor ou igual a 0,6% (p<0,05). A presença de matéria orgânica nas proximidades dos locais de colheita das amostras

influenciou na detecção de protozoários em geral, bem como a criação de animais para a detecção de *Naegleria* spp. ($p < 0,05$). A observação da contaminação da água por parasitos patogênicos ao homem e a indicação de contaminação fecal, sugerem melhores ações de planejamento sanitário, assim como medidas preventivas e educativas a fim de evitar a infecção humana.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*. *Acanthamoeba*. *Naegleria*. Água. Contaminação.

ABSTRACT

FALCHI, Ricardo Luiz Ricci. **Contamination by protozoa potentially pathogenic to man in the water of different parts of Patos Lagoon, Rio Grande, RS.** 2006. 90f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

In countries in development, one of the main causes of diseases is the contamination of the water due to the deficiency of the sanitary sewerage system. Rio Grande city, situated in the South of Rio Grande do Sul, as the majority of the Brazilian cities also presents limitations in the collection and treatment of the cloacal sewer. This deficiency makes that part of the residues of the population be eliminated directly in the Patos Lagoon, which acquires an important role in the fishing activity, besides being used as local for washing, in the summer months, by the population which lives around. This study had as objectives to investigate the presence of pathogenic parasites to the man and parasites that are indicator of fecal contamination water samples gathered in different parts of the Patos Lagoon, Rio Grande, RS. In the period between January and December of 2005, it was gathered, monthly, samples of 500mL of water in 12 different parts of the Lagoon. The samples were filtered through a membrane of acetate of cellulose (0,45), under a negative pressure for the material retention. After the material elution, through the Tween 80 solution to 0, 1%, the material was concentrated by centrifugation in 1500 rpm, during 15 minutes. For the initial research of protozoa, it was achieved the direct exam in breezy of the material, as well as the material concentrated by the centrifugal-flotation technique in solution of sulfate of zinc. For the research of oocysts of *Cryptosporidium* spp., they were achieved concurrently the techniques of concentration centrifugal-flotation of Sheather and centrifugal-sedimentation by formol ether, with the posterior coloration with the Kinyoun technique. For the research of free-living amoebas, it was made the culture of one aliquot of each water sample in non-nutrient agar inoculated with inactive *Escherichia coli*. Aliquots originated of the eluted material from the membrane and of the culture were ruddy by trichrome, for the diagnosis of protozoa cysts. In the gathering places of the samples it was sized pH, saltiness and water temperature. The research of total coliforms and *Escherichia coli* was achieved by the technique of multiple tubes. In the analysis of the 12 parts, during the 12 months of water gathering, it was observed that 91,7% were infected with protozoa that can infect human beings; *Cryptosporidium* spp. (16,7%), *Acanthamoeba* spp. (91,7%), *Naegleria* spp. (25%) and *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (8,3). Total coliforms (more than 5.000/100mL) and *Escherichia coli* (more than 1.000/100mL) were secluded in all the harvested samples, showing water contamination by cloacal sewer. The temperature, the saltiness and water pH, do not influenced in the detection do protozoa, except for *Acanthamoeba* spp. That presented bigger frequency when the water saltiness was under or equal 0,6% ($p < 0,05$). The presence of organic substance in the closeness of the places of samples gathering influenced in the detection of protozoa in general, as well as the creation of animals

for the detection of *Naegleria* spp. ($p < 0.05$). The observation of water contamination for pathogenic parasites to man and the indications of fecal contamination, suggest better action of sanitary planning, as well as preventive and educative steps in order to avoid the human infection.

Keywords: *Cryptosporidium*. *Acanthamoeba*. *Naegleria*. Water. Contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Pontos de colheita das amostras de água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS (COSTA, 2006 - no prelo).....	41
Figura 2	Ponto de colheita número 01, Croa do Boi, Bairro Santa Tereza.....	44
Figura 3	Ponto de colheita número 02, próximo ao Terminal de <i>Containers</i> na Quarta Secção da Barra.....	44
Figura 4	Ponto de colheita número 03, Prainha da Quarta Secção da Barra.....	44
Figura 5	Ponto de colheita número 04, rua Visconde de Mauá, bairro São João.....	44
Figura 6	Ponto de colheita número 05, rua Rodrigo Duarte, bairro São Miguel.....	44
Figura 7	Ponto de colheita número 06, final da rua XV de Novembro, bairro Cidade Nova	44
Figura 8	Ponto de colheita número 07, próximo ao posto de Hortifrutigranjeiros.....	45
Figura 9	Ponto de colheita número 08, próximo a Estação Hidroviária de Rio Grande/São José do Norte, próximo ao Porto Velho	45
Figura 10	Ponto de colheita número 09, Avenida Honório Bicalho.....	45
Figura 11	Ponto de colheita número 10, desembocadura do Arroio Vieira no Saco da Mangueira.....	45
Figura 12	Ponto de colheita número 11, rua Dr. Raul Pilla.....	45
Figura 13	Ponto de colheita número 12, rua Forte Santana.....	45
Figura 14	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp, coloração de Kinyoun (1000X).	51
Figura 15	Cistos de <i>Acanthamoeba</i> spp. em meio de cultura de ágar não nutriente enriquecido com <i>Escherichia coli</i> (inativada) (400X).....	51

Figura 16	Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp. retirado do meio de cultura de cultura de ágar não nutriente enriquecido com <i>Escherichia coli</i> (inativada) e observados em solução salina 0,85% (400X).....	52
Figura 17	Trofozoíto de <i>Naegleria</i> spp. em meio de cultura de ágar não nutriente enriquecido com <i>Escherichia coli</i> (inativada) (400X).....	52
Figura 18	Cisto de <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> no exame direto do sedimento, com lugol (400X).....	52
Figura 19	Figura 19 - Freqüência de protozoários, de interesse humano, detectados em relação ao número de pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, no período de janeiro a dezembro de 2005.....	53
Figura 20	Freqüência de positividade dos pontos de colheita de água da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, por <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> e por coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> no período de janeiro a dezembro de 2005.....	54
Figura 21	Freqüência de positividade dos pontos de colheita de água da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, por amebas de vida livre, potencialmente patogênicas, no período de janeiro a dezembro de 2005.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Surtos de criptosporidiose associados ao uso de água recreacional.....	29
Tabela 2	Surtos de criptosporidiose associados ao consumo ou contato com águas contaminadas.....	30
Tabela 3	Frequência de protozoários em cada ponto de colheita de água na Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, no período de janeiro a dezembro de 2005 (n=12).....	53
Tabela 4	Influência da salinidade da água na detecção de protozoários.....	55
Tabela 5	Influência da salinidade da água na detecção de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	56
Tabela 6	Influência das estações do ano na detecção de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	57
Tabela 7	Influência da presença de matéria orgânica na detecção de protozoários.....	57
Tabela 8	Influência da criação de animais na detecção de <i>Naegleria</i> spp....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADM – Método de Diluição da Membrana em Acetona
APHA – American Public Health Association
CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EAG – Encefalite Amebiana Granulomatosa
EUA – Estados Unidos da América
FURG – Fundação Universidade do Rio Grande
HAART – Terapia Anti-Retroviral Altamente Potente e Efetiva
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC – Intervalo de Confiança
IDH – Índice de Desenvolvimento Humano
MAP – Meningoencefalite Amebiana Primária
NEAS – Núcleo de Estudos em Administração e Saúde Coletiva
OMS – Organização Mundial de Saúde
OR – Razão de Chance
PAS – *Periodic Acid-Schiff*
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
RJ – Rio de Janeiro
RM – Método de Raspagem da Membrana
RS – Rio Grande do Sul
SP – São Paulo
UCPEL – Universidade Católica de Pelotas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos.....	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	Importância da água para os seres humanos.....	19
3.2	A água como veículo de agentes parasitários.....	20
3.3	Protozoários veiculados pela água.....	22
3.3.1	<i>Cryptosporidium</i> spp.....	22
3.3.1.1	Taxonomia e Morfologia.....	23
3.3.1.2	Ciclo de vida.....	24
3.3.1.3	Infectividade e Transmissão.....	25
3.3.1.4	Criptosporidiose humana.....	26
3.3.1.5	Freqüência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de água....	27
3.3.1.6	Surtos de criptosporidiose por veiculação hídrica.....	29
3.3.1.7	Métodos para a pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de água	30
3.3.2	Amebas de vida livre.....	32
3.3.2.1	Taxonomia e Morfologia.....	32
3.3.2.2	Ciclo de vida e Transmissão.....	33
3.3.2.3	Quadro Clínico.....	34
3.3.2.3.1	Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP).....	34
3.3.2.3.2	Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG).....	34
3.3.2.3.3	Ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	35
3.3.2.4	Contaminação ambiental por amebas de vida livre e relato de caso de infecção humana no Brasil.....	35
3.3.2.5	Métodos para a pesquisa de amebas de vida livre.....	36
3.3.3	<i>Giardia lamblia</i>	37
3.3.4	<i>Entamoeba</i> spp.....	38

4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	Seleção do local do estudo.....	40
4.2	Caracterização das áreas e dos pontos de colheita das amostras.....	40
4.2.1	Área “A” – Canal do Rio Grande.....	40
4.2.2	Área “B” – Canal do Norte.....	42
4.2.3	Área “C” – Saco da Mangueira.....	43
4.3	Amostras.....	43
4.3.1	Colheita das amostras.....	46
4.4	Pesquisa dos protozoários.....	46
4.4.1	Extração dos protozoários.....	46
4.4.2	Pesquisa de cistos de protozoários.....	46
4.4.2.1	Exame microscópico direto.....	47
4.4.2.2	Centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco.....	47
4.4.2.3	Coloração pelo tricrômio.....	47
4.4.3	Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	47
4.4.3.1	Centrífugo-sedimentação pelo formol-éter (Técnica de Ritchie).....	48
4.4.3.2	Centrífugo-flutuação em solução de sacarose (Técnica de Sheather).....	48
4.4.3.3	Coloração ácido resistente de Kinyoun modificada.....	48
4.4.4	Pesquisa de amebas de vida livre pertencentes aos gêneros <i>Acanthamoeba</i> e <i>Naegleria</i>.....	49
4.5	Pesquisa de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>.....	49
4.6	Parâmetros físico-químicos das amostras de água.....	50
4.7	Análise Estatística.....	50
5	RESULTADOS.....	51
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÕES.....	65
8	REFERÊNCIAS.....	66
	APÊNDICES.....	77

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores potenciais de água continental; superficial e subterrânea. Este potencial deve ser visto como um capital ecológico de inestimável importância e como fator competitivo fundamental para o desenvolvimento socioeconômico sustentado. Em contrapartida, a água é um meio pelo qual agentes infecciosos podem se alastrar com grande velocidade e frequência, fazendo-se necessário controlar ou atenuar a poluição aquática e suas implicações biológicas, que representam séria ameaça à saúde pública (FERREIRA, 2003).

A contaminação da água é responsável por 80% das doenças que ocorrem nos países em desenvolvimento. Cerca de 15 milhões de crianças de zero a cinco anos morrem anualmente pela falta ou deficiência dos sistemas de abastecimento de água e esgotos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS, 1984).

O crescimento demográfico, a urbanização desordenada e o desenvolvimento industrial comprometem os recursos hídricos e prejudicam os sistemas de saneamento público, os quais passam a operar com sobrecargas e com deficiências, aumentando o risco de ocorrência de doenças de veiculação hídrica (MIRANDA & TEIXEIRA, 2004).

Segundo Libânio *et al.* (2005), a disponibilidade hídrica associada aos serviços essenciais para a população, como o abastecimento de água e de esgotamento sanitário, são condições importantes para garantir o seu bem estar social e o estabelecimento de condições salubres que permitem o pleno desenvolvimento humano. De acordo com os autores, a maioria dos países com Índice de Desenvolvimento Humano elevado ($IDH > 0,7$) e alta longevidade (esperança de vida superior a 60 anos), apresentam maior cobertura dos serviços de saneamento: cobertura de água e de esgoto acima de 60% e 50%, respectivamente.

Dentre os parasitos transmitidos aos seres humanos, através da água, destacam-se os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia* por permanecerem viáveis por vários meses na água entre 4 e 10°C (HSU *et al.*, 1999). Heller *et al.* (2004) citaram que as principais fontes de contaminação de mananciais por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia lamblia*, são os esgotos

sanitários, bem como os dejetos e efluentes de atividades agropecuárias, principalmente nos países em desenvolvimento.

O protozoário *Giardia lamblia* foi identificado como agente etiológico de 18,3% (92/502) dos surtos que ocorreram nos Estados Unidos da América (EUA), no período de 1971 a 1985, todos relacionados com o consumo de água (DUBEY *et al.*, 1990).

Os cistos de *G. lamblia* podem sobreviver de 28 a 56 dias, estando o tempo da sua sobrevivência relacionado com temperaturas baixas (CARDOSO *et al.*, 2003), além disso, a sua dose infectante é baixa, ao redor de 10 a 130 cistos (TZIPORI & WARD, 2002). Este parasito é considerado como uma das principais causas de diarreia nos países em desenvolvimento, infectando cerca de 10 a 15% da população mundial (GUIMARÃES & SOGAYAR, 2002).

Entre os anos de 1984 e 1996, vários surtos de criptosporidiose transmitidos pela água foram relatados em diferentes países, sendo que a maioria deles ocorreu no Reino Unido, EUA e Japão. O primeiro surto ocorreu em 1984, no Texas, EUA, onde 79 pessoas foram afetadas. O maior surto de criptosporidiose registrado foi o de Wisconsin, EUA, em 1993, atingindo 403 mil pessoas (SMITH & ROSE, 1998).

O protozoário *Entamoeba histolytica* apresenta distribuição geográfica mundial e a sua presença está relacionada diretamente com as deficiências dos serviços de saneamento básico. A importância da pesquisa deste protozoário na água, reside no fato de que um dos principais mecanismos de transmissão é através do consumo de água contaminada ou consumo de alimentos crus que tenham sido irrigados com águas poluídas (REY, 2002).

Outros protozoários de interesse humano, veiculados pela água, que merecem destaque, são as amebas de vida livre pertencentes aos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, que habitam ambientes aquáticos, tais como piscinas, lagoas, rios, solos úmidos e esgoto (NEVES, 2003). Estas amebas são denominadas como potencialmente patogênicas, pois podem comportar-se como parasitos facultativos de seres humanos, causando óbito ou incapacidade permanente (MARTINEZ, 1985). A presença destas amebas está associada a fungos, bactérias, algas e outros protozoários, que são utilizados como substratos alimentares (RUTHES *et al.*, 2004). Espécies destes dois gêneros foram isoladas em todos os continentes, em diferentes altitudes, e apresentam resistência à

desinfecção por cloro e seus derivados e a variadas condições de temperatura e de pH (SILVA & ROSA, 2003).

Muitos estudos sobre parasitos transmitidos por veiculação hídrica têm sido feitos em vários países, entretanto, no Brasil, dados sobre a freqüência destes patógenos no meio ambiente ainda são escassos (FRANCO *et al.*, 2001; CARDOSO *et al.*, 2003; HELLER *et al.*, 2004).

No Brasil, os serviços de esgotamento sanitário são precários, sendo que apenas 20% dos domicílios têm o seu esgoto tratado, enquanto que o restante dos domicílios serve-se de fossas sépticas, fossas rudimentares ou eliminação dos dejetos em rios ou valas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2000).

A cidade do Rio Grande, situada ao sul do Rio Grande do Sul, é banhada ao norte do seu território pela Laguna dos Patos, a qual desempenha importante papel na atividade pesqueira, além de ser usada como local para banho, nos meses de verão, pela população residente nos seus arredores. Como a maioria dos municípios brasileiros, a cidade do Rio Grande também apresenta deficiências na coleta e no tratamento do esgoto cloacal. Dos 56 mil domicílios, apenas 17 mil são ligados à rede de esgoto, os restantes possuem fossa séptica, fossa rudimentar e alguns eliminam os dejetos diretamente na laguna (IBGE, 2000; NÚCLEO DE ESTUDOS EM ADMINISTRAÇÃO E SAÚDE COLETIVA - FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE – NEAS-FURG, 2006).

Diante disso, torna-se relevante pesquisar a contaminação, por parasitos patogênicos ao homem, na água da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, onde em diversos pontos desembocam efluentes de esgotos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a contaminação por protozoários de interesse humano em diferentes pontos da água da Laguna dos Patos, na cidade do Rio Grande, RS, visando despertar a necessidade de melhorias nas ações de planejamento sanitário.

2.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar a frequência de protozoários, parasitos do homem, adaptados às condições de salinidade, temperatura e pH, da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS.
- Estimar a frequência de amebas de vida livre, potencialmente patogênicas ao homem, na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS.
- Investigar a contaminação da água da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, por protozoários de origem fecal.
- Comparar os resultados da contaminação da água por protozoários de origem fecal com os obtidos da pesquisa de coliformes totais e fecais; metodologia padrão para indicar contaminação ambiental.
- Investigar a influência do pH, salinidade e temperatura da água, estações do ano, presença de matéria orgânica (lixo, fezes) nas proximidades dos pontos de colheita, na detecção de protozoários de interesse humano.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importância da água para os seres humanos

Cerca de três quartos da superfície terrestre são recobertos por água, sendo que 97,30% do total são representados pelos oceanos (águas impróprias para o consumo e para utilização na agricultura), 2,34% por gelo (podendo ser aproveitada somente por meio de lençóis subterrâneos), restando 0,36% para o uso humano, os quais estão localizados em rios, lagos e pântanos (HELLER, 1998).

A água é uma substância indispensável para a sobrevivência de todos os seres do planeta, desempenhando papel fundamental na manutenção dos ecossistemas. A água é um alimento que, embora não tenha valor energético, contribui fundamentalmente para a edificação do organismo, fazendo parte da composição celular de maneira preponderante. Aproximadamente, 70% do corpo humano são constituídos por água e a perda de 10% da água do corpo de uma pessoa promove alterações fisiológicas importantes (BRANCO, 1978).

Além da importância para o ser humano, a água pode ser usada para diversos fins, como para o abastecimento das cidades, irrigação na agricultura, pecuária, aquíicultura, geração de força motriz e energia, na navegação fluvial e em atividades de lazer. Segundo a Organização das Nações Unidas, está prevista para o ano de 2025 a “crise da água”, quando cerca de cinco bilhões de pessoas terão dificuldades de acesso à água, caso não haja uma mudança nos padrões de consumo, uso e conservação dos mananciais (FERREIRA, 2003). De acordo com os indicadores do Banco Mundial, aproximadamente 80 países já enfrentam problemas com a escassez de recursos hídricos; entre eles estão os situados no Oriente Médio, no sul da África e regiões da Índia e China (BRASIL, 2000a).

Nas cidades de médio e grande porte, tem-se constatado que a captação da água para o abastecimento da população ocorre em locais cada vez mais distantes dos centros de distribuição. Isto se deve, principalmente, ao lançamento de dejetos, sem controle ou tratamento, nos recursos hídricos próximos às cidades, levando à deterioração da qualidade destas águas (HELLER, 1998).

Os corpos de água localizados próximos às cidades também são usados como locais de recreação pela população que reside nos seus arredores. A contaminação destes locais por esgotos sanitários expõe os banhistas a riscos de infecção, devido à presença de bactérias, vírus e protozoários (ROSE *et al.*, 2002).

Dos recursos hídricos de água doce disponíveis no mundo, 19% estão no Brasil (BRASIL, 2002). Vários códigos e leis foram promulgados, visando à preservação da água. Em 1934, foi criado o Código das Águas e em 1981, através da Lei Federal número 6.938, foi instituída a Política Nacional do Meio Ambiente (BRASIL 1997a). A Lei Federal número 9.433, de 1997, instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos (BRASIL, 1997b). Em 2000, para definir e implantar a Política Nacional de Recursos Hídricos e do Sistema de Gestão, foi criada a Agência Nacional da Água, através da Lei Federal número 9.984 (BRASIL, 2005).

Dos recursos naturais, a água é o mais vulnerável, pois a água que hoje é utilizada é a mesma de milhões de anos, mudando apenas o seu estado (líquido, gasoso e sólido). Entretanto, hoje é considerada como um bem finito, pois dependendo do tipo de poluição a sua renovação estará comprometida, assim como a própria sobrevivência dos seres humanos (SANTOS, 2000).

3.2 A água como veículo de agentes parasitários

Apesar de a humanidade necessitar da água para sua própria sobrevivência, é a sua principal fonte de poluição. O crescimento da população, a desordenada urbanização, o aumento na quantidade de despejos domésticos e de resíduos industriais, aliados à deficiência da infra-estrutura sanitária, fizeram com que se tornasse incompatível a absorção natural desses dejetos pelo meio ambiente (BRINGHENTI, 1999).

O uso de águas contaminadas por despejos domésticos representa um dos principais riscos à saúde pública, devido à estreita relação entre a qualidade da água e inúmeras enfermidades que acometem as populações, especialmente aquelas não atendidas por serviços de saneamento (SANTOS, 1989).

A observação de microorganismos patogênicos na água propiciou a elaboração da hipótese de que sua presença era decorrente de dejeções de pessoas infectadas, uma vez que tais microorganismos não são gerados espontaneamente na água. Baseando-se nisso, o controle de patógenos provenientes de dejetos humanos passou a ser realizado através de medidas

visando caracterizar e mensurar as concentrações de material fecal na água (BRANCO, 1978).

Tanto em âmbito nacional quanto internacional, a avaliação da qualidade da água baseia-se na detecção e quantificação de coliformes totais e coliformes fecais (*Escherichia coli*). As bactérias do grupo coliforme são consideradas os principais indicadores de contaminação fecal, visto que habitam o intestino humano e de animais homeotermos (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA 20, 1986; LIMA *et al.*, 1999). A determinação da concentração deste grupo de bactérias indica a possibilidade da presença de vários patógenos que são veiculados pela água (BERNARD, 1973; LEWIS, 1986), tais como os agentes etiológicos das seguintes doenças parasitárias: giardose, criptosporidiose, amebose e ascariose (MOTA, 1997).

Segundo o relatório do V Fórum Global 2000 do Conselho Mundial de Colaboradores em Água Potável e Saneamento da Organização Mundial de Saúde, 2,4 bilhões de pessoas no mundo não têm esgoto e 1,1 bilhão não recebe água em condições adequadas. Este déficit em saneamento básico e o uso destas águas contaminadas geram graves problemas para a saúde, ocorrendo quatro bilhões de casos de diarreia por ano no mundo, com 2,2 milhões de óbitos. No relatório consta que 10% da população mundial estão infectados por parasitos intestinais, seis milhões de pessoas apresentam cegueira por causa de doenças infecciosas e 200 milhões sofrem de esquistossomose (BRASIL, 2000b).

A precariedade dos serviços públicos de água e esgoto no Brasil faz com que 65% das internações hospitalares estejam associadas a doenças de veiculação hídrica, o que contribui para que o país apresente a quarta maior taxa de mortalidade infantil da América Latina (ANDREOLI *et al.*, 1995).

Como já foi citado, existem vários parasitos que podem ser transmitidos por veiculação hídrica, mas aquele que tem causado maior preocupação com relação ao tratamento de água e esgoto é o coccídeo *Cryptosporidium* spp.. Esta preocupação faz sentido por este ser um protozoário que sobrevive no meio ambiente aquático por longo tempo, resiste à desinfecção com cloro e causa infecção com baixa contagem (10 a 100) de oocistos (CHEN *et al.*, 2002). Além disso, a ausência de *Escherichia coli*, indicador de poluição fecal, não caracteriza a ausência de *Cryptosporidium* spp., uma vez que a primeira é sensível à pequenas concentrações de cloro (ARAÚJO, 2003).

3.3 Protozoários veiculados pela água

3.3.1 *Cryptosporidium* spp.

O gênero *Cryptosporidium* foi descrito pela primeira vez por Ernest Edward Tyzzer em 1907, nos EUA, examinando glândulas pépticas de camundongos, denominando-o de *Cryptosporidium muris*. Uma segunda espécie, *C. parvum*, foi identificada em 1912 pelo mesmo autor, parasitando o intestino delgado de camundongos. Estes protozoários são parasitos intracelulares e se localizam nas microvilosidades das células epiteliais intestinais (CARNEIRO *et al.*, 1995).

Inicialmente foi considerado comensal, mas a partir da década de 50 do século passado, despertou interesse veterinário, devido à sua associação com infecção e mortalidade em aves, causada pela espécie *C. meleagridis*. A importância deste parasito aumentou na década de 70 quando o gênero foi associado à diarreia em terneiros (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996).

Os dois primeiros casos de criptosporidiose humana foram relatados nos EUA, em 1976. No primeiro, o parasito foi detectado na mucosa intestinal de um paciente imunocomprometido e no segundo a parasitose foi diagnosticada em uma menina, com três anos de idade, apresentando gastroenterite (MEISEL *et al.*, 1976; NIME *et al.*, 1976).

Com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, no início da década de 80 do século XX, ocorreu aumento do número de relatos de criptosporidiose humana, principalmente em pacientes imunocomprometidos (MULLER, 1999). O coccídeo *Cryptosporidium* spp. também tem sido considerado como principal agente etiológico de diarreia entre crianças com idade superior a um ano e inferior a dois anos (MOITINHO *et al.*, 1997). A partir de 1984, este parasito foi associado a surtos de diarreia, devido ao consumo de água contaminada e também pelo contato com águas destinadas à recreação, mas somente em 1993, com o surto ocorrido em Milwaukee, Wisconsin, EUA, esta parasitose foi reconhecida como problema de saúde pública (FAYER, 2004).

3.3.1.1 Taxonomia e Morfologia

O gênero *Cryptosporidium* pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriina, Família Cryptosporidiidae.

Desde a descrição de *C. muris* e de *C. parvum*, por Tyzzer, várias espécies têm sido identificadas, parasitando diferentes classes de hospedeiros como aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos, incluindo o homem (O'DONOGHUE, 1995).

A espécie *C. parvum* é a mais freqüentemente registrada, sendo relatada em mais de 150 espécies de mamíferos (FAYER *et al.*, 2000). O emprego de técnicas moleculares possibilitou a diferenciação de *C. parvum* em onze genótipos (humano, macaco, suíno, bovino, canino, furão, cervídeos, eqüino, leporino, camundongo e marsupial) (ABE *et al.*, 2002; RYAN *et al.*, 2003).

Um grupo de pesquisadores, baseando-se em estudos de biologia molecular e na especificidade de hospedeiro, propôs que o genótipo humano (tipo 1) de *C. parvum* fosse considerado uma nova espécie, *C. hominis*, responsável somente por infecções em humanos (MORGAN-RYAN *et al.*, 2002). Entretanto, esta espécie já foi diagnosticada infectando, em condições de laboratório, animais como cordeiros e carneiros (AKIYOSHI *et al.*, 2002).

Diversas descrições de espécies de *Cryptosporidium* foram feitas durante as últimas duas décadas, decorrentes da falta de critérios para a descrição de uma nova espécie, da pouca diferença morfológica entre as espécies e da baixa especificidade para hospedeiros (XIAO *et al.*, 2004). Estas descrições foram baseadas na morfologia, histopatologia, especificidade do hospedeiro e/ou na biologia molecular (LINDSAY *et al.*, 2000; FAYER *et al.*, 2001; ALVAREZ-PELLITERO & SITJA-BOBADILHA, 2002; MORGAN-RYAN *et al.*, 2002). Entretanto, no VI Encontro de Epidemiologia Molecular e Evolução Genética de Doenças Infecciosas no Instituto Pasteur, França, foram revistos os critérios atuais usados para nomear as espécies de *Cryptosporidium*, bem como propor critérios mais apropriados para o uso no futuro. Foram sugeridas quatro exigências básicas ao nomear e validar uma espécie: estudos morfométricos dos oocistos; caracterização genética; demonstração de hospedeiro natural e, se viável, demonstração de ao menos um hospedeiro infectado experimentalmente; e respeito aos critérios do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (MEEGID, 2002).

Atualmente, são reconhecidas as seguintes espécies: *C. andersoni* (bovinos), *C. baileyi* (galinhas e outras aves), *C. canis* (cães), *C. felis* (gatos), *C. galli* (aves), *C. hominis* (homem), *C. meleagridis* (aves e humanos), *C. molnari* (peixes), *C. muris* (roedores e outros mamíferos), *C. parvum* (mamíferos e humanos), *C. wrairi* (porquinho-da-índia), *C. suis* (suínos) *C. saurophilum* (lagartos e serpentes), *C. serpentis* (serpentes e lagartos). Além das espécies *C. hominis* e *C. parvum*, que são as mais importantes e mais freqüentes para o homem, também foram registradas em humanos as espécies *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis* (XIAO *et al.*, 2002, 2004; FAYER, 2004), *C. baileyi* (DITRICH *et al.*, 1991) e *C. suis* (RYAN *et al.*, 2004).

3.3.1.2 Ciclo de vida

Cryptosporidium spp. é um parasito que infecta as células epiteliais do trato gastrointestinal, pulmões, faringe, esôfago, ductos biliares e canal pancreático (FARTHING, 2000; ROSE *et al.*, 2002).

O único estágio exógeno de *Cryptosporidium* é o oocisto esporulado, o qual possui quatro esporozoítos envolvidos por uma parede que confere resistência às condições adversas do meio externo (FAYER, 1997). Os oocistos são esféricos, medem 2 a 8 µm de diâmetro variando de acordo com a espécie, apresentam membrana externa fina, citoplasma finamente granuloso, e no seu interior são observados quatro esporozoítos livres em forma de "C", com um núcleo localizado centralmente (GARCIA, 1983). Os estágios intracelulares localizam-se em um vacúolo parasitóforo nas microvilosidades das células epiteliais (CURRENT & HAYNES, 1983).

Quando os oocistos esporulados (maduros) são ingeridos por um hospedeiro, ocorre a liberação dos esporozoítos no intestino delgado, os quais vão parasitar as microvilosidades das células epiteliais do trato gastrointestinal. Os esporozoítos transformam-se em trofozoítos e estes, em merontes tipo I, que por reprodução assexuada (merogonia), produzem no seu interior merozoítos, os quais podem invadir novas células, reiniciando a reprodução assexuada formando outros merontes tipo I, e novos merozoítos. Após, ocorre outro processo de reprodução assexuada (gametogonia), a qual resulta na formação dos gametas masculinos e femininos. Após a fecundação (reprodução sexuada), os zigotos no interior das microvilosidades das células epiteliais, diferenciam-se em oocistos, e estes por

reprodução assexuada (esporogonia), desenvolvem no seu interior quatro esporozoítos (CURRENT & GARCIA, 1991). Os oocistos esporulados são excretados juntamente com as fezes do hospedeiro, podendo infectar outro hospedeiro suscetível, ou causar a auto-infecção externa (SMITH & ROSE, 1998).

A auto-infecção interna pode desencadear infecções maciças e persistentes em pacientes imunocomprometidos (FRANZEN & MULLER, 1999).

3.3.1.3 Infectividade e Transmissão

Fayer & Leek (1984), em um estudo *in vitro*, pesquisaram condições para o desencistamento de *Cryptosporidium* e observaram que na água com pH 7,6 e a uma temperatura de 37°C, a taxa de desencistamento ocorreu em menos de uma hora, e foi maior do que na água com pH 6,0 e a 20°C.

Os oocistos de *Cryptosporidium* podem permanecer viáveis por vários meses no ambiente, sobrevivendo em média 176 dias na água doce e 35 dias na água do mar, resistindo à importantes variações de temperatura (CHAURET *et al.*, 1995). Quando mantidos entre 25 e 30°C, permanecem infectantes por três meses, assim como quando são submetidos a uma temperatura de -5 °C, permanecem viáveis por mais de dois meses. São pouco resistentes ao congelamento, sendo destruídos a -70°C. Em altas temperaturas (59,7°C), durante cinco minutos, ocorre uma rápida perda da viabilidade, e a dessecação é letal para os oocistos (FAYER *et al.*, 2000).

Okhuysen *et al.* (1999), observando pessoas saudáveis infectadas com diferentes doses de oocistos de *Cryptosporidium* sp., verificaram que a dose infectiva média (ID₅₀) foi de 132 oocistos.

Os oocistos são transmitidos de um hospedeiro infectado para um hospedeiro suscetível por via fecal-oral. Esta transmissão pode ocorrer por várias formas: de pessoa para pessoa por contato direto, incluindo atividades sexuais; de animal para animal; de animal para humano; de humano para animal; através de água de abastecimento ou água recreacional; ingestão de alimentos contaminados e através do ar (FAYER *et al.*, 2000).

Fatores biológicos, ambientais, climáticos e comunitários facilitam a transmissão desse coccídeo através da água. Como fatores biológicos, destacam-se a alta taxa de excreção de oocistos nas fezes do hospedeiro, a transmissão zoonótica e a baixa dose de infecção. Os fatores climáticos incluem a temperatura e

as chuvas, onde o aumento das precipitações está associado com altas concentrações de oocistos. Os fatores ambientais e comunitários estão relacionados com a descarga de esgotos na água e o tipo de tratamento da água (ROSE *et al.*, 2002).

3.3.1.4 Criptosporidiose humana

As manifestações clínicas da criptosporidiose, assim como a severidade e a duração desta doença, podem variar de pessoa para pessoa, sendo influenciadas pelo estado imune do hospedeiro (ADAL *et al.*, 1995).

O quadro clínico dessa doença caracteriza-se por uma gastroenterite, em que o sintoma mais importante é uma diarreia volumosa e aquosa, podendo algumas vezes apresentar muco, porém a presença de sangue e leucócitos é rara (FAYER, 2004). Outros sintomas que podem se manifestar em decorrência da infecção são: dor abdominal, náuseas, vômitos, anorexia, indisposição, fraqueza, perda de peso, cefaléia e febre baixa (abaixo de 39°C) (DE CARLI & SARAIVA, 1991). Pode ocorrer ainda, intolerância à lactose e má absorção de gorduras (REY, 1992).

A criptosporidiose em pessoas imunocompetentes apresenta-se como uma gastroenterite transitória, com período de incubação curto, entre quatro e 14 dias. A infecção pode manifestar-se com uma diarreia autolimitada, com cinco a 10 evacuações diárias, evoluindo espontaneamente para a cura (CENAC, 1984).

Em indivíduos imunocomprometidas a infecção é persistente, de longa duração, e o quadro clínico é mais severo, sendo que a diarreia pode levar o paciente até 30 evacuações diárias (12 –17L/dia). Este quadro pode durar semanas ou meses causando desequilíbrio hidroeletrólítico e desnutrição, podendo levar o paciente a óbito (DE CARLI & SARAIVA, 1991).

Em pessoas com imunossupressão (desnutrição, portadores do HIV, uso de quimioterapia para câncer), a severidade da doença está relacionada com o grau de deterioração da imunidade celular. Quando a contagem de linfócitos T CD4 for maior que 180 células/mm³, os pacientes apresentam uma diarreia geralmente autolimitada, enquanto que pacientes com contagem de CD4 menor que 140 células/mm³ apresentam diarreia persistente e de longo curso. Alguns estudos têm sido realizados para explicar o mecanismo da infecção causada pelo *Cryptosporidium* sp. em humanos. A causa da diarreia profusa observada em alguns

pacientes seria devido à produção de enterotoxinas pelo *C. parvum* (FAYER, 2004; ANDRADE NETO & ASSEF, 1996).

Para o tratamento da criptosporidiose em pacientes imunocompetentes é recomendada a rehidratação oral ou parenteral, (FRANZEN & MÜLLER, 1999), uma vez que a infecção é autolimitada.

Em pacientes imunocomprometidos o tratamento é mais difícil, já que vários medicamentos como paromicina, azidotimidina, azitromicina, imunobloqueadores biológicos foram testados, porém ainda não há relato de resultados efetivos para a cura parasitológica (CARR et al., apud FRANZEN & MÜLLER, 1999). Estudos recentes mostraram que a nitazoxanida apresentou eficácia em crianças e adultos imunocompetentes, sendo a primeira droga liberada para o tratamento da criptosporidiose nos EUA, porém não foi testada suficientemente em pacientes imunocomprometidos (LIMA, 2005).

A aplicação da terapia anti-retroviral altamente potente e efetiva (HAART) em pacientes infectados com HIV, tem resultado na redução da gravidade da doença nos EUA (FAYER, 2004). Em Rio Grande, RS, foi observado que a prevalência de casos de criptosporidiose em pacientes com HIV atendidos no Hospital Universitário, diminuiu de 22,4% (11/49) no período pré-HAART (1994 a 1997), para 5% (4/80) no período pós-HAART (2000 a 2004) (FRANÇA *et al.*, 2005).

3.3.1.5 Frequência de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água aumenta a preocupação com a transmissão do parasito aos seres humanos, pois com a veiculação hídrica dos oocistos, um grande contingente da população pode ser atingido (LIMA & STAMFORD, 2003).

A descarga de esgoto em efluentes, embora sendo baixa, é uma fonte importante de contaminação do ambiente, pois águas superficiais destinadas ao abastecimento, irrigação e recreação que recebem estes despejos constituem em potencial fonte para infecções de seus usuários (SMITH & ROSE, 1998).

A pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em amostras de água, tem sido realizada em vários países. Ongert & Stibs (1987) pesquisaram *Cryptosporidium* sp. em 11 amostras de água de rios em Washington e na Califórnia, EUA, detectando oocistos deste parasito em 100% das amostras.

Boutros (1989) detectou *Cryptosporidium* spp. em 70% das 50 amostras de água superficiais examinadas, na Pensilvânia, EUA.

Lechevallier *et al.*, (1991) examinaram amostras de água de 66 estações de tratamento de 14 estados e uma província do Canadá, sendo analisadas as amostras de água antes do tratamento. Os autores observaram uma frequência de 96,5% (82/85) para oocistos de *Cryptosporidium* spp..

Wallis *et al.* (1996) pesquisaram protozoários em amostras de águas superficiais colhidas em diferentes regiões do Canadá e detectaram oocistos de *Cryptosporidium* em 4,5% (53/1.173) das amostras.

Em um estudo limitado de cinco amostras de água do Rio Kau-Ping, no sul de Taiwan, quatro foram positivas para *Cryptosporidium* (HSU *et al.*, 1999).

Luna *et al.* (2002) pesquisaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em sete amostras de água superficial bruta, provenientes dos Rios Virilla e Coronado, na Costa Rica, sendo detectada positividade em seis amostras. Estes resultados foram obtidos tanto na estação das chuvas, como na estação da seca.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram recuperados em ostras, mexilhões e aves que habitam as águas litorâneas da Irlanda, Espanha e EUA (FREIRE-SANTOS *et al.* 2002). Também foram detectados oocistos na água de praias localizadas na costa de Honolulu, Hawaii (JOHNSON *et al.*, 1995).

No Brasil, as pesquisas de *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático são mais recentes, sendo realizados no estado de São Paulo os principais trabalhos nesta área. Dias Junior (1999) observou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em sete das 12 amostras de águas superficiais analisadas, no município de Araras, SP.

Muller (1999), pesquisando oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 23 amostras de água bruta, colhidas em mananciais da região metropolitana de São Paulo, SP, obteve uma prevalência de 73,9% (17/23) para este parasito.

Franco *et al.* (2001), analisando as águas do Rio Atibaia, em Campinas, SP, detectaram oocistos de *Cryptosporidium* em 100% das amostras. Segundo os autores, esta alta prevalência foi justificada pelas intensas chuvas que ocorreram no período.

Em um estudo realizado nos municípios de Sorocaba e Votorantin, SP, foram analisadas amostras de água bruta de sete fontes naturais, sendo detectada a presença de *Cryptosporidium* spp. em uma amostra (GOMES *et al.*, 2002).

Farias *et al.* (2002) realizaram trabalho investigando a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 12 amostras de água de córrego, no município de São Paulo, SP, obtendo uma positividade de 100%.

3.3.1.6 Surtos de criptosporidiose por veiculação hídrica

Vários surtos de criptosporidiose por veiculação hídrica têm sido relatados nas últimas décadas. Rios, lagos, fontes naturais, águas subterrâneas e águas tratadas para o consumo humano têm sido indicados como fontes de infecção (FRANZEN & MÜLLER, 1999). Estes surtos têm sido associados ao contato com águas recreacionais contaminadas e ao consumo de água contaminada (CRAUN *et al.*, 1998).

Na tab. 1, são relatados os surtos de criptosporidiose pelo uso de água recreacional, relacionando com o meio em que houve a infecção, segundo Fayer *et al.* (2000).

Tabela 1 – Surtos de criptosporidiose associados ao uso de água recreacional.

ANO	LOCAL	Nº DE CASOS CONFIRMADOS	MEIO RECREACIONAL
1988	REINO UNIDO (Doncaster)	79	Piscina
1990	CANADÁ	23	Piscina
1992	EUA (Oregon)	52	Piscina
1993	EUA (Wisconsin)	22	Piscina (motel)
1994	EUA (Missouri)	26	Piscina (motel)
1994	EUA (New Jersey)	46	Lago
1994	AUSTRÁLIA (Sutherland)	70	Piscina
1995	EUA (Nebraska)	14	Parque Aquático
1996	EUA (Florida)	16	Piscina
1996	EUA (California)	29	Parque Aquático
1997	REINO UNIDO (Wales)	07	Rio
1997	EUA (Minnesota)	73	Fonte de água
1998	AUSTRÁLIA (Canberra)	210	Piscinas (03)
1998	NOVA ZELÂNDIA (HuttVal)	171	Piscinas

Na tab. 2, podem ser observados os principais surtos de criptosporidiose associados ao consumo ou contato com águas contaminadas, citados por Smith & Rose (1998) e modificado por Franzen & Müller (1999).

Tabela 2 – Surtos de criptosporidiose associados ao consumo ou contato com águas contaminadas.

LOCAL	ANO	Nº PESSOAS ATINGIDAS	POSSIVEL CAUSA DO SURTO
EUA (Texas)	1984	79	Contaminação por esgoto
REINO UNIDO (Sheffield)	1987	62	Desconhecida
EUA (Georgia)	1987	13.000	Falha no sistema de tratamento
REINO UNIDO (Escócia)	1988	27	Contaminação por fezes de gado
REINO UNIDO (Oxfordshire)	1989	516	Contaminação dos filtros (fezes de gado)
REINO UNIDO (Humberside)	1990	447	Passagem através dos filtros
REINO UNIDO (Isle of Thanet)	1990	>47	Falha no sistema de tratamento
EUA (Pennsylvania)	1991	551	Cloração da água insuficiente
EUA (Oregon)	1992	15.000	Cloração da água insuficiente
REINO UNIDO (Warrington)	1992	47	Contaminação por esgoto (chuva intensa)
REINO UNIDO (Yorkshire)	1992	125	Contaminação dos reservatórios (chuvas)
REINO UNIDO (Dorset)	1993	40	Fonte de contaminação desconhecida
EUA (Milwaukee)	1993	403.000	Contaminação da água por esgoto agrícola
EUA (Washington)	1993	03	Possível contaminação por fezes de gado
EUA (Nevada)	1994	78	Fonte de contaminação desconhecida
EUA (Washington)	1994	86	Contaminação da água por esgoto não tratado
JAPÃO (Kanagawa)	1994	461	Mal funcionamento da bomba do esgoto
EUA (Florida)	1995	72	Contaminação da rede de água de Camping
REINO UNIDO (Devon)	1995	575	Contaminação de água de rio, por esgoto
JAPÃO (Saitama)	1996	8.705	Oocistos em água tratada e não tratada
REINO UNIDO (Herterfordshire)	1997	32	Fonte de contaminação desconhecida

3.3.1.7 Métodos para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água

Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água, diferentes métodos têm sido propostos. Os métodos usados para a identificação destes oocistos em amostras ambientais são os mesmos empregados em análises clínicas (LIMA & STAMFORD, 2003), mas devido à baixa concentração destas formas evolutivas no meio aquático, faz-se necessário usar métodos para a concentração das amostras (LABERGE & GRIFFITHS, 1996).

A primeira etapa para a concentração de oocistos na água é a filtração da amostra, que pode ser feita através de filtros de polipropileno (JAKUBOWSKI *et al.*, 1996), de fibra de vidro e resina ou nylon (LECHEVALIER *et al.*, 1995) ou através de membranas filtrantes de diferentes porosidades, as quais têm demonstrado maior eficiência na recuperação destes microorganismos (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

Após a filtração, processa-se a eluição que pode ser por lavagem e raspagem da membrana (método RM) (FRANCO *et al.*, 2001) e dissolução da membrana em acetona (Método ADM) (FRANCO *et al.*, 2001; FARIAS *et al.*, 2002), sendo que as amostras tratadas pelo método RM têm apresentado maior taxa de recuperação de oocistos (FRANCO *et al.*, 2001).

A concentração propriamente dita dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., para posterior identificação, tem sido realizada por centrifugação do material eluído (LECHEVALIER *et al.*, 1995). Segundo Lechevalier *et al.* (1991), a variação da densidade do oocisto pode interferir na eficiência de recuperação dos mesmos, uma vez que oocistos de baixa densidade serão melhores recuperados em técnicas de flutuação, assim como aqueles de densidade mais alta serão recuperados com melhor eficiência em técnicas de sedimentação. Lima & Stamford (2003) recomendam a associação de técnicas de sedimentação com técnicas de flutuação.

Segundo Medema *et al.* (1998), é alta a proporção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais, aderidos à partículas como lodo, areia, plâncton, algas e cristais biológicos, provocando alteração da densidade dos oocistos. Smith & Rose (1990) citaram que a adição de soluções detergentes como Tween 20 e Tween 80 reduzem a agregação das partículas aos oocistos, mantendo-os como organismos individuais.

Para a identificação dos oocistos, Smith *et al.* (1989 apud LIMA & STAMFORD, 2003) citaram métodos de coloração (Kinyoun, Ziehl Neelsen modificado, auramina, giemsa e safranina – azul de metileno) e imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal. Os métodos de coloração pelos fluorocromos (auramina) apresentam alta sensibilidade, mas baixa especificidade, quando comparados com os por fucsina fenicada (Kinyoun ou Ziehl Neelsen) (DE CARLI & MOURA, 2001). Fayer *et al.* (2000) citaram também a reação em cadeia da polimerase (PCR) como uma técnica alternativa para a detecção deste parasito, salientando pela sua rapidez e alta sensibilidade. Entretanto, esta técnica pode sofrer interferência por substâncias contaminantes existentes no meio ambiente

(JAKUBOWSKI *et al.*, 1996). Diante disso, os métodos de coloração ácido resistente de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun, são os mais recomendados para identificação dos oocistos do gênero *Cryptosporidium*, porém não permitem a identificação confiável em nível de espécie (XIAO *et al.*, 2004).

Apesar de diferentes métodos terem sido desenvolvidos por vários pesquisadores, para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água, ainda não há uma metodologia mundialmente padronizada (SMITH, 1998; FAYER *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2002).

3.3.2 Amebas de vida livre

Segundo Foronda & Campos (1991), Culbertson em 1958, ao detectar numerosas amebas em cortes de cérebro de camundongos que haviam sido inoculados com líquido de cultura de tecido, em uma pesquisa sobre vacinação de poliomielite, deu uma importante contribuição sobre o conhecimento da patogenia das amebas de vida livre.

Fowler & Carter (1965), na Austrália, e Butt (1966), nos EUA, descreveram os primeiros casos de meningoencefalite por amebas de vida livre em seres humanos. A partir destes, novos casos foram diagnosticados, apontando as amebas dos gêneros *Naegleria* e *Acanthamoeba* como os principais agentes etiológicos (PAGE, 1974). No Brasil, Foronda (1976) e Campos *et al.* (1977) descreveram os primeiros casos desta doença.

A ceratite em humanos, causada por *Acanthamoeba* spp., foi descrita pela primeira vez na Inglaterra por Jones *et al.* (1975). No Brasil, os primeiros casos foram relatados por Nosé *et al.* (1988).

Diversas espécies de amebas de vida livre habitam ambientes aquáticos silvestres, piscinas, lagoas, rios, açudes, solos úmidos, húmus vegetal e esgoto, participando da cadeia biológica e da decomposição da matéria orgânica (NEVES, 2003).

3.3.2.1 Taxonomia e Morfologia

As amebas de vida livre, são protozoários potencialmente patogênicos, pertencem ao Filo Sarcomastigophora, Classe Lobosea. Esta classe divide-se em três Ordens: Schizopyrenida, Amoebida e Leptomyxida. Na Ordem Schizopyrenida está localizada a Família Schizopyrenidae, a qual é constituída por 14 gêneros, com

uma espécie patogênica: a *Naegleria fowleri*. A Ordem Amoebida possui a Família Hartmanellidae com 23 gêneros, dos quais o *Acanthamoeba* possui oito espécies de interesse em medicina: *A. cullbertsoni*, *A. castellani*, *A. rhyodes*, *A. polyphaga*, *A. royreba*, *A. astronyxis*, *A. hatchetti*, *A. palestinensis*. A identificação destas amebas para fins de diagnóstico tem sido feita apenas até gênero – *Acanthamoeba* (NEVES, 2005).

As amebas do gênero *Acanthamoeba* apresentam-se sob duas formas evolutivas: trofozoíto e cisto. O trofozoíto mede de 15 a 25 μm , tem um núcleo grande com nucléolo proeminente, apresenta movimentação lenta e do citoplasma partem pseudópodes espinhosos chamados acantopódios (IGLÉSIAS, 1997). O cisto é ligeiramente esférico, mede cerca de 20 μm , apresenta membrana externa ligeiramente enrugada e junções esparsas entre as membranas, o que confere a membrana interna um formato poligonal (ILLINGWORTH & COOK, 1998).

As amebas do gênero *Naegleria* apresentam-se sob três formas evolutivas: trofozoíto, forma biflagelada e cisto. O trofozoíto mede entre 10 e 20 μm , tem um núcleo com cariossoma central e grande, apresenta movimentação rápida através de pseudópodes do tipo lobópode. A forma biflagelada pode ser encontrada ao lado dos trofozoítos, apresentam aspecto piriforme, com dois flagelos que emergem do núcleo. Os cistos são uninucleados, esféricos, apresentam parede cística espessa e medem entre 7 e 10 μm (IGLÉSIAS, 1997; NEVES, 2003).

3.3.2.2 Ciclo de vida e Transmissão

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. podem penetrar através da pele lesada, pelas vias geniturinárias (IGLÉSIAS, 1997), pelo epitélio neuro-olfativo (SILVA & ROSA, 2003) e pela córnea lesada; devido ao uso de lentes de contato contaminadas ou pelo contato com água e soluções salinas caseiras contaminadas (ALVARENGA *et al.*, 2000). Podem chegar ao sistema nervoso central por via hematogênica ou via epitélio neuro-olfativo. Os cistos são encontrados em ambientes variados, inclusive nos tecidos humanos (SILVA & ROSA, 2003; NEVES, 2003).

As formas flageladas de *Naegleria* spp. podem invadir as fossas nasais de uma pessoa quando esta se banha em águas contaminadas, e ao entrarem em contato com a mucosa nasal transformam-se em trofozoítos ativos, que pela via epitélio neuro-olfativo atingem o cérebro e as meninges. Os cistos podem ser

encontrados no meio ambiente, no solo, em culturas envelhecidas, porém não são observados nos tecidos humanos (NEVES, 2003).

3.3.2.3 Quadro Clínico

As principais doenças causadas por amebas de vida livre são: meningoencefalite amebiana primária (MAP), encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e ceratite. Martinez (1985) citou que cerca de 160 casos de infecções por amebas de vida livre foram relatados na literatura. Posteriormente, Neves (2005), em sua revisão bibliográfica, relatou que já foram diagnosticados 345 casos de meningoencefalite causados por amebas de vida livre.

3.3.2.3.1 Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP)

O período de incubação é curto, variando de três a sete dias. Após este período, sintomas como cefaléia, vômitos e febre manifestam-se bruscamente, evoluindo para rigidez da nuca, desorientação e sonolência. O quadro clínico torna-se cada vez mais grave evoluindo para o coma e ao final de quatro a cinco dias, leva o paciente ao óbito (REY, 2002).

Todos os casos descritos de MAP têm etiologia atribuída a *Naegleria fowleri*. A doença inicia-se subitamente, com evolução clínica rápida e término fatal, acometendo jovens sadios que entraram em contato com água contaminada durante atividades de lazer em piscinas, lagos, açudes entre outros (FORONDA & CAMPOS, 1991).

3.3.2.3.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG)

A EAG é uma doença de evolução clínica lenta, podendo se prolongar por mais de 30 dias. As manifestações clínicas mais comuns são deficiências neurológicas focais, sinais de aumento de pressão intracraniana (FORONDA & CAMPOS, 1991), distúrbios mentais, alterações de comportamento, convulsões, hemiparesia, cefaléia e febre (39-40 °C) (MARTINEZ, 1985). Sintomas como dor de garganta, rinite, febre e cefaléia podem aparecer previamente ao comprometimento encefálico (IGLÉSIAS, 1997).

Esta doença é causada por várias espécies de amebas do gênero *Acanthamoeba* e ocorre usualmente em indivíduos debilitados, alcoólatras, doentes crônicos, usuários de medicação imunossupressora, e em pacientes

imunodeprimidos, tendo com fonte de infecção: piscinas, coleções de água, solo e ar (SILVA & ROSA, 2003).

3.3.2.3.3 Ceratite por *Acanthamoeba* spp.

As espécies isoladas com maior frequência em casos de ceratite são *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. rhysodes* (ALVARENGA *et al.*, 2000; SUÁREZ *et al.*, 2002; SILVA & ROSA, 2003).

A infecção manifesta-se geralmente unilateral, produzindo fotofobia, lacrimejamento e dor ocular (PALMER & HYNDIUK, 1993; ALVARENGA *et al.*, 2000). Com a progressão da doença, pode ocorrer formação de úlceras na córnea, levando à diminuição progressiva da acuidade visual, chegando inclusive à perda da visão (ALZAMORA *et al.*, 1994).

Na fase precoce da infecção, os achados são erosões epiteliais pequenas, edema microcístico envolvendo o epitélio corneal, conferindo a este um aspecto grosseiro em regiões esparsas. Com a progressão da infecção, ocorrem alterações do epitélio, apresentando lesões na forma de um dendrito. A limbite, o infiltrado perineural, o infiltrado em anel e os infiltrados subepiteliais são achados típicos na ceratite amebiana (ALVARENGA *et al.*, 2000).

Na fase tardia da infecção estão presentes o defeito epitelial e a opacidade estromal. A catarata é encontrada em um quinto dos pacientes, sendo creditada ao processo inflamatório intenso e uso de corticóide tópico (ILLINGWORTH & COOK, 1998).

Segundo Alvarenga *et al.* (2000), as lentes de contato podem levar à ruptura epitelial, facilitando a adesão amebiana à córnea, além de agirem como carreadoras do agente, uma vez que as amebas podem estar aderidas a elas.

Suárez *et al.* (2002) citaram como principais fatores de risco para esta patologia, além do uso de lentes de contato, o traumatismo da córnea e a exposição à água contaminada.

3.3.2.4 Contaminação ambiental por amebas de vida livre e relato de caso de infecção humana no Brasil

Foronda (1976) isolou amebas de vida livre da água de um açude em São Paulo, SP, e a considerou como a provável fonte de infecção de um paciente com meningoencefalite.

Salazar *et al.* (1982) isolaram amebas dos gêneros *Naegleria* e *Acanthamoeba*, a partir de coleções de água, na cidade do Rio de Janeiro, RJ, no período de 1978 a 1979. Os autores também analisaram 10 marcas de água mineral disponíveis no comércio, e verificaram que 60% delas estavam contaminadas por *Acanthamoeba* spp.

Giazzi (1996), estudando a prevalência de amebas de vida livre, potencialmente patogênicas, em 23 amostras de água, na cidade de Araraquara, SP, obteve uma positividade de 86,9% para *Acanthamoeba* spp. e de 39,1% para *Naegleria* spp.

Silva & Rosa (2003) examinaram 132 amostras de poeira de diferentes setores de dois hospitais do município de Presidente Prudente, SP, e observaram positividade de 45,5% (60/132) para *Acanthamoeba* spp. e de 3,8% (5/132) para *Naegleria* spp..

Ruthes *et al.* (2004) diagnosticaram conjuntivite por *Acanthamoeba* spp. em quatro pacientes do Hospital de Olhos do Paraná. Um dos pacientes não usava lentes de contato, mas semanalmente tomava banho de piscina em um clube. Os autores sugeriram que este foi o fator que tenha propiciado a infecção ocular pelo protozoário.

3.3.2.5 Métodos para a pesquisa de amebas de vida livre

Para a pesquisa dessas amebas em amostras de água, poeira, solo e no ambiente, a metodologia recomendada é o cultivo em ágar não nutriente, pois a ausência de nutrientes diminui a proliferação bacteriana. Ao ágar é adicionado *Escherichia coli* inativadas, que servirão de substrato para os parasitos (FORONDA, 1976; SALAZAR *et al.*, 1982; SILVA & ROSA, 2003).

Para a pesquisa de amebas em amostras biológicas, além do cultivo em ágar não nutriente, outros métodos têm sido empregados, dependendo do material a ser analisado. Para o diagnóstico de ceratite por *Acanthamoeba*, tanto em raspado como em material de biópsia corneal é recomendado o uso de imunofluorescência por ser um método de diagnóstico rápido e específico (EPSTEIN *et al.*, 1996; ALVARENGA *et al.*, 2000). As colorações utilizadas em material proveniente de biópsia da córnea são Gram, Giemsa, PAS, Tricrômio e *calcofluor-white* (ALVARENGA *et al.*, 2000; RUTHES *et al.*, 2004).

No líquor, a pesquisa desses protozoários é feita pelo cultivo e por coloração do material por hematoxilina ou May Grunwald-Giemsa, onde as amebas apresentam a sua morfologia característica (FORONDA & CAMPOS, 1991).

Lehmann *et al.* (1998) citaram que o PCR mostrou maior sensibilidade do que a cultura, em amostras de lágrimas e raspado corneal de pacientes infectados, por utilizar uma pequena amostra clínica para amplificação do DNA do parasito.

3.3.3 *Giardia lamblia*

A infecção causada pelo protozoário intestinal *Giardia lamblia* é considerada uma das principais causas de diarreia em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, onde a incidência da giardose é, geralmente, quatro vezes maior do que nos países desenvolvidos (GUIMARÃES E SOGAYAR, 2002), estando diretamente relacionado com as condições de saneamento básico (SCHWARSBACH, 2004).

A disseminação pelo consumo de água poluída com dejetos humanos, é uma das principais formas de transmissão de *Giardia lamblia*, já que diversos surtos associados à água foram registrados nos últimos anos, como os ocorridos em New Hampshire, Portland, Nova Iorque e Banf (CRAUN, 1986). Nos EUA, aproximadamente 30 surtos epidêmicos, devidos à água foram registrados entre 1942 e 1975 (REY, 2003).

Esse protozoário não apresenta especificidade quanto a hospedeiro, podendo parasitar, além de seres humanos, animais, despertando nos pesquisadores um maior interesse por seu potencial como agente de zoonoses. Análises moleculares têm demonstrado o mesmo genótipo de *Giardia* spp. presente em humanos e em outras espécies de mamíferos (THOMPSON *et al.*, 2000).

Giardia lamblia é um protozoário flagelado que apresenta duas formas: trofozoíto e cisto. A forma trofozoítica mede 10 a 20 µm de comprimento por 5 a 15 µm de largura, tem simetria bilateral e contorno piriforme. Na superfície ventral há uma área ovóide que constitui um disco adesivo ou disco suctorial, ocupando dois terços dessa face. No interior do citoplasma, as estruturas são quase sempre duplas e simétricas. Assim, há um par de núcleos, contendo um corpo central ou cariossomo, mas sem cromatina periférica. Dois feixes de fibras, ou axonemas, que se iniciam junto a oito blefaroplastos, percorrem o corpo longitudinalmente. Os cistos

são elipsóides ou ovóides e medem cerca de oito a 12 µm de comprimento. Têm uma membrana externa fina e bem destacada do citoplasma. Nas preparações coradas pelo Lugol ou nas coradas pela hematoxilina, vêem-se as estruturas internas que estão duplicadas em relação às do trofozoíto, isto é, quatro núcleos pequenos, quatro grupos de axonemas e de corpos parabasais (REY, 2003).

Os cistos são as formas infectantes, sendo, portanto, responsáveis pela disseminação da infecção. Estes são resistentes à cloração da água, ao congelamento e ao aquecimento até 60°C, permanecendo viáveis durante dois meses no meio exterior em condições favoráveis (ORTEGA E ADAM, 1997).

Na giardose pode-se encontrar uma forma aguda com duração de duas semanas a dois meses, ou então uma forma crônica, que pode durar de meses a anos (PICKERING & ENGELKIRK, 1998).

Na maioria dos casos, a infecção é resolvida espontaneamente e os sintomas desaparecem após algumas semanas. Nas infecções sintomáticas, os pacientes apresentam perda de apetite, esteatorréia e emagrecimento. Na diarreia crônica as principais complicações estão associadas à má absorção de gordura e nutrientes como vitaminas lipossolúveis, ferro, xilose e lactose. Em crianças, estas deficiências nutricionais, podem ter efeitos mais severos, causando retardo no desenvolvimento e no crescimento (GUIMARÃES *et al.*, 1999).

Reis *et al.* (2000) mostraram que há uma relação significativa entre a má absorção à lactose e a presença de parasitos intestinais. Esta relação revelou-se três vezes maior em crianças com parasitos intestinais em comparação com crianças não parasitadas, sendo *Giardia lamblia* o parasito mais frequentemente identificado.

Segundo Zajac (1992), a técnica indicada para a pesquisa de cistos de *Giardia lamblia* é a de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco, por ser uma técnica que se fundamenta na diferença de densidade específica entre os cistos e o restante do material contido na amostra.

3.3.4 *Entamoeba* spp.

A presença de cistos de *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica* em amostras de água pode ser considerada como indicador de contaminação fecal, uma vez que estes protozoários têm por hábitat o intestino grosso do ser humano (SILVA & GOMES, 2005).

Entamoeba coli tem distribuição mundial, sendo mais freqüente em regiões com condições sanitárias precárias. No intestino grosso do ser humano alimenta-se de bactérias e detritos alimentares, não invadindo tecidos, sendo considerada como ameba não patogênica (SILVA, 1999).

O complexo *Entamoeba histolytica* é formado por duas espécies: *Entamoeba histolytica*, considerada a forma patogênica, invasiva e apresenta diferentes graus de virulência, e *Entamoeba dispar*, não invasiva, sendo um protozoário não virulento. Estes protozoários pertencem ao Filo Sarcomastigophora, Subfilo Sarcodina, Superclasse Rhizopoda, Classe Lobosea, Ordem Amoebida e Família Entamoebidae. Apresentam distribuição geográfica mundial e a sua presença também está relacionada diretamente com as deficiências dos serviços de saneamento básico. Os indivíduos infectados podem apresentar duas formas clínicas: assintomática e sintomática, sendo que esta última pode ser intestinal (disentérica com colite, apenas disenterica, apenas colite, amebomas e apendicite amebiano) ou extra-intestinal (hepática, pulmonar, cerebral e cutânea) (SILVA & GOMES, 2005).

As coleções de águas superficiais como rios, córregos, valas e lagoas, estão expostas ao risco de contaminação por esgotos. Os cistos na água mantêm-se viáveis por cerca de 8 a 10 dias (REY, 2002; ARAÚJO, 2003). Os cistos são mortos a uma temperatura de 50°C e não resistem por mais de cinco minutos a temperaturas entre 2 e 6°C (ARAÚJO, 2003).

Entamoeba histolytica e *Entamoeba dispar*, por apresentarem morfologia idêntica, não são diferenciadas através da microscopia óptica, portanto quando estas são observadas em alguma amostra, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que seja relatada a presença de cistos ou trofozoítos de *E.histolytica/E.dispar* (SILVA & GOMES, 2005).

Embora não exista uma metodologia padronizada para a pesquisa de *Entamoeba* spp., em amostras de água, a técnica utilizada para a recuperação dos cistos destas amebas é a de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco, por serem estruturas leves e flutuarem em uma solução de densidade elevada (SILVA *et al.* 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção do local do estudo

O presente estudo foi realizado em diferentes pontos da Laguna dos Patos, a qual circunda a região norte da cidade do Rio Grande, RS. Três grandes áreas foram demarcadas ao redor da cidade, as quais foram denominadas de áreas A (Canal de Rio Grande), B (Canal do Norte) e C (Saco da Mangueira). Os fatores que influenciaram na escolha destes locais foram: a deterioração do meio ambiente, a utilização das águas destas áreas para recreação pela população que ali reside e/ou a atividade da pesca tanto para fins comerciais, assim como para fins de lazer.

As três áreas (A, B, C) foram subdivididas em 12 pontos para a colheita das amostras de água (Fig. 1). Estes pontos foram selecionados em função de apresentarem habitações nas proximidades, criação de animais, desembocadura de valas de esgoto e/ou desembocadura de emissários de esgoto tanto pluvial como doméstico. Os pontos próximos ao centro da cidade foram selecionados, especialmente, pelo maior fluxo de pessoas.

4.2. Caracterização das áreas e dos pontos de colheita das amostras

4.2.1 Área “A” – Canal de Rio Grande

A área “A” compreende desde a enseada da Croa do Boi, no Bairro Santa Tereza até a Quarta Secção da Barra, local próximo à desembocadura da Laguna dos Patos no Oceano Atlântico. Nesta área estão localizados os pontos de colheita 01, 02 e 03.

Ponto nº 01 (Fig. 2) - Croa do Boi, bairro Santa Tereza. Presença de emissário de esgoto doméstico desativado no início de 2004. Presença de habitações e moradias irregulares. Trapiche usado para pesca e atracação de pequenas embarcações. Presença de lixo e matéria orgânica nas margens da laguna.

Ponto n° 02 (Fig. 3) – Localizado próximo ao Terminal de *Containers* na Quarta Secção da Barra. Desembocadura de arroio proveniente de habitações ali localizadas e criação de animais (bovinos e eqüinos).

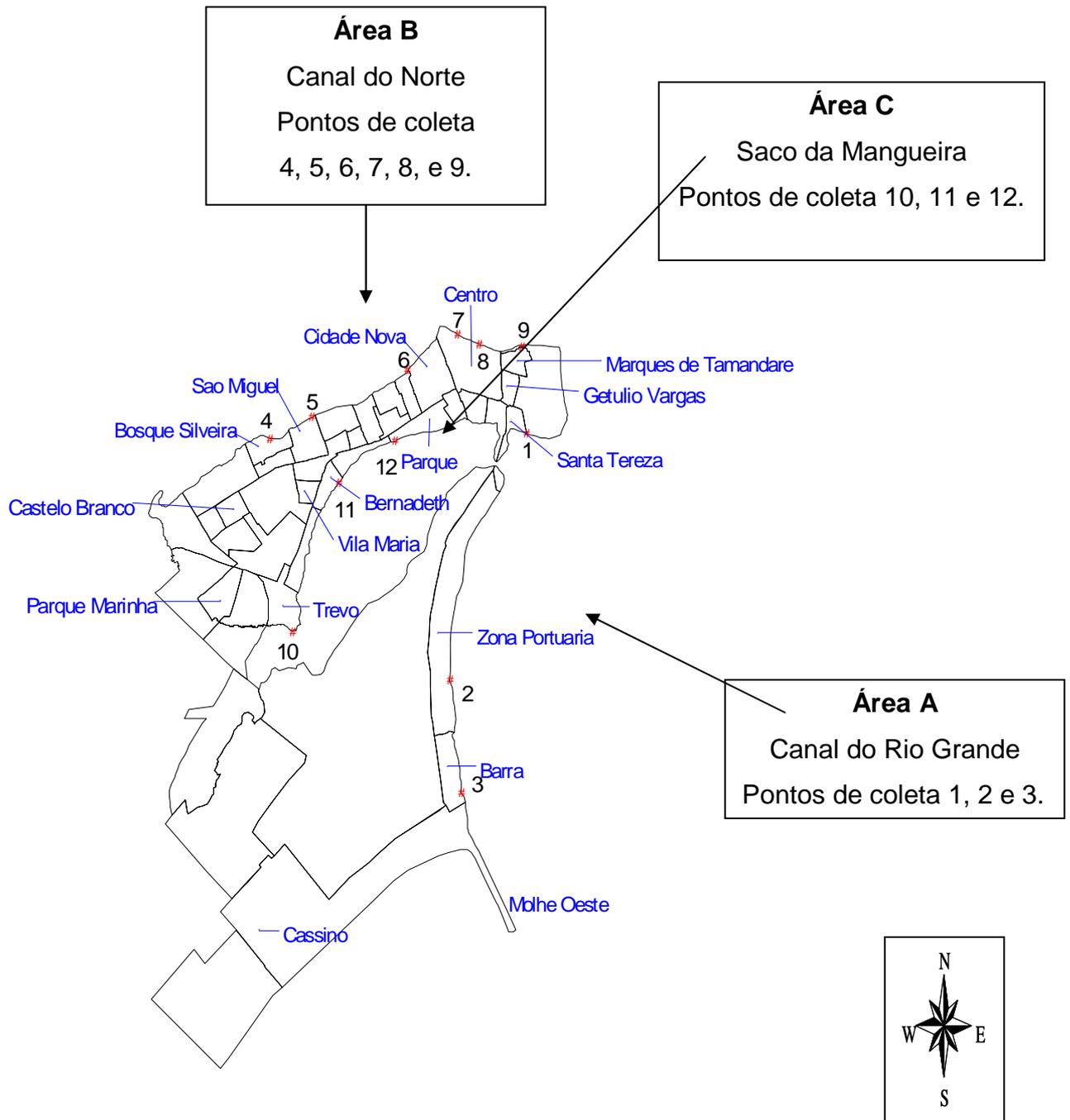


Figura 1. Pontos de colheita das amostras de água de diferentes pontos da Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS (COSTA, 2006).

Ponto n° 03 (Fig. 4) – Prainha da Quarta Secção da Barra. Local utilizado pela população que ali reside para pesca, banho e recreação. Local de atracação de embarcações de pesca de médio e pequeno porte. Presença de habitações nas proximidades e presença de lixo na margem da praia.

4.2.2 Área “B” – Canal do Norte

Na Área “B”, estão localizados os pontos de colheita 04, 05, 06, 07, 08 e 09; situados desde o bairro São João até a Avenida Honório Bicalho, próximo ao Esporte Clube Regatas.

Ponto n° 04 (Fig. 5) – Rua Visconde de Mauá, bairro São João, próximo a uma fábrica de pescados desativada. Saída de emissário de esgoto. Presença de habitações e moradias irregulares nas proximidades, com presença de lixo e matéria orgânica às margens da laguna. Local de atracação de pequenas embarcações.

Ponto n° 05 (Fig. 6) – Rua Rodrigo Duarte, bairro São Miguel. Saída de emissário de esgoto. Presença de habitações e moradias irregulares às margens da laguna. Trapiche para pesca e atracação de pequenas embarcações. Presença de lixo, matéria orgânica e de animais domésticos (cães e gatos).

Ponto n° 06 (Fig. 7) – Final da Rua XV de Novembro, bairro Cidade Nova. Saída de emissário de esgoto. Presença de lixo e matéria orgânica às margens da laguna. Presença de sub-habitações nas proximidades. Próximo a este ponto (cerca de 200 metros) são colocadas redes para a pesca de camarão.

Ponto n° 07 (Fig. 8) – Localizado a menos de 50 metros do Posto de Hortifrutigranjeiros e a menos de 200 metros de dois hospitais da cidade. Saída de emissário de esgoto. Local utilizado para pesca de lazer.

Ponto n° 08 (Fig. 9) – Localizado próximo a Estação Hidroviária de Rio Grande, próximo ao Porto Velho. Local utilizado para a pesca de lazer. Presença de habitações nas proximidades.

Ponto n° 09 (Fig. 10) – Localizado na Avenida Honório Bicalho, próximo ao Esporte Clube Regatas. Local utilizado para pesca de lazer e também muito procurado para banho e recreação. Presença de habitações nas proximidades.

4.2.3 Área “C” – Saco da Mangueira

Na área “C” estão localizados os pontos 10, 11 e 12, abrange desde a desembocadura do Arroio Vieira até a Rua Forte Santana, situada próximo ao pórtico de entrada da cidade.

Ponto nº 10 (Fig. 11) – Desembocadura do Arroio Vieira no Saco da Mangueira. No Arroio Vieira situado a oeste da cidade é lançado o efluente final da Estação de Tratamento de Esgotos do Parque Marinha, a qual possui processo de tratamento de esgotos em nível secundário.

Ponto nº 11 (Fig. 12) – Rua Doutor Raul Pilla. Presença de habitações e moradias irregulares. Local de atracação de embarcações de pequeno porte. Presença de lixo e matéria orgânica às margens da laguna. escoamento de valetas.

Ponto nº 12 (Fig. 13) – Rua Forte Santana. Saída de emissário de esgoto. Presença de lixo e matéria orgânica no local. Este ponto localiza-se nos fundos do Parque do Trabalhador, área utilizada para recreação e banho.

4.3 Amostras

No período de janeiro a dezembro de 2005, foi colhida, mensalmente, uma amostra de 500 mL de água de cada um dos 12 pontos da Laguna dos Patos, na cidade do Rio Grande, totalizando 144 amostras.

As análises das amostras foram realizadas no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), e no Laboratório de Parasitologia Clínica da Escola de Farmácia e Bioquímica da Universidade Católica de Pelotas (UCPEL).



Figura 2- Ponto N° 01 – Croa do Boi – Bairro Santa Tereza.



Figura 3 - Ponto N° 02 – Próximo ao Terminal de Containers na Quarta Secção da Barra.



Figura 4 - Ponto N° 03 - Prainha da Quarta Secção da Barra.



Figura 5 - Ponto N° 04 - Rua Visconde de Mauá, bairro São João.



Figura 6 - Ponto N° 05 - Rua Rodrigo Duarte, bairro São Miguel.



Figura 7 - Ponto N° 06 - Final da Rua XV de novembro.



Figura 8 - Ponto N°7 - Próximos ao Posto de Hortifrutigranjeiros.



Figura 9 - Ponto N° 8 - Próximos a Estação Hidroviária de Rio Grande/São José do Norte, próximo ao Porto Velho.



Figura 10 - Ponto N°9 - Avenida Honório Bicalho.



Figura 11 - Ponto N°10 - Desembocadura do Arroio Vieira no Saco da Mangueira.



Figura 12 - Ponto N°11 - Rua Doutor Raul Pilla.



Figura 13 - Ponto N°12 - Rua Forte Santana.

4.3.1 Colheita das amostras

Para a colheita de cada amostra de 500 mL de água, foi utilizado um frasco de vidro esterilizado, com boca larga e com tampa, de acordo com a metodologia para a colheita de águas superficiais (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB, SP, 1997). A colheita foi realizada em uma profundidade de 1m, sendo mergulhado rapidamente o frasco com a boca para baixo, aproximadamente, 30 cm da superfície. A seguir, o frasco foi inclinado lentamente para cima, permitindo a saída do ar e o enchimento do mesmo. Posteriormente, foi retirado do corpo de água e uma pequena porção da amostra foi desprezada, deixando um espaço vazio para uma perfeita homogeneização, e após o frasco foi fechado.

4.4 Pesquisa dos protozoários

4.4.1 Extração dos protozoários

Os 500 mL de água, de cada amostra, foram passados através de membrana de acetato de celulose, 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro, branca e lisa (Millipore, Brasil), sob pressão negativa (GOMES *et al.*, 2002). Após a filtração, a membrana foi eluída em 10 mL da solução de Tween 80 a 0,1% e raspada com bastão de metal, a fim de que fosse retirado o material retido (método RM) (FRANCO *et al.*, 2001).

A suspensão resultante da eluição foi centrifugada a 1500 rpm, por 15 minutos. O sedimento final foi armazenado em tubos com tampa e fixado com formol a 10%, sendo mantido sob refrigeração a 4°C, para posterior preparação das lâminas (GOMES *et al.*, 2002; CARDOSO *et al.*, 2003).

4.4.2 Pesquisa de cistos de protozoários

A pesquisa de cistos de protozoários, tais como de *Entamoeba* spp. e *Giardia lamblia*, foi realizada através do exame microscópico direto (GOMES *et al.*, 2002), pelo método de concentração de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco e de coloração do sedimento pelo tricrômio (CARDOSO *et al.*, 2003).

4.4.2.1 Exame microscópico direto

Uma alíquota de 20 µL do sedimento foi colocada entre lâmina e lamínula, sendo observada ao microscópio óptico em aumento de 400 vezes. O mesmo procedimento foi executado com outra alíquota de 20 µL do sedimento misturada com 20 µL de Lugol.

4.4.2.2 Centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Técnica de Faust)

Uma alíquota de 50 µL do sedimento foi misturada com 10 mL de água, em um tubo de centrífuga, e posteriormente foi centrifugada a 1.500 rpm, por um minuto. Após, o sedimento foi ressuspendido com 10 mL de água, para posterior centrifugação, durante um minuto, a 1.500 rpm. A seguir, o sedimento foi misturado com 10 mL de solução de sulfato de zinco (densidade 1,18), com nova centrifugação. Posteriormente, a membrana formada na superfície do líquido, foi removida com uma alça de bacteriologia dobrada, e transferida para uma lâmina de microscopia e coberta com lamínula, sendo observada ao microscópio óptico, no aumento de 400 vezes.

4.4.2.3 Coloração pelo tricrômio

Com uma alíquota de 20 µL de sedimento, foi preparado um esfregaço em uma lâmina de microscopia. Este esfregaço foi submerso, durante 5 minutos, em álcool etílico 70%, após em álcool etílico 70% iodado, e a seguir, em álcool etílico. Após, foi adicionado o corante tricrômio, com repouso de 10 minutos. O esfregaço foi descorado com solução álcool-ácido acético 1%, por três segundos. Após, foi lavado com álcool etílico absoluto e em etanol 95%, durante cinco minutos. Posteriormente, foi adicionado carboxileno, e a seguir, xileno, ambos com repouso de cinco minutos. A lâmina depois de seca foi observada ao microscópio óptico em aumento de 100 e 400 vezes.

4.4.3 Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água podem ser encontrados em baixo número, portanto, para a sua pesquisa é recomendado o uso de técnicas de concentração (LABERGE & GRIFFITHS, 1996). As técnicas usadas neste estudo foram de centrífugo-sedimentação pelo formol-éter e centrífugo-

flutuação em solução de sacarose, de acordo com o método empregado por Deng & Cliver (1999) e Gomes *et al.* (2002).

4.4.3.1 Centrífugo-sedimentação pelo formol-éter (Técnica de Ritchie)

Uma alíquota de 50 μ L do sedimento foi misturada com 10 mL de água, e posteriormente, foi centrifugada a 2.500 rpm, por um minuto. A seguir, o sedimento foi ressuspenso com 10 mL de água para posterior centrifugação. Após a lavagem do sedimento, foram adicionados 7 mL de formol 10%, sendo deixado o material em repouso por três minutos. Após, foram acrescentados 3 mL de éter, sendo o material homogeneizado e novamente centrifugado. A partir do sedimento, foram preparados esfregaços, em duplicata, para posterior coloração por Kinyoun. Antes da coloração, estes esfregaços foram secos pelo calor.

4.4.3.2 Centrífugo-flutuação em solução de sacarose (Técnica de Sheather)

Uma alíquota de 20 μ L do sedimento foi misturada com 10 mL de solução de Sheather (solução de sacarose com densidade 1,20). A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm, sendo completado o volume do tubo com a mesma solução, até formar um menisco na borda superior do tubo. A seguir, foi colocada uma lâmina em contato com o menisco, deixando-a em repouso durante 15 minutos. Após, a lâmina foi invertida e foi preparado um esfregaço com adição de uma gota de ovoalbumina, para posterior coloração por Kinyoun.

4.4.3.3 Coloração ácido resistente de Kinyoun modificada

Os esfregaços preparados a partir das técnicas de Ritchie e de Sheather foram fixados com metanol por cinco minutos. Após, receberam o corante de Kinyoun durante 25 minutos. A seguir, os esfregaços foram descorados com ácido sulfúrico 2%, durante 30 a 40 segundos, e contracorados com verde de malaquita 5%, por um minuto. Depois, os esfregaços foram examinados em objetiva de imersão, aumento de 1.000 vezes.

4.4.4 Pesquisa de amebas de vida livre pertencentes aos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*

A pesquisa destas amebas foi feita através do isolamento em meio de cultura com ágar não nutriente misturado com *Escherichia coli* inativada pelo calor (SALAZAR *et al.*, 1982; ALVARENGA *et al.*, 2000; SILVA & ROSA, 2003).

Antes da etapa de filtração em membrana, uma alíquota de 10 mL de cada amostra de água foi centrifugada a 1.500 rpm, durante 15 minutos. Após, três gotas do sedimento foram adicionadas no centro de cada placa de Petri, contendo ágar não nutriente a 1,5 %, misturado com *Escherichia coli* inativada pelo calor. As placas foram colocadas em sacos plásticos para evitar a dessecação e incubadas a 28°C por até 14 dias. Diariamente, foram examinadas em microscópio óptico, em aumento de 100 e 400 vezes, com o objetivo de verificar o crescimento amebiano, de acordo com o método de Silva & Rosa (2003).

Nas placas em que foi observado o crescimento de trofozoítos e/ou cistos, foi realizada uma raspagem do meio com alça bacteriológica, sendo este material misturado com uma gota de solução fisiológica entre lâmina e lamínula. A leitura foi feita ao microscópio óptico, nos aumentos de 100 e 400 vezes (SUÁREZ *et al.*, 2002).

As amebas com características morfológicas semelhantes ao gênero *Naegleria* foram identificadas através da prova de flagelação. O meio onde ocorreu o crescimento amebiano foi recoberto com água esterilizada e incubado a 37°C, a cada 30 minutos, durante quatro horas, uma gota deste líquido foi observada ao microscópio, entre lâmina e lamínula. A presença de formas ovaladas, biflageladas e móveis caracterizam esse gênero (SILVA & ROSA, 2003).

4.5 Pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* (coliformes fecais)

A pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli*, foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia – FURG, utilizando-se a técnica dos tubos múltiplos, segundo “Standard methods for the examination of water and wastewater” (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA, 1995).

4.6 Parâmetros físico-químicos das amostras de água

Os parâmetros analisados neste estudo foram: pH, temperatura e salinidade. O pH foi determinado por fitas “Indicador Universal pH 0-14” (Merck), a temperatura foi medida por termômetro de laboratório, e a salinidade por medidor de salinidade para líquidos (Oregon Scientific). Estes parâmetros foram analisados nos próprios pontos, onde as amostras foram colhidas.

4.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos na detecção de protozoários, assim como a influência dos parâmetros físico-químicos analisados, coliformes totais e *Escherichia coli* foram submetidos à análise estatística. O programa utilizado foi o Epi info 6.04, efetuando-se o teste de Qui-quadrado. Neste estudo, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando se observou $p < 0,05$; foi ainda determinado o valor de OR (razão de chance) com intervalo de confiança (I.C.) de 95%.

5. RESULTADOS

Os protozoários, potencialmente patogênicos ao homem, detectados em amostras de água de 12 pontos da Laguna dos Patos, na cidade do Rio Grande, RS, durante o período de janeiro a dezembro de 2005 foram: *Cryptosporidium* spp. (Fig. 14), *Acanthamoeba* spp. (Fig.15 e 16), *Naegleria* spp. (Fig. 17), *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (Fig. 18).

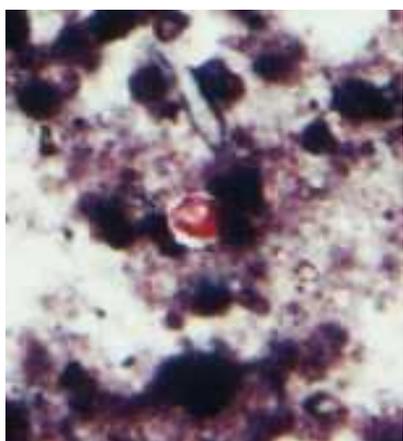


Figura 14 – Oocisto de *Cryptosporidium* spp.
Coloração de Kinyoun (1000 X).



Figura15 – Cistos de *Acanthamoeba* spp.
em meio de cultura de ágar não nutriente
enriquecido com *Escherichia coli* (inativada)
(400x).



Figura 16 – Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. retirado do meio de cultura de ágar não nutriente enriquecido com *Escherichia coli* (inativada) e observado em solução salina 0,85% (400X).

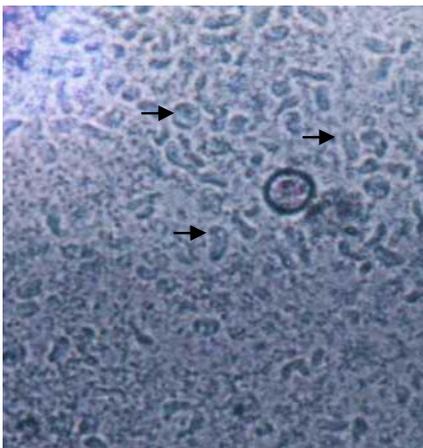


Figura 17 – Trofozoíto de *Naegleria* spp. em meio de cultura de ágar não nutriente enriquecido com *Escherichia coli* (inativada) (400X)



Figura 18 – Cisto de *E. histolytica*/*E. dispar* no exame direto do sedimento, com lugol (400X).

Do total de 12 pontos examinados da Laguna dos Patos, na cidade de Rio Grande, foi detectada uma positividade em 91,7% (11/12), para protozoários que podem infectar os seres humanos. Nos setores “A” e “C”, foi registrada positividade em 100% (6/6) dos pontos, enquanto que no setor “B”, 83,3% (5/6) dos pontos foram positivos.

Na Fig. 19, pode ser observada a freqüência de protozoários potencialmente patogênicos ao homem, detectados em diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS.

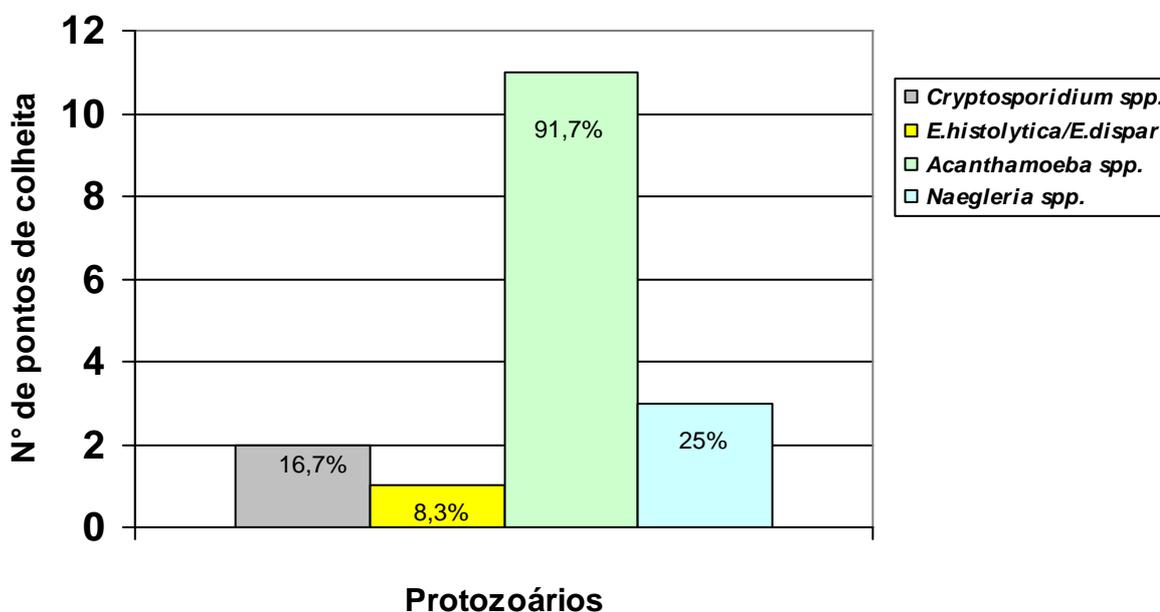


Figura 19 - Freqüência de protozoários, de interesse humano, detectados em relação ao número de pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, no período de janeiro a dezembro de 2005.

Os resultados obtidos na pesquisa de protozoários nas amostras de água de cada um dos 12 pontos da Laguna dos Patos, durante os 12 meses do ano de 2005, estão apresentados na tab. 3.

Tabela 3 – Freqüência de protozoários em cada ponto de colheita de água na Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, no período de janeiro a dezembro de 2005 (n=12)

Ponto	<i>Cryptosporidium spp.</i>		<i>Acanthamoeba spp.</i>		<i>Naegleria spp.</i>		<i>Entamoeba histolytica/E. dispar</i>	
	Freqüência	(%)	Freqüência	(%)	Freqüência	(%)	Freqüência	(%)
01	Zero	(Zero)	4	(33)	3	(25)	Zero	(Zero)
02	Zero	(Zero)	4	(33)	3	(25)	Zero	(Zero)
03	Zero	(Zero)	2	(16)	Zero	(Zero)	Zero	(Zero)
04	3	(25)	4	(33)	Zero	(Zero)	Zero	(Zero)
05	Zero	(Zero)	2	(16)	Zero	(Zero)	Zero	(Zero)
06	2	(16)	4	(33)	Zero	(Zero)	Zero	(Zero)
07	Zero	(Zero)	2	(16)	Zero	(Zero)	Zero	(Zero)
08	Zero	(Zero)	1	(8)	Zero	(Zero)	Zero	(Zero)
09	Zero	(Zero)	Zero	(Zero)	Zero	(Zero)	Zero	(Zero)
10	Zero	(Zero)	4	(33)	Zero	(Zero)	3	(25)
11	Zero	(Zero)	3	(25)	Zero	(Zero)	Zero	(Zero)
12	Zero	(Zero)	6	(50)	1	(8)	Zero	(Zero)

Na Fig. 20, pode ser observada a sazonalidade de *Cryptosporidium* spp. e *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* nas amostras de água da Laguna dos Patos, na cidade de Rio Grande, no período de janeiro a dezembro de 2005, e da contaminação por coliformes totais e *Escherichia coli* (coliformes fecais). Em todos os meses, foi detectada nos 12 pontos de colheita, a presença de Coliformes Totais acima de 5.000/100mL e *Escherichia coli* acima de 1.000/100mL.

Na Fig. 21, pode ser observada a sazonalidade de *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria* spp. (cistos e/ou trofozoítos) nas amostras de água da Laguna dos Patos, na cidade de Rio Grande, no período de janeiro a dezembro de 2005.

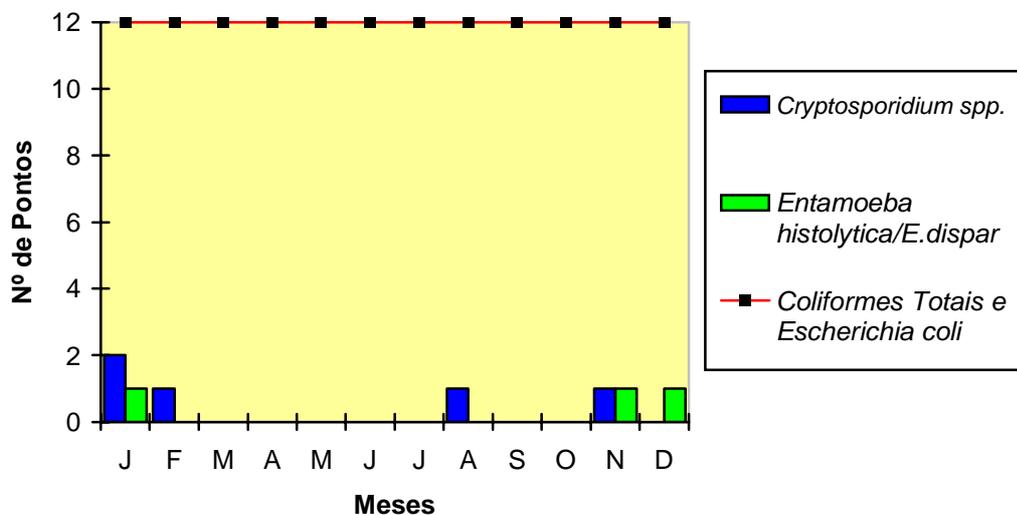


Figura 20 – Frequência de positividade dos pontos de colheita de água da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, por *Cryptosporidium* spp. e *Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar* e por coliformes totais e *Escherichia coli*, no período de janeiro a dezembro de 2005.

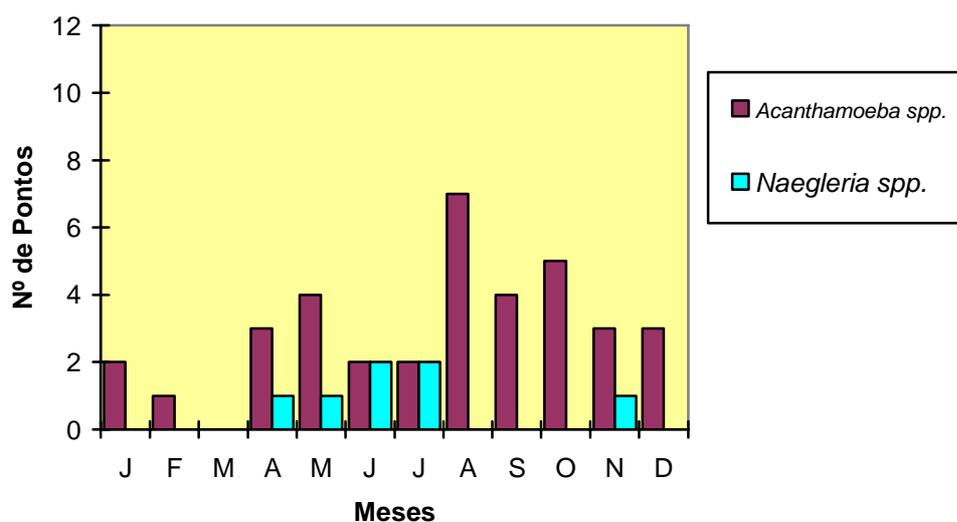


Figura 21 – Frequência de positividade dos pontos de colheita de água da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, por amebas de vida livre, potencialmente patogênicas, no período de janeiro a dezembro de 2005.

A influência da salinidade da água foi significativa ($p=0,008$) na detecção de protozoários. De acordo com os valores de OR (razão de chance), existiu 4,59 vezes mais chance de detectar protozoários em água com salinidade de até 0,6% do que em água com salinidade superior a 0,6% (tab. 4). A variação da salinidade das amostras de água foi de zero a 1,3%.

Tabela 4 – Influência da salinidade da água na detecção de protozoários.

Salinidade	Detecção de protozoários		Total
	Sim	Não	
Menor ou igual a 0,6%	41	58	99
Maior que 0,6%	06	39	45
Total	47	97	144

OR = 4,59 (1,65 < OR < 13,48) I.C. 95%

Na detecção de *Acanthamoeba* spp., a diferença de salinidade da água, foi estatisticamente significativa ($p=0,009$). Na água com salinidade de até 0,6%, a chance de detectar *Acanthamoeba* spp. foi 3,65 vezes maior que em água com salinidade superior a 0,6% (tab. 5).

Tabela 5 – Influência da salinidade da água na detecção de *Acanthamoeba* spp.

Salinidade	Detecção de <i>Acanthamoeba</i> spp.		Total
	Sim	Não	
Menor ou igual a 0,6%	31	68	99
Maior que 0,6%	05	40	45
Total	36	108	144

OR = 3,65 (1,21 < OR < 11,78) I.C. 95%

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp., e cistos de *Naegleria* spp. e do complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, foram detectados em amostras de água com salinidade entre zero e 0,8%, zero e 0,6%, e zero e 0,6%, respectivamente, não ocorrendo diferença significativa na detecção destes protozoários em relação a salinidade ($p>0,05$).

Os outros parâmetros físico-químicos como pH e temperatura, analisados nas amostras de água, não influenciaram significativamente ($p>0,05$) na detecção de *Cryptosporidium* spp., *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp. e *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. A variação do pH e da temperatura das amostras de água em que houve detecção destes protozoários foram, respectivamente, 6,5 a 7,5, 13 a 26°C; 6,5 a 7,5, 12 a 28°C; 6,0 a 8,0, 12 a 29°C; 6,5 a 8,0, 26°C. Considerando todas as amostras de água analisadas, a variação do pH foi de 6,0 a 8,0 e a da temperatura foi de 9 a 29 °C.

A influência das estações do ano na detecção de *Acanthamoeba* spp., foi estatisticamente significativa ($p=0,02$). No outono e inverno, existiu 2,5 vezes mais chance de detectar *Acanthamoeba* spp. que em estações de clima mais quente, como na primavera e verão (tab. 6). Entretanto, para os demais protozoários não ocorreu diferença significativa ($p>0,05$) em relação aos resultados obtidos nas estações de clima quente e as de clima frio.

Tabela 6 – Influência das estações do ano na detecção de *Acanthamoeba* spp.

Estações do ano	Detecção de <i>Acanthamoeba</i> spp.		Total
	Sim	Não	
Outono/Inverno	24	48	72
Primavera/Verão	12	60	72
Total	36	108	144

OR = 2,5 (1,05 < OR < 6,00) I.C. 95%

A presença de matéria orgânica (lixo, fezes, restos de alimentos, restos de peixes e camarão, etc.) em pontos de colheita das amostras de água influenciou significativamente ($p = 0,02$) na detecção de protozoários. A chance de detectar protozoários em amostras de água colhidas em pontos com matéria orgânica foi 2,31 vezes maior do que em amostras colhidas em pontos sem matéria orgânica (tab. 7).

Tabela 7 – Influência da presença de matéria orgânica na detecção de protozoários.

Matéria orgânica	Detecção de protozoários		Total
	Sim	Não	
Presença	30	42	72
Ausência	17	55	72
Total	47	97	144

OR = 2,31 (1,06 < OR < 5,09) I.C. 95%

A influência da criação de animais nas proximidades dos pontos de colheita das amostras de água foi significativa ($p=0,0007$) somente para a detecção de *Naegleria* spp. Em amostras de água colhidas em pontos com criação de animais nas proximidades houve 10,67 vezes mais chance de detectar *Naegleria* spp. do que em amostras colhidas em pontos sem criação de animais (tab. 8).

Tabela 8 – Influência da criação de animais na detecção de *Naegleria* spp..

Criação de animais	Detecção de <i>Naegleria</i> spp.		Total
	Sim	Não	
Presença	3	9	12
Ausência	4	128	132
Total	7	137	144

OR = 10,67 (1,56 < OR < 72,07) I.C. 95%

6. DISCUSSÃO

O alto número de pontos de colheita positivos (91,7%) para protozoários de interesse humano, justifica a preocupação com a qualidade da água da Laguna dos Patos, na cidade de Rio Grande, RS. Esta água é utilizada para pesca e/ou recreação, e pode desempenhar o papel de fonte de infecção para agentes parasitários em seres humanos, tais como o coccídeo oportunista *Cryptosporidium* spp. detectado em 16,7% (2/12) dos pontos examinados e amebas intestinais detectadas em 8,3% (1/12) dos pontos. As maiores frequências detectadas foram de *Acanthamoeba* spp. em 91,7% (11/12) e de *Naegleria* spp. em 25% (3/12) dos pontos de colheita, provavelmente, por serem amebas adaptadas a vida livre. Entretanto, é importante ressaltar que estas amebas de vida livre são potencialmente patogênicas para os humanos.

Os dois pontos de colheita (04 e 06 - Área "B"), em que foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp. apresentam como principais características: presença de saída de emissário de esgoto, habitações nas proximidades e presença de lixo. Provavelmente, esta contaminação foi decorrente da presença de habitações e do despejo de esgotos domésticos sem tratamento.

No ponto de colheita 10 (Área "C"), desembocadura do Arroio Vieira no Saco da Mangueira, foram detectadas as únicas três amostras positivas (janeiro, novembro e dezembro) para cistos do complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, representando 8,3% de positividade dos pontos. Neste ponto é lançado o efluente final da Estação de Tratamento de Esgotos do Parque Marinha, a qual possui processo de tratamento de esgotos em nível secundário.

Nestes três pontos (04, 06 e 10), foram detectados coliformes totais (acima de 5.000/100 mL) e de *Escherichia coli* (acima de 1.000/100 mL), que confirmam a contaminação da água por esgoto cloacal. Nestes pontos são praticadas atividades de pesca e/ou recreação, aumentando a possibilidade de infecção nessa população.

Embora a quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli* seja utilizada como padrão para indicar contaminação ambiental por agentes biológicos, estes não podem ser relacionados com a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em

amostras de água bruta. Neste estudo, foram detectados estes indicadores em 10 pontos em que os oocistos não foram recuperados, talvez pela maior dificuldade em detectar esta forma evolutiva do coccídeo do que cultivar *Escherichia coli*. Rose (1990) e Thurman *et al.*, (1998), também não observaram relação entre estes indicadores biológicos e a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água.

Nos demais pontos de colheita (“Áreas A, B, C”) não foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos do complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. Entretanto, os pontos 01, 02, 03, 05, 08, 09 e 11 apresentam moradias nas proximidades, bem como, os pontos 05, 07, 11 e 12 apresentam saída de emissário de esgoto ou valetas. Os resultados negativos para estes protozoários podem ser explicados, provavelmente, devido a amostra de 500 mL ser insuficiente para detecção de maior quantidade de formas evolutivas de diferentes protozoários. Luna *et al.* (2002), ao examinarem sete amostras de 400 L de água superficial, detectaram positividade para oocistos de *Cryptosporidium* spp. em seis amostras. Entretanto, com o volume de 500 mL de água examinada no presente trabalho, associado às colheitas mensais realizadas em cada ponto durante 12 meses, foi possível detectar estes protozoários em três pontos, indicando a necessidade de melhorias nas condições sanitárias para essa população. Além disso, apesar de diferentes métodos terem sido desenvolvidos para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água, ainda não há um método mundialmente padronizado (SMITH, 1998; FAYER *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2002).

Considerando apenas os pontos positivos para oocistos de *Cryptosporidium* spp. (pontos 4 e 6), das 24 amostras examinadas, 20,8% (5/24) estavam positivas. Estes resultados são compatíveis com os do estudo realizado por Gomes *et al.* (2002), nos municípios de Sorocaba e Votorantin, SP. Os autores detectaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 14,3% (1/7) das fontes naturais de água bruta analisadas. Entretanto, estes resultados diferem dos obtidos por Dias Junior (1999), o qual detectou oocistos em 58,3% (7/12) das amostras de águas superficiais no município de Araras, SP. Também diferem dos resultados observados por Muller (1999), que detectou oocistos em 73,9% (17/23) das amostras de água bruta colhidas em mananciais da região metropolitana de São Paulo, SP, e dos obtidos por Farias *et al.* (2002), que verificaram positividade de 100% em 12 amostras de água de córrego, no município de São Paulo, SP. Talvez essa diferença possa ser

explicada pelo emprego de métodos distintos aplicados nos diferentes trabalhos e, principalmente, porque no presente estudo, as colheitas das amostras de água não foram concentradas nas estações de maior prevalência de criptosporidiose (primavera e verão), mas durante 12 meses consecutivos.

A temperatura da água não influenciou ($p > 0,05$) na detecção de *Cryptosporidium* spp. Entretanto, houve uma concentração na detecção deste coccídeo nos meses da primavera e do verão (ponto 4: janeiro, fevereiro, novembro; ponto 6: janeiro). De acordo com MacLauchlin *et al.* (2000), a infecção por *C. parvum* é mais comum durante a primavera, e por *C. hominis* no final do verão e outono. Além disso, também foram detectados oocistos no inverno (ponto 6: agosto). Nos pontos em que foram recuperados os oocistos, a variação da temperatura da água foi de 13 a 26 °C, o que confirma a resistência destas formas evolutivas a importantes variações de temperatura (Chauret *et al.*, 1995). Estes resultados estão de acordo com o estudo de Muller (1999), que detectou oocistos em um período em que as temperaturas da água bruta variaram entre 17 e 27,5°C, e com o estudo de Luna *et al.*, (2002), que observou oocistos em amostras de água bruta, tanto na estação das chuvas como na estação da seca.

O pH não apresentou influência na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. ($p > 0,05$), sendo detectados oocistos em amostras de água com pH que variou de 6,5 a 7,5. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Muller (1999), o qual observou que a variação do valor de pH de amostras de água bruta, não determinou a presença ou ausência de oocistos nestas amostras. No presente estudo, também não houve influência significativa ($p > 0,05$) da salinidade na detecção dos oocistos, porém estes foram detectados quando a salinidade das amostras de água encontrava-se menor ou igual a 0,8%.

A detecção de cistos de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* ocorreu somente em amostras de água com temperatura de 26°C. A salinidade e o pH também não influenciaram na recuperação destes cistos ($p > 0,05$), pois a sua detecção ocorreu em amostras de água com salinidade de zero a 0,6% e com pH entre 6,5 e 8,0.

A alta frequência de contaminação da água por amebas de vida livre (*Acanthamoeba* spp. em 91,7% e *Naegleria* spp. em 25% dos pontos), pode ser explicada pela presença de coliformes fecais (*Escherichia coli*) em todas as

amostras analisadas, indicando contaminação por esgoto cloacal, pois estas bactérias servem de substrato para as amebas.

É importante ressaltar que atualmente têm sido relatados casos de meningoencefalite amebiana primária, encefalite amebiana granulomatosa e ceratite, causados por amebas de vida livre, constituindo-se em um problema de saúde coletiva. Além disso, pode-se inferir que estes protozoários estejam em fase de transição para uma vida parasitária, ou seja, em fase de adaptação. Este fato aumentaria a importância do estudo das amebas de vida livre.

Dentre as espécies do gênero *Naegleria*, somente *N. fowleri* tem desempenhado o papel de parasito para os seres humanos, as demais espécies são apenas de vida livre. O problema é que o diagnóstico em nível de espécie só é possível por meio de técnicas moleculares. A identificação específica de *N. fowleri* em amostras ambientais é possível através da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de 10 trofozoítos ou cistos (KILVINGTON & BEECHING, 1995).

Os achados do presente estudo podem ser comparados com os resultados obtidos por Giazzi (1996). O autor observou positividade de 86,9% para *Acanthamoeba* e 39,1% para *Naegleria*, em amostras de água, em Araraquara, SP. Entretanto, Silva & Rosa (2003) obtiveram uma positividade de 45,5% para *Acanthamoeba* spp. e de 3,8% para *Naegleria* spp., quando pesquisaram estas amebas em poeira de ambiente hospitalar.

Dentre os protozoários detectados no presente trabalho, somente para *Acanthamoeba* spp. houve influência significativa ($p=0,02$) em relação às épocas do ano. A chance de detecção de trofozoítos e/ou cistos deste protozoário nas estações de temperaturas baixas (outono e inverno), foi 2,5 vezes maior que nas estações de temperaturas altas. Entretanto, a variação da temperatura da água não influenciou ($p>0,05$) na detecção de trofozoítos e/ou cistos de *Naegleria* spp. (12 a 28°C) e *Acanthamoeba* spp. (12 a 29°C). Além disso, foi observado que nos meses em que a salinidade da água estava com valores até 0,6%, obteve-se um maior número de pontos de coleta de água positivos para *Acanthamoeba* spp. ($p=0,009$). Isto ocorreu, provavelmente, devido a menor concentração de salinidade encontrada na água da Laguna dos Patos nos meses de outono e inverno, do que nos meses mais quentes (especialmente o verão), sendo as espécies deste gênero mais adaptadas à concentração de salinidade mais baixa. Também, pode-se observar a influência da salinidade da água ($p=0,008$) na detecção de protozoários em geral, sendo que

existiu 4,59 vezes mais chance de detectar protozoários em água com salinidade de até 0,6% do que em água com salinidade superior a 0,6%.

Em relação ao pH, foram detectadas as amebas de vida livre *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria* spp., quando o valor do pH variou de 6,0 a 8,0 e de 6,5 a 7,5 respectivamente. Os relatos sobre a influência da temperatura, do pH e da salinidade na detecção das amebas de vida livre são escassos. Entretanto, os achados deste estudo estão de acordo com Silva & Rosa (2003), os quais citaram que estas amebas são resistentes a importantes variações de temperatura e de pH.

A presença de matéria orgânica (lixo, fezes, restos de alimentos, restos de peixes e camarão, etc.) em pontos de colheita das amostras de água, não influenciou na detecção dos gêneros dos protozoários encontrados neste estudo. Entretanto, houve influência significativa ($p=0,02$) na detecção de protozoários em geral, constituindo-se em um importante substrato para sobrevivência destes protozoários (amebas) e fonte de contaminação ambiental tanto para cistos como para oocistos de protozoários.

A criação de animais em local próximo ao ponto de colheita de amostras de água (ponto 02) foi significativa ($p=0,0007$) para a detecção de trofozoítos e/ou cistos de *Naegleria* spp. Este fato poderia ser explicado provavelmente pela contaminação da água deste ponto pelas fezes dos animais, as quais são ricas em bactérias que servem como substrato para estas amebas. Este fato, associado à localização do “ponto 02”, o qual fica protegido da correnteza da laguna, criando um ambiente favorável para a sobrevivência dessas amebas. Entretanto, para a detecção do gênero *Acanthamoeba*, que exige condições ambientais semelhantes às do gênero *Naegleria*, e para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. que podem ser eliminados nas fezes de animais, não houve influência da criação de animais nas proximidades dos pontos de colheita para a detecção destes protozoários ($p>0,05$). Além disso, foi detectada *Acanthamoeba* spp. em outros 10 pontos em que não havia a presença de animais nas proximidades, assim como oocistos de *Cryptosporidium* spp. que foram detectados nos pontos 04 e 06.

O método usado neste estudo para a extração de protozoários, método RM, apresentou bons resultados, principalmente na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Franco *et al.* (2001) em estudo que comparou o método de lavagem e raspagem da membrana (RM) com o método de dissolução da membrana em acetona (ADM), obtiveram maior taxa de recuperação de oocistos com o método

RM. A principal desvantagem do método que utiliza membrana filtrante para a extração de protozoários, observada neste estudo, foi à rápida saturação da membrana quando a amostra de água apresentava elevada turbidez, tornando o processamento da amostra lento. Esta mesma dificuldade foi observada por Muller (1999).

No presente trabalho, não foi detectado cisto de *Giardia lamblia*, diferindo dos resultados obtidos em alguns estudos com amostras de água bruta (LECHEVALLIER *et al.*, 1991; FRANCO *et al.*, 2001; HELLER *et al.*, 2004). A não detecção de cistos deste protozoário pode ser explicada, provavelmente, pela diferença de métodos usados nas diferentes pesquisas. Neste estudo, os cistos de *G. lamblia* foram pesquisados pela técnica de centrífugo-flutuação e coloração pelo tricrômio, enquanto nos outros estudos os cistos foram pesquisados pela técnica de imunofluorescência, que apresentam maior sensibilidade e especificidade. Outro fator que pode ter influenciado, foi o pequeno volume de amostra de água utilizada (500 mL), enquanto que nos outros estudos foram examinados volumes de água entre 50 e 100 L. Além disso, fatores físico-químicos poderiam ter influenciado na não detecção do protozoário. No entanto, Sivaganesan & Rice (2003), em seu estudo, observaram que a inativação dos cistos de *G. lamblia* ocorre com valores de pH superiores a 9, sendo que neste estudo o maior valor de pH registrado nas amostras de água foi 8. Em relação à salinidade da água, Johnson *et al.* (1995), detectaram cistos deste protozoário em águas da região costeira de Honolulu, Hawaii. Entretanto, El Mansoury *et al.* (2004) verificaram que em altas concentrações de salinidade diminui a viabilidade e a infectividade dos cistos de *Giardia lamblia*.

A detecção de protozoários oportunistas, de protozoários de origem fecal parasitos dos seres humanos, e de amebas de vida livre, potencialmente patogênicas ao homem, evidencia a contaminação ambiental da área estudada. Faz-se necessária a adoção de medidas como instalação de sistemas de coleta e tratamento de esgoto sanitário, preservação dos recursos hídricos e educação da população, as quais podem contribuir para o controle dos agentes etiológicos de doenças parasitárias de veiculação hídrica.

7 CONCLUSÕES

Os protozoários *Cryptosporidium* spp. (16,7% dos pontos), *Entamoeba histolytica/Entamoeba díspar* (8,3% dos pontos), parasitos de interesse humano, estão adaptados às condições de salinidade, temperatura e pH, de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS.

Amebas de vida livre dos gêneros *Acanthamoeba* (91,7% dos pontos) e *Naegleria* (25% dos pontos), potencialmente patogênicas ao seres humanos, estão adaptadas às condições da água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, sendo que as amebas do gênero *Acanthamoeba* foram mais freqüentes, no outono e inverno.

Diferentes pontos da água da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, apresentam-se contaminados por protozoários de origem fecal, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica/Entamoeba díspar*.

Em todos os pontos de colheita e em todo o período de estudo, os níveis de coliformes totais e fecais estão acima dos níveis permitidos para atividades recreacionais e ocupacionais.

A temperatura, salinidade e pH da água, durante os 12 meses de estudo não influenciam na freqüência de *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica/Entamoeba díspar* e *Naegleria* spp.

A temperatura e pH da água não influenciam na freqüência de *Acanthamoeba* spp. Entretanto, cistos e/ou trofozoítos deste protozoário são detectados com maior freqüência quando a salinidade da água estava menor ou igual a 0,6‰ e nos meses de outono e inverno.

A presença de matéria orgânica nas proximidades dos locais de colheita das amostras influencia na detecção de protozoários em geral, bem como a criação de animais para a detecção de formas evolutivas de *Naegleria* spp.

8. REFERÊNCIAS

ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog in Japan. **J. Vet. Med. Sci.** v.64, n.2, p.165-168, 2002.

ADAL, K.A.; STEWRLING, C.R.; GUERRANT, R.L. *Cryptosporidium* and related species. In: BLASER, M.J.; SMITH, P.D.; GUERRANT, R.L. **Infections of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, 1995, p.1107-1128.

ALVAREZ – PELLITERO, P.; SITJA – BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species. *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **Int. J. Parasitol.** v.32, p.1007-1021, 2002.

AKIYOSHI, D.E.; FENG, X.; BUCKOHOLOTT, M.A.; WIDMER, G.; TZIPORI, S. Genetic analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passed through different hosts. **Infect. Immun.** n.70, p.5670-5675, 2002.

ALVARENGA, L.S.; FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A.L. Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arq. Bras. Oftalmol.** v.63, n.2, p.155-159, 2000.

ALZAMORA, B.; GUERRA, L.; HARO, D.; CARBONE, A. Tratamiento médico de la Queratitis por *Acanthamoeba*. **Rev. Peruana Oftalmol.** v.18, n.1-2, p.21-17, 1994.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19 ed. Washington: APHA, AWWA, 1995.

ANDRADE NETO, J.L.; ASSEF, M.C.V. Criptosporidiose e Microsporidiose. In: VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p.1170-1172.

ANDREOLI, C.V.; BONNET, B.R.P.; FERNANDES, F.; SOUZA, M.L. P.; Efetividade da Avaliação de Impacto Ambiental no Brasil na área de Saneamento. **SANEARE**. V.3, n.3, p.31-38, 1995.

ARAÚJO, R. A. **Eficiência de algumas Estações de Tratamento de Esgotos de Feira de Santana na remoção de carga orgânica, coliformes, helmintos e protozoários e situações de risco de usuários a jusante do lançamento**. 2003. 203f. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental)-Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BERNARD, M.A. Land disposal of sewage effluent: appraisal of health effects of pathogenic organism. **J. Am. Water Work Assoc.** n.85, p.432, 1973.

BOUTROS, S.N. Sampling and analysis for *Cryptosporidium* in PA public surface water supply sources. **Report to Pensilvania Division of Water Supply**, Harrisburg, Pa, 1989.

BRANCO, S.M. Hidrobiologia Aplicada à Engenharia Sanitária. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB. São Paulo, 1978.

BRASIL, A.L. Águas: Recurso político estratégico. **BIO – Revista Brasileira de Saneamento e Meio Ambiente**. v.11, n.16, p.17, 2000 a.

BRASIL, A.L. Águas subterrâneas. **BIO – Revista Brasileira de Saneamento e Meio Ambiente**. v.11, n.16, p.25-31, 2000 b.

BRASIL, A.L. Água – o ouro do século XXI. **BIO – Revista Brasileira de Saneamento e Meio Ambiente**. v.11, n.21, p.20-34, 2002.

BRASIL. Lei nº 6.938 de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. **Senado Federal Direito Administrativo Tema: Água**. Brasília, 1997a. Caderno Legislativo 001/97: p.231-244.

BRASIL. Lei nº 9.433 de 08 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do artigo 21 da Constituição Federal, e altera o artigo 1º da Lei 8001 de 13 de março de 1990 que modifica a Lei 7990, de 28 de dezembro de 1989. **Senado Federal Direito Administrativo Tema: Água**. Brasília, 1997b. Caderno Legislativo 001/97: p.231-244.

BRASIL. Lei nº 9.984 de 17 de junho de 2000. Dispõe sobre a criação da Agência Nacional de Águas – ANA, entidade federal de implantação da Política Nacional de Recursos Hídricos e de coordenação do Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos. Disponível em: <<http://www.lei.adv.br/9984-00.html>>. Acesso em: 04 nov 2005.

BRINGHENTI, J.R. **Efeitos da Codisposição de Lodos de Tratamento de Esgotos em Aterros Sanitários – Estudo em Lisímetros**. 1999. Dissertação (Mestrado em Saúde Ambiental)-Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BUTLER, B.J.; MAYFIELD, C.I. *Cryptosporidium* spp. – A review of the organism, the disease, and implications for managing water resources. **Waterloo Centre for Ground water Research**, Waterloo, Ontario: Canadá, 1996.

BUTT, C.G. Primary amoebic meningoencephalitis. **N. Engl. J. Med.** n.274, p.1473-1476, 1966.

CAMPOS, R.; GOMES, M.C.O.; PRIGENZI, L.S.; STECCA, J. Meningoencefalite por ameba de vida livre. Apresentação do primeiro caso latino-americano. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. n.19, p.349-351, 1977.

CARDOSO, L.S.; DE CARLI, G.A.; LUCA, S.J. *Cryptosporidium* e *Giardia* em Efluentes Biologicamente Tratados e Desinfetados. **Eng. Sanit. Ambient.** v.8, n.4, p.285-290, 2003.

CARNEIRO, J.R.; GUIMARÃES, O.S.; CURY, F.C.; RODRIGUES, N.; LIMA, J.D. Diagnóstico Sorológico da Criptosporidiose Humana. **Rev. Pat. Trop.** v.24, n.2, p.205-217, 1995.

CENAC, J. La cryptosporidiose. Une nouvelle protozoose intestinale humaine. **Ann Biol. Clin.** n.42, p.389-397, 1984.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Técnicas de Análises Microbiológicas da Água – Membrana Filtrante. São Paulo, 1997.

CHAURET, C.; CHE, P.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Effect of environmental stressors on the survival of *Cryptosporidium* oocysts. Proc. AWWA Water Qual. Technol. Conf. Nov. p.1567-1585, 1995.

CHEN, X.M.; KEITHLY, J.S.; PAYA, C.V.; LARUSSO, N.F. Cryptosporidiosis. **N. Engl. J. Med.** v.346, n.22, 2002.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil. Resolução nº 20, de 18 de julho de 1986. Estabelece a classificação das águas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 jul 1986. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>> Acesso em: 04 jan 2006.

CRAUN, G.F. Waterborne giardiasis in United States 1965-1984. **Lancet.** v.2, p.513-514, 1986.

CRAUN, G.F.; HUBBS, S.A.; FROST, F.; CALDERON, R.L.; VIA, S.H. Waterborne Outbreaks of Cryptosporidiosis. **J. Am. Watt. Work. Assoc.** n.90, p.81-91, 1998.

CURRENT, W.L.; HAYNES, T.B. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. **N. Engl. J. Med.** n.308, p.1252-1257, 1983.

CURRENT, W.L.; GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. **Clin. Microbiol. Rev.** n.4, p.325-358, 1991.

DE CARLI, G.A.; SARAIVA, P.J. Diagnóstico de Laboratório da Criptosporidiose Humana. **Rev. Bras. Anal. Clín.** v.23, n.2, p.26-30, 1991.

DE CARLI, G.A.; MOURA, H. Métodos de coloração para coccídios intestinais. In: DE CARLI, G.A. **Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. São Paulo: Atheneu, 2001, p.265-288.

DENG, M.Q.; CLIVER, D.O. *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products. **Int. J. Food Microbiol.** n.46, p.113-121, 1999.

DIAS JUNIOR, O.J. **Ocorrência de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais e esgotos no município de Araras, SP, 1999.** 100f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Mackenzie. São Paulo.

DITRICH, O.; PALKOVIC, L.; STERBA, J.; PIC, J.; LOUDOVA, J.; GIBODA, M. The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. **Parasitol. Res.** v.77, p.44-47, 1991.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals.** Boca Raton: CRC Press, 1990.

EL MANSOURY, S.T.; ABOU EL NAGA, I.F.; NEGM, A.Y.; AMER, E.E. Influence of temperature and salinity on the viability and infectivity of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. **J Egypt Soc Parasitol.** v.34, n.1, p.161-172, 2004.

EPSTEIN, R.J.; WILSON, L.A.; VISVESVARA, G.S. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis from corneal scrapings using indirect fluorescent antibody staining. **Arch. Ophthalmol.** v.104, p.1318-1321, 1996.

FARIAS, E. W.; GAMBA, R.C.; PELLIZARI, V.H.; Detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v.33, n.1, p.41-43, 2002.

FARTHING, M.J. Clinical aspects of human cryptosporidiosis. **Contrib. Microbiol.** n.6, p.50-74, 2000.

FAYER, R.; LEEK, R.G. The effects of Reducing Conditions, Medium, pH, Temperature and Time on in vitro Excystation of *Cryptosporidium*. **J. Protozool.** v.31, n.4, p.567-569, 1984.

FAYER, R. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boca Raton: CRC Press, p.251, 1997.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol.** n.30, p.1305-1322, 2000.

FAYER, R.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LAI, A.A.; DUBEY, J.P. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. **J. Parasitol.** v.87, n.6, p.1415-1422, 2001.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veter. Parasitol.** n.126, p.37-56, 2004.

FERREIRA, C.M. A importância da água e sua utilização em ranários comerciais. **Revista Panorama da Aqüicultura.** v.13, n.79, p.15-17, 2003.

FORONDA, A.S. Crescimento de amebas de vida livre em meios semeados com líquido cefalorraquidiano humano (nota prévia). **Rev. Paul. Med.** n.87, p.140, 1976.

FORONDA, A.S.; CAMPOS, R. Infecções por amebas de vida livre. In: VERONESI R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p.729-733.

FOWLER, M.; CARTER, R.F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. **Brit. Med. J.** n.2, p.740-742, 1965.

FRANÇA, J.; MARTINEZ, A.M.; SUZIN, L.O.; SILVEIRA, J.; SIGNORINI, V.R.; SCAINI, C.J. Freqüência de *Cryptosporidium* sp. em pacientes HIV + antes e após a Terapia Anti-Retroviral Altamente Potente e Efetiva. **Anais**. XIV Congresso de Iniciação Científica – FURG, 2005.

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v.43, n.2, p.109-111, 2001.

FRANZEN, C.; MÜLLER, A. Cryptosporidia and Microsporidia – Waterborne Diseases in the Immunocompromised Host. **Diagn. Microbiol. Infec. Dis.** n.34, p.245-262, 1999.

FREIRE-SANTOS, F.; GOMES-COUSO, H.; ORTEGA-INARREA, M.R.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; OTEIZA-LOPEZ, A.M.; GARCIA-MARTIN, O.; ARES-MEZIAS, M.E. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*) and clams (*Tapes decussates*). **Parasitol. Res.** n.88, p.130-133, 2002.

GARCIA, L.S. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.** n.18, p.185-190, 1983.

GIAZZI, J.F. **Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida livre**, 1996. Tese (Livre –docência). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP. Araraquara.

GOMES, A.; PACHECO, M.; FONSECA, Y.; CESAR, N.; DIAS, H.; SILVA, R. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em águas de fontes naturais e comparação com análises bacteriológicas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v.61, n.1, p.59-63, 2002.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M.I.; FRANCO, M.F. *Giardia duodenalis*: Inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v.41, n.1, p.45-58, 1999.

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

HELLER, L. Água Potável: esforço de todos. **BIO-Revista Brasileira de Saneamento e Meio Ambiente**. v.7, n.9, p.9-11, 1998.

HELLER, L.; BASTOS, R.K.X.; VIEIRA, M.B.C.; BEVILACQUA, P.D.; BRITO, L.L.A.; MOTA, S.M.M.; OLIVEIRA, A.A.; MACHADO, P.M.; SALVADOR, D.P.; CARDOSO, A.B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.13, n.2, p.79-92, 2004.

HSU, B.; HUANG, C.; HSU, C.L.; HSU, Y.F.; YEH, J.H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in the Kau-Ping river and its watershed in Southern Taiwan. **Water Res.** n.33, p.2701-2707, 1999.

IGLÉSIAS, J. D. Amebas de vida livre potencialmente patogênicas. In: IGLÉSIAS, J.D. **Aspectos Médicos das Parasitoses humanas**. Rio de Janeiro: Medsi, 1997. p.116-120.

ILLINGWORTH, C.D.; COOK, S.D. Acanthamoeba Keratitis. **Surv. Ophthalmol.** v.42, n.6, p.493-508, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Censo demográfico de 2000.

JAKUBOWSKI, W.B.; BOUTROS, S.; FABER, F.; FAYER, R.; GHIORSE, W.; LECHEVALIER, M.; ROSE, J.; SHAUB, S.; SINGH, A.; STERWART, M. Environmental methods for *Cryptosporidium*. **J. Am. Wat. Work. Assoc.** n.8, p.107-121, 1996.

JOHNSON, D.C.; REYNOLDS, K.A.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. **Water science and Technology**. v.31, n.5, p.439-442, 1995.

JONES, D.B.; VISVESVARA, G.S.; ROBINSON, N.M. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. **Trans. Ophthalmol. Soc. UK**. n.95, p.221-232, 1975.

KILVINGTON, S.; BEECHING, J. Development of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. **Appl. Environ. Microbiol.** v.61, n.10 p.3764-3767, 1995.

LABERGE, I.; GRIFFITHS, M.W. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. **Int. J. Food Microbiol.** n.31, p.1-26, 1996.

LECHEVALIER, M.; NORTON, W.; LEE, R. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. In Surface Water Supplies. **Appl. Environ. Microbiol.** v.57, n.9, p.2610-2616, 1991.

LECHEVALIER, M.W.; NORTON, W.D.; SIEGEL, J.E.; ABBASZADEGAN, M. Evaluation of the Immunofluorescence Procedure for Detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Water. **Appl. Environ. Microbiol.** n.61, p.690-697, 1995.

LEHMANN, O.J.; GREEN, S.M.; MORLET, N. Polymerase chain reaction of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** v.39, n.7, p.1261-1265, 1998.

LEWIS W.J. O risco de poluição do lençol freático por sistemas de disposição local de esgotos. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Urbano e meio Ambiente/ Programa das nações Unidas para o Desenvolvimento, 1986.

LIBÂNIO, P.A.C.; CHERNICHARO, C.A.L.; NASCIMENTO, N.O. A dimensão da qualidade de Água: Avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública. **Eng. sanit. ambient.** v.10, n.3, p.219-228, 2005.

LIMA, C.L.S.; BRAZ, V.N.; RIVERA, I.G. Pesquisa de coliformes e estreptococos fecais em um ambiente aquático protegido. **Eng. sanit. ambient.** v.4, n.3, p.127-132, 1999.

LIMA, E.C.; STAMFORD, T.L. *Cryptosporidium* spp. No ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Ciência e Saúde Coletiva.** v.8, n.3, p.791-800, 2003.

LIMA, J.D. *Sarcocystis, Isospora e Cryptosporidium*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.173-179.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; OWENS, D.S.; MORGAN, U.M.; MEAD, J.R.; BLAGBUM, B.L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp (*Apicomplexa: Cryptosporiidae*) from cattle. **J. Euk. Microbiol.** v.47, p.91-95, 2000.

LUNA, S.; REYES, L.; CHINCHILA, M.; CATARINELLA, G. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en águas superficiales en Costa Rica. **Parasitol. Latinoam.** n.57, p.63-65, 2002.

MARTINEZ, A.J. **Free-living amebas: natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of the disease**. Boca Raton: CRC Press, 1985.

MCLAUCHLIN, J.; AMAR, C.; PEDRAZA-DIAZ, S.; NICHOLS, G.L. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.3984-3990, 2000.

MEDEMA, G.J.; SCHETS, F.M.; TEUNIS, P.F.M.; HAVELAAR, H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Appl. Environ. Microbiol.** v.64, n.11, p.4460-4466, 1998.

MEEGID VI – Sixth International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, Paris, 23–27 July 2002. Michel Tibayrenc.

MEISEL, J.L.; PEREIRA, D.R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C.E. Overwhelming watery diarrhoea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**. n.70, p.1156-1160, 1976.

MIRANDA, A.B.; TEIXEIRA, B.A.N. Indicadores para o monitoramento da sustentabilidade em sistemas urbanos de abastecimento de água e esgotamento sanitário. **Eng. sanit. ambient.** v.9, n.4, p.269-279, 2004.

MOITINHO, M.L.R.; ROBERTO, A.C.B.S.; MARTINS, M.R. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp. em fezes diarreicas de crianças do município de Maringá-PR. **Rev. Bras. Anal. Clin.** n.29, p. 168-170, 1997.

MORGAN-RYAN, U.; FALL, A.; WARD, L.A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, N.I.; FAYER, R.; THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.; LAL, A.A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from *Homo sapiens*. **J. Eukariot. Microbiol.** n.49, p.433-440, 2002.

MOTA, S. Introdução à Engenharia Ambiental. Rio de Janeiro. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1997.

MULLER, A.B.B. **Deteção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo.** 1999. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo. São Paulo.

NEVES, D.P. Giardíase. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Dinâmica.** São Paulo: Atheneu, 2003. p.149-154.

NEVES, D.P. Amebas de vida livre. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana.** 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.139-141.

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

NOSÉ, W.; SATO, E.H.; FREITAS, D. Úlcera de córnea por *Acanthamoeba*: quatro primeiros casos no Brasil. **Arq. Bras. Oftalmol.** n.51, p.223-226, 1988.

NÚCLEO DE ESTUDOS EM ADMINISTRAÇÃO E SAÚDE COLETIVA-FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FUNDAÇÃO DO RIO GRANDE – NEAS-FURG. Disponível em: <www.neas.furg.br> Acesso em: 02 mar 2006.

O'DONOGHUE, P. *Cryptosporidium* and criptosporidiosis in man na animals. **Int. J. Parasitol.** n.25, p.139-195, 1995.

OKHUYSEN, P.C.; CHAPPELL, C.L.; CRABB, J.H.; STERLING, C.R.; DUPONT, H.L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. **J. Infect. Dis.** n.180, p.1275-1281, 1999.

ONGERT, J.; STIBBS, H. Identification of *Cryptosporidium* Oocysts in River Water. **Appl. Environ. Microbiol.** v.53, n.4, p.672-676, 1987.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Guia para qualidade da água potável. v.1. Recomendações. Genebra, 1984.

ORTEGA, J.R.; ADAM, R.D. *Giardia*: overview and update. **Cin. Infections Diseases.** v.25, p.545-550, 1997.

PAGE, F.C. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae, with description of new species and a key to genera. **Arch. Protistenk.** n.116, p. 149-184, 1974.

PALMER, M.L.; HYNDIUK, R.A. Contact lens – related infectious keratitis. **Int. Ophthalmol. Clin.** v.33, n.1, p.23-49, 1993.

PICKERING, L.K.; ENGELKIRK, P.G. *Giardia lamblia*. **Pediatric Clinics of North America.** n.35, p.565-577, 1998.

REIS, J.C.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES NETO, U. Intolerância e má-absorção de lactose em escolares de Marília-SP. **Rev. Paul. Pediatria.** v.18, n.2, p.74-79, 2000.

REY, L. Os Esporozoários e as Coccidíases. In: Rey, L. **Bases da Parasitologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p.90-95.

REY, L. Os Esporozoários e as Coccidíases. In: Rey, L. **Bases da Parasitologia Médica.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.96-101.

RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A.A.; PAVLASEK, I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. **Appl. Environ. Microbiol.** v.69, nb.7, p.4302-4307, 2003.

RYAN, U.M.; MONIS, P.; ENEMARK, H.L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, READ, C.; BUDDLE, R.; ROBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R.C.A.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **J. Parasitol.** v.90, n.4, p.769-773, 2004.

ROSE, J.B.; Occurrence and Control of *Cryptosporidium* in Drinking Water. In: **Drinking Water Microbiology.** New York: Springer-Verlag, 1990. p.294-321.

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

RUTHES, A.C.C.; WAHAB, S.; WAHAB, N.; MOREIRA, H.; MOREIRA, L. Conjuntivite presumível por *Acanthamoeba*. **Arq. Bras. Oftalmol.** v.67, n.6, p.897-900, 2004.

SALAZAR, H.C.; MOURA, H.; RAMOS, R.T. Isolamento da amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. **Rev. Saúde Pública.** v.16, n.5, p.261-267, 1982.

SANTOS, A.S.R. **Gazeta Mercantil**, Porto Alegre, 16 mar. 2000. Água Importância e uso múltiplo.

SANTOS, M.J.M. O saneamento no Brasil. **Eng. sanit. ambient.** v.28, n.2, p.86-88, 1989.

SCHWAEZBACH, D.; GUTIERREZ, L.L.; PAGLIOSA, G.; SAVI, G.; CAGOL, T. Pesquisa de parasitoses intestinais em crianças com diferentes condições de saneamento em Erval Grande, RS. **Anais.** Congresso Brasileiro de Patologia Clínica- Medicina Laboratorial, 2004.

SILVA, E.F. Amebas Parasitas do Homem. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais.** São Paulo: Atheneu, 1999. p.126-138.

SILVA, E.F.; GOMES, M.A. Amebíase: *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana.** 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.127-138.

SILVA, M.A.; ROSA, J.A. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. **Rev. Saúde Pública.** v.37, n.2. p.242-246, 2003.

SILVA, M.C.M.; MONTEIRO, C.S.P.; ARAÚJO, B.A.V.; SILVA, J.V.; PÓVOA, M.M. Determinação da infecção por *Entamoeba histolytica* em residentes da área metropolitana de Belém, Pará, BR, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos. **Cad. Saúde Pública.** v.21, n.3, p.969-973, 2005.

SIVAGANESAN, M.; RICE, E.W. Estimation of *Giardia* Ct values at high ph for the Surface Water Treatment Rule. **J Environ Sci Health.** v.38, n.9, p.1959-1970, 2003.

SMITH, H.V. Detection of parasites in the environmental. **Parasitology.** n.117, p.113-141, 1998.

SMITH, H.V.; McDIARMID, A.; SMITH, A.L.; HINSON, A.R.; GILMOUR, R.A. Analysis of staining methods for the detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in water – related samples. **Parasitology.** n.99, p.323-327, 1989.

SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Waterborne cryptosporidiosis. **Parasitol. Today.** n.6, p.8-12, 1990.

SMITH, H.V.; ROSE J.B. Waterborne cryptosporidiosis: Current Status. **Parasitol. Today.** v.14, n.1, p.14-22, 1998.

SUÁREZ, R.; OLAYA, J.; HUAPAYA, P.; MIRANDA, E.; NÁQUIRA, C. Aislamiento de *Acanthamoeba* em pacientes del Servicio de oftalmología del Hospital Nacional Caytano Heredia. **Anales de la Facultad de Medicina.** Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Peru. v.63, n.4, p.269-274, 2002.

- THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitol. Today**. v.16, n.5, p.210-213, 2000.
- THURMAN, R.; FAULKNER, B.; VEAL, D.; CRAMER, G.; MEIKLEJOHN, M. Water quality in rural Australia. **J. Appl. Microbiol.** n.84, p.627-632, 1998.
- TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis biology, pathogenesis and diseases. **Microbes Infect.** n.4, p.1047-1058, 2002.
- WALLIS, P.M.; ERLANDSEN, S.L.; ISAC-RENTON, J.L.; OLSON, M.E.; ROBERTSON, W.J. VANKEULEN, H. Prevalence of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts and Characterization of *Giardia* spp. Isolated Drinking Water in Canada. **Appl. Environ. Microbiol.** n.62, p.2789-2797, 1996.
- XIAO, L.; SULAIMAN, I.M.; RYAN, U.M. ZHOU, L.; ATWILL, E.R.; TISCHLER, M.L.; ZHANG, X.; FAYER, R.; LAL, A.A. Host adaptation and host – parasite coevolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **Int. J. Parasitol.** v.32, p.1773-1795, 2002.
- XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.M.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clin. Microbiol. Rev.** v.17, n.1, p.72-97, 2004.
- ZAJAC, A.M. Giardiasis. **Compendium on Continuing Education for the Veterinarian-Small Animal**. v.14, n.5, p.604-611, 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE 2

Valores de temperatura, pH e salinidade da água de cada ponto de colheita das amostras nos meses de janeiro a dezembro de 2005.

Pontos de colheita	Parâmetros físico-químicos da água	Meses											
		J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
01	Temperatura	24	22	23	21	20	20	12	19	13	16	20	22
01	pH	7,0	7,0	8,0	7,5	6,5	7,0	7,0	6,5	7,5	6,5	6,5	7,5
01	Salinidade	0,6	0,3	0,8	0,8	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	0,0	0,0	1,0
02	Temperatura	25	22	24	21	20	20	12	18	12	18	20	22
02	pH	8,0	7,0	7,5	7,0	7,0	7,5	7,5	7,0	7,5	6,5	7,0	7,5
02	Salinidade	0,6	0,3	0,8	0,6	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3
03	Temperatura	24	22	25	21	19	19	13	18	11	16	20	23
03	pH	7,0	7,0	8,0	7,5	6,5	7,0	7,0	7,0	7,5	7,0	6,0	7,5
03	Salinidade	0,6	0,3	0,8	0,8	0,6	0,3	0,8	0,0	1,0	0,6	0,0	1,3
04	Temperatura	26	22	25	23	22	21	16	20	12	16	21	25
04	pH	7,0	7,5	7,5	7,0	7,0	7,5	7,0	7,5	7,5	6,5	6,5	7,0
04	Salinidade	0,6	0,6	0,8	0,6	0,8	0,3	0,3	0,3	1,0	0,0	0,0	1,3
05	Temperatura	25	21	25	23	18	16	16	13	09	23	21	23
05	pH	7,0	7,5	7,5	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
05	Salinidade	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,3	0,3	0,6	0,6	0,0	0,0	0,6
06	Temperatura	25	22	25	23	18	17	17	13	09	22	21	24
06	pH	7,0	7,5	7,5	7,0	7,0	7,0	6,5	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
06	Salinidade	0,8	0,8	1,0	0,6	0,8	0,6	0,3	0,0	0,6	0,0	0,0	0,6
07	Temperatura	23	22	24	24	17	16	14	14	10	22	22	23
07	pH	7,5	8,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	6,0	7,0
07	Salinidade	0,8	0,8	0,8	0,6	0,8	0,6	0,8	0,6	0,6	0,0	0,0	0,6
08	Temperatura	24	23	24	24	18	16	14	14	10	22	22	23
08	pH	7,5	7,5	7,5	7,0	7,0	7,5	7,0	7,0	7,0	7,0	6,0	7,0
08	Salinidade	0,8	0,8	1,0	0,8	0,6	0,6	0,8	0,6	0,6	0,0	0,0	0,6
09	Temperatura	23	25	25	24	18	13	13	16	12	22	25	26
09	pH	7,5	8,0	8,0	7,0	7,0	7,5	7,5	7,0	6,5	6,5	7,0	7,0
09	Salinidade	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6	0,8	0,8	0,3	0,3	0,0	0,0	1,3
10	Temperatura	26	26	27	21	19	14	12	16	15	21	26	26
10	pH	8,0	7,5	7,0	7,0	7,0	7,0	6,5	6,5	6,0	6,0	6,5	7,0
10	Salinidade	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
11	Temperatura	26	25	27	21	19	13	12	16	15	23	28	27
11	pH	8,0	7,5	8,0	7,5	7,5	7,0	7,0	7,5	7,0	7,0	7,5	6,5
11	Salinidade	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6	0,3	0,6	0,3	0,3	0,0	0,0	0,6
12	Temperatura	26	25	27	21	18	13	13	16	14	24	28	29
12	pH	8,0	8,0	7,5	7,5	7,5	7,5	7,0	7,5	7,0	7,0	7,5	7,0
12	Salinidade	0,8	0,8	0,8	0,6	0,3	0,3	0,6	0,3	0,3	0,0	0,3	1,3

APÊNDICE 3

Artigo a ser enviado para publicação, de acordo com as normas da Revista *Acta Tropica*

Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS, Brasil

Resumo

A cidade de Rio Grande, localizada ao sul do Rio Grande do Sul, assim como a maioria dos municípios brasileiros, também apresenta limitações na coleta e tratamento do esgoto cloacal. Esta deficiência faz com que parte dos dejetos da população seja eliminada diretamente na Laguna dos Patos, a principal da América Latina, a qual desempenha importante papel na atividade pesqueira, além de ser usada para recreação. Este estudo teve como objetivos investigar a presença de parasitos patogênicos ao homem e de parasitos que são indicadores de contaminação fecal. No período de janeiro a dezembro de 2005, foram colhidas, mensalmente, amostras de 500 mL de água em 12 pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, Rio Grande do Sul. As amostras foram filtradas através de membrana de acetato de celulose (0,45 µm), sob pressão negativa para a retenção do material. Após eluição do material, através da solução de Tween 80 a 0,1%, foram pesquisados cistos de protozoários pelo método direto, técnica de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco, técnica de coloração por tricrômio, oocistos de *Cryptosporidium* spp. pela técnica de coloração ácido resistente de Kinyoun, previamente concentrados. Também foi feito o cultivo de amebas de vida livre nas amostras de água em meio de ágar não nutriente com *Escherichia coli* inativada. Também foram avaliados pH, salinidade e temperatura da água. Na análise dos 12 pontos, foi observado que 91,7% (11/12) estavam contaminados com protozoários que podem infectar seres humanos; *Cryptosporidium* spp. (16,7%), *Acanthamoeba* spp. (91,7%), *Naegleria* spp. (25%) e *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (8,3%). Coliformes totais (superior a 5.000/100mL) e *Escherichia coli* (superior a 1.000/100mL) foram isolados em todas as amostras colhidas, demonstrando contaminação da água por esgoto cloacal. A temperatura, salinidade e pH da água, não influenciaram na detecção dos protozoários, exceto para *Acanthamoeba* spp. que apresentou maior frequência quando a salinidade da água estava menor ou igual a 0,6% (p<0,05). A presença de matéria orgânica nas proximidades dos locais de colheita das amostras influenciou na detecção de protozoários em geral, bem como a criação de animais para a detecção de *Naegleria* spp. (p<0,05). A observação da contaminação da água por parasitos patogênicos ao homem e a indicação de contaminação fecal, sugerem melhores ações de planejamento sanitário, assim como medidas preventivas e educativas a fim de evitar a infecção humana.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*; *Acanthamoeba*; Veiculação hídrica; Brasil

Contamination by protozoa potentially pathogenic to man in the water of different parts of Patos Lagoon, Rio Grande, RS, Brazil

Abstract

Rio Grande city, situated in the south of Rio Grande do Sul, as the majority of the Brazilian cities, it also presents limitations in the collection and treatment of the cloacal sewer. This deficiency makes that part of the residues of the population be eliminated directly in the Patos Lagoon, the main in the Latin America, which acquires an important role in the fishing activity, besides being used for recreation. This study had as objectives to investigate the presence of pathogenic parasites to the man and parasites that are indicator of fecal contamination. In the period between January and December of 2005, it were gathered, monthly, samples of 500 mL of water in 12 different parts of the Patos Lagoon, Rio Grande, Rio Grande do Sul. The samples were filtered through a membrane of acetate of cellulose (0,45), under a negative pressure for the material retention. After the material elution, through the Tween 80 solution to 0,1%, it were researched cysts of protozoa by the direct method, centrifugal-flotation technique in solution of sulfate of zinc, coloration technique of tricrome, oocysts of *Cryptosporidium* spp. by the technique of hard acid coloration of Kinyoun, beforehand concentrated. Also, it was made the culture of free-living amoebas in water samples in non-nutrient agar with inactive *Escherichia coli*. Also it were evaluated pH, saltiness and water temperature. In the analysis of the 12 parts, it was observed that 91,7% (11/12) were infected with protozoa that can infect human beings; *Cryptosporidium* spp. (16,7%), *Acanthamoeba* spp. (91,7%), *Naegleria* spp. (25%) and *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (8,3). Total coliforms (more than 5.000/100mL) and *Escherichia coli* (more than 1.000/100mL) were secluded in all the harvested samples, showing water contamination by cloacal sewer. The temperature, the saltiness and water pH, do not influenced in the detection do protozoa, except for *Acanthamoeba* spp. That presented bigger frequency when the water saltiness was under or equal 0,6% ($p < 0,05$). The presence of organic substance in the closeness of the places of samples gathering influenced in the detection of protozoa in general, as well as the creation of animals for the detection of *Naegleria* spp. ($p < 0,05$). The observation of water contamination for pathogenic parasites to man and the indications of fecal contamination, suggest better action of sanitary planning, as well as preventive and educative steps in order to avoid the human infection.

Key-words: *Cryptosporidium*; *Acanthamoeba*; Waterborne; Brazil

1. Introdução

A água é uma substância indispensável para a sobrevivência dos seres humanos, desempenhando papel fundamental na manutenção dos ecossistemas, sendo usada para diversos fins, como para o abastecimento das cidades, irrigação na agricultura, pecuária, aquíicultura, geração de força motriz e energia, na navegação fluvial e em atividades de lazer (Ferreira, 2003).

A crescente e desordenada urbanização, crescimento da população, aumento na quantidade de despejos domésticos e de resíduos industriais, aliados à deficiência da infra-estrutura sanitária, fizeram com que se tornasse incompatível a absorção natural desses dejetos pelo meio ambiente (Bringhenti, 1999).

Os corpos de água localizados próximos às cidades, também são usados como locais de recreação pela população que reside nos seus arredores. A contaminação destes locais por esgotos sanitários expõe os banhistas a riscos de infecção, devido à presença de bactérias, vírus e protozoários (Rose *et al.*, 2002).

Dentre os protozoários transmitidos aos seres humanos através da água, destacam-se *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia*, por terem sido responsáveis por vários surtos de diarreia (Dubey *et al.*, 1990; Smith & Rose, 1998).

No Brasil, dados sobre a ocorrência destes patógenos no meio ambiente ainda são escassos (Franco *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2003; Heller *et al.*, 2004). Dias Junior (1999) observou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em sete das 12 amostras de águas superficiais analisadas, no município de Araras, São Paulo. Muller (1999), pesquisando oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 23 amostras de água bruta, colhidas em mananciais da região metropolitana da cidade de São Paulo, São Paulo, obteve uma prevalência de 73,9% (17/23) para este parasito.

Outros protozoários transmitidos por veiculação hídrica que vêm despertando o interesse de pesquisadores, são as amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* e *Naegleria* (Corliss, 1973; Ortiz & Ochoterena, 1979), pois podem comportar-se como parasitos facultativos de seres humanos, causando doenças como meningoencefalite amebiana primária, encefalite amebiana granulomatosa (Fowler & Carter, 1965; Butt, 1966) e ceratite por *Acanthamoeba* (Jones *et al.*, 1975).

Além destes protozoários torna-se relevante a pesquisa de cistos de *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em amostras de água,

pois a presença destes parasitos pode ser considerada como indicador de contaminação fecal, uma vez que estes protozoários têm por hábitat o intestino grosso do ser humano (Silva & Gomes, 2005).

A cidade do Rio Grande, situada ao sul do Rio Grande do Sul, é banhada ao norte do seu território pela Laguna dos Patos, a maior da América Latina, a qual desempenha importante papel na atividade pesqueira, além de ser usada como local para banho, nos meses de verão, pela população residente nos seus arredores. Como a maioria dos municípios brasileiros, a cidade do Rio Grande, também apresenta deficiências na coleta e no tratamento do esgoto cloacal, fazendo com que parte dos esgotos não tratados sejam despejados diretamente na laguna.

Diante disso, este estudo teve como objetivos investigar a presença de parasitos patogênicos ao homem e de parasitos que são indicadores de contaminação fecal em amostras de água colhidas em diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, Rio Grande do Sul, visando despertar a necessidade de melhorias nas ações de planejamento sanitário.

2. Material e Métodos

O presente estudo ocorreu no período de janeiro a dezembro de 2005, quando foram analisadas, mensalmente, amostras de 500 mL de água de 12 pontos da Laguna dos Patos, totalizando 144 amostras. Estes pontos foram selecionados em função de apresentarem habitações nas proximidades, criação de animais, desembocadura de valas de esgoto e/ou desembocadura de emissários de esgoto tanto pluvial como doméstico.

As amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose (0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro), o material retido foi eluído em 10 mL da solução de Tween 80 a 0,1% e raspada com bastão de metal, a fim de que fosse retirado o material retido (método RM) (Franco *et al.*, 2001). A suspensão resultante da eluição foi centrifugada a 1500 rpm, por 15 minutos. O sedimento final foi armazenado em tubos com tampa e fixado com formol a 10%, sendo mantido sob refrigeração a 4°C, para posterior preparação das lâminas.

Inicialmente, foi feita a pesquisa de protozoários através do exame microscópico direto e pelo método de concentração de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco. Ainda foram preparados esfregaços do sedimento e corados pelo tricrômio (Cardoso *et al.*, 2003).

Para a concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram usadas as técnicas de centrífugo-sedimentação pelo formol-éter e centrífugo-flutuação em solução de sacarose (Deng & Cliver, 1999; Gomes *et al.*, 2002). Posteriormente, a identificação dos oocistos foi realizada a técnica de coloração ácido resistente de Kinyoun.

A pesquisa das amebas de vida livre dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* foi feita através do isolamento em meio de cultura com ágar não nutriente misturado com *Escherichia coli* inativada pelo calor (Alvarenga *et al.*, 2000; Silva & Rosa, 2003). Antes da etapa de filtração em membrana, uma alíquota de cada amostra de água foi centrifugada, posteriormente, três gotas do sedimento foram adicionadas no centro de cada placa de Petri, contendo ágar não nutriente a 1,5 %, misturado com *Escherichia coli* inativada pelo calor. As placas foram incubadas a 28°C por até 14 dias sendo examinadas diariamente em microscópio óptico, com a finalidade de verificar o crescimento amebiano (Silva & Rosa, 2003).

Em todas as amostras de água foram verificados os níveis de coliformes totais e *Escherichia coli* através da técnica dos tubos múltiplos segundo “Standard methods for the examination of water and wastewater” (American Public Health Association – APHA, 1995).

Ainda foram analisados parâmetros físico-químicos da água como temperatura, pH e salinidade nos próprios pontos de colheita das amostras.

3. Resultados

Do total de 12 pontos examinados da Laguna dos Patos, foi detectada positividade em 91,7% (11/12) dos pontos, para protozoários que podem infectar os seres humanos; *Cryptosporidium* spp. (16,7%), complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (8,3%), *Acanthamoeba* spp. (91,7%) e *Naegleria* spp. (25%).

Em todas as amostras de água foram detectados coliformes totais (acima de 5.000/100 mL) e *Escherichia coli* (acima de 1.000/100 mL), indicando contaminação por esgoto cloacal.

A influência da salinidade da água foi significativa ($p=0,008$) na detecção de protozoários. De acordo com os valores de OR (razão de chance), existiu 4,59 (1,65 < OR < 13,48; I.C. 95%) vezes mais chance de detectar protozoários em água com

salinidade de até 0,6% do que em água com salinidade superior a 0,6%. A variação da salinidade das amostras de água foi de zero a 1,3%.

Na detecção de *Acanthamoeba* spp., a diferença de salinidade da água, foi estatisticamente significativa ($p=0,009$). Na água com salinidade de até 0,6%, a chance de detectar *Acanthamoeba* spp. foi 3,7 ($1,21 < OR < 11,78$; I.C. 95%) vezes maior do que em água com salinidade superior a 0,6%.

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp., cistos de *Naegleria* spp. e do complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, foram detectados em amostras de água com salinidade entre zero e 0,8%, zero e 0,6%, e zero e 0,6%, respectivamente, não ocorrendo diferença significativa na detecção destes protozoários em relação a salinidade ($p>0,05$).

Os outros parâmetros físico-químicos como pH e temperatura, analisados nas amostras de água, não influenciaram significativamente ($p>0,05$) na detecção de *Cryptosporidium* spp., *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp. e *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. A variação do pH foi de 6,0 a 8,0 e a da temperatura da água foi de 9 a 29 °C.

A influência das estações do ano na detecção de *Acanthamoeba* spp., foi estatisticamente significativa ($p=0,02$). No outono e inverno, existiu 2,5 ($1,05 < OR < 6,00$; I.C. 95%) vezes mais chance de detectar *Acanthamoeba* spp. do que em estações de clima mais quente, como na primavera e verão. Entretanto, para os demais protozoários não ocorreu diferença significativa ($p>0,05$) em relação aos resultados obtidos nas estações de clima quente e as de clima frio.

A presença de matéria orgânica (lixo, fezes, restos de alimentos, restos de peixes e camarão, etc.) em pontos de colheita das amostras de água influenciou significativamente ($p = 0,02$) na detecção de protozoários. A chance de detectar protozoários em amostras de água colhidas em pontos com matéria orgânica foi 2,31 vezes maior do que em amostras colhidas em pontos sem matéria orgânica.

A influência da criação de animais nas proximidades dos pontos de colheita das amostras de água foi significativa ($p=0,0007$) para a detecção de *Naegleria* spp. Em amostras de água colhidas em pontos com criação de animais nas proximidades houve 10,67 vezes mais chance de detectar *Naegleria* spp. do que em amostras colhidas em pontos sem criação de animais. Entretanto, para *Acanthamoeba* spp. que também utiliza matéria orgânica como seu substrato e para oocistos de

Cryptosporidium spp. que podem ser eliminados nas fezes de animais não houve influência da criação de animais nas proximidades dos pontos de colheita ($p>0,05$).

4. Discussão

O alto número de pontos de colheita positivos (91,7%), para protozoários de interesse humano, justifica a preocupação com a qualidade da água da Laguna dos Patos, na cidade de Rio Grande, RS, pois esta é utilizada para pesca e/ou recreação, e pode desempenhar o papel de fonte de infecção para agentes parasitários dos seres humanos.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em dois pontos de coleta (16,7%), os quais apresentam como principais características: presença de saída de emissário de esgoto, habitações nas proximidades e presença de lixo. Provavelmente, a positividade foi decorrente da presença de habitações e despejo de esgotos domésticos sem tratamento. Considerando apenas os dois pontos em que foram detectados este protozoário, durante os 12 meses em que se desenvolveu o estudo foram analisadas 24 amostras, sendo que cinco (20,8%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp. Estes resultados são compatíveis com o do estudo realizado por Gomes *et al.* (2002), nos municípios de Sorocaba e Votorantin, São Paulo, Brasil. Os autores detectaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 14,3% (1/7) das sete fontes naturais de água bruta analisadas. Entretanto, estes resultados diferem dos obtidos por Dias Junior (1999), os quais detectaram oocistos em 58,3% (7/12) das amostras de águas superficiais no município de Araras, São Paulo, Brasil. Talvez essa diferença possa ser explicada pelo emprego de metodologias distintas aplicadas nos diferentes trabalhos e, principalmente, porque no presente estudo, as colheitas das amostras de água não foram concentradas nas estações de maior prevalência de criptosporidiose (primavera e verão), mas durante 12 meses consecutivos.

As variações de pH, salinidade e temperatura das amostras de água não influenciaram significativamente ($p>0,05$) na detecção de *Cryptosporidium* spp. Entretanto, houve uma concentração da frequência deste coccídeo nos meses da primavera e verão (janeiro, fevereiro e novembro), o que era esperado. Além disso, também foram detectados oocistos no inverno (agosto), com variação da temperatura da água de 13 a 26 °C, o que confirma a resistência dos oocistos a importantes variações desta variável.

Embora coliformes totais e *Escherichia coli*, tenham sido encontrados nestes mesmos pontos, não podem ser relacionados com a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água bruta, pois estes indicadores biológicos também foram detectados em 10 pontos em que os oocistos não foram recuperados, provavelmente pela maior dificuldade em detectar esta forma evolutiva do coccídeo do que cultivar *Escherichia coli*.

Cistos do complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* foram encontrados apenas em um ponto de colheita, mas em três meses diferentes. Neste ponto é lançado o efluente final de uma Estação de Tratamento de Esgotos, a qual possui processo de tratamento de esgotos em nível secundário. Este resultado associado à presença de coliformes totais (acima de 5.000/100 mL) e de *Escherichia coli* (acima de 1.000/100 mL), confirmam a contaminação da água por esgoto cloacal.

O elevado percentual de positividade para *Acanthamoeba* spp. (91,7%) e para *Naegleria* spp. (25%) poderia ser explicado pela presença de coliformes totais e *Escherichia coli* em todas as amostras analisadas, pois estas bactérias servem de substrato para as amebas. Estes resultados podem ser comparados com os resultados obtidos por Giazzi (1996), em que foi observada uma positividade de 86,9% para *Acanthamoeba* e 39,1% para *Naegleria*, em amostras de água, em Araraquara, São Paulo, Brasil.

Os relatos sobre a influência da temperatura, do pH e da salinidade na detecção das amebas de vida livre são escassos, entretanto os achados deste estudo corroboram com a citação de Silva & Rosa (2003), o qual cita que estas amebas são resistentes a variações de temperatura e de pH.

A presença de matéria orgânica (lixo, fezes, restos de alimentos, restos de peixes e camarão, etc.) em pontos de colheita das amostras de água, não influenciou na detecção dos gêneros dos protozoários encontrados neste estudo. Entretanto, houve influência significativa ($p=0,02$) na detecção de protozoários em geral, constituindo-se em um importante substrato para sobrevivência destes protozoários (amebas) e fonte de contaminação ambiental tanto para cistos como para oocistos de protozoários.

A criação de animais em local próximo ao ponto de colheita de amostras de água (ponto 02) foi significativa ($p=0,0007$) para a detecção de trofozoítos e/ou cistos de *Naegleria* spp. Este fato poderia ser explicado provavelmente pela

contaminação da água deste ponto pelas fezes dos animais, as quais são ricas em bactérias que servem como substrato para estas amebas. Entretanto, para a detecção do gênero *Acanthamoeba*, que exige condições ambientais semelhantes às do gênero *Naegleria*, e para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. que podem ser eliminados nas fezes de animais, não houve influência da criação de animais nas proximidades dos pontos de colheita para a detecção destes protozoários ($p > 0,05$). Além disso, foi observada a presença de *Acanthamoeba* spp. em outros 10 pontos em que não havia a presença de animais nas proximidades.

A detecção de protozoários de origem fecal e de amebas de vida livre, potencialmente patogênicas ao homem, nos locais do estudo, evidencia a contaminação ambiental. Faz-se necessária a adoção de medidas como instalação de sistemas de coleta e tratamento de esgoto sanitário, preservação dos recursos hídricos e educação da população, as quais contribuem para o controle das doenças de veiculação hídrica.

Referências

- Alvarenga, L.S.; Freitas, D.; Hofling-Lima, A.L.; 2000. Ceratite por *Acanthamoeba*. Arq. Bras. Oftalmol. 63, 2, 155-159.
- Andreoli, C.V.; Bonnet, B.R.P.; Fernandes, F.; Souza, M.L. P.; 1995. Efetividade da Avaliação de Impacto Ambiental no Brasil na área de Saneamento. SANEARE. 3, 3, 31-38.
- American Public Health Association – APHA. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19 ed. Washington: APHA, AWWA.
- Bringhenti, J.R.; 1999. Efeitos da Codisposição de Lodos de Tratamento de Esgotos em Aterros Sanitários – Estudo em Lisímetros. Dissertação (Mestrado em Saúde Ambiental)-Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Butt, C.G.; 1966. Primary amoebic meningoencephalitis. N. Engl. J. Med. 274, 1473-1476.
- Cardoso, L.S.; De Carli, G.A.; Luca, S.J.; 2003. *Cryptosporidium* e *Giardia* em Efluentes Biologicamente Tratados e Desinfetados. Eng. Sanit. Ambient. 8, 4, 285-290.
- Corliss, J.O.; 1973. Protozoan ecology: a note on its current status. Amer. Zool. 13, 145-148.

Deng, M.Q.; Cliver, D.O.; 1999. *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products. Int. J. of Food Microbiol. 46, 113-121.

Dias Junior, O.J.; 1999. Ocorrência de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais e esgotos no município de Araras, SP, 100f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Mackenzie. São Paulo.

Ferreira, C.M.; 2003. A importância da água e sua utilização em ranários comerciais. Revista Panorama da Aqüicultura. 13, 79, 15-17.

Fowler, M.; Carter, R.F.; 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. Brit. Med. J. 2, 740-742.

Franco, R.M.B.; Rocha-Eberhardt, R.; Cantusio Neto, R.; 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 43, 2, 109-111.

Giazzi, J.F.; 1996 Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida livre. Tese (Livre –docência). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP. Araraquara.

Gomes, A.; Pacheco, M.; Fonseca, Y.; Cesar, N.; Dias, H.; Silva, R.; 2002. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em águas de fontes naturais e comparação com análises bacteriológicas. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 61, 1, 59-63.

Heller, L.; Bastos, R.K.X.; Vieira, M.B.C.; Bevilacqua, P.D.; Brito, L.L.A.; Mota, S.M.M.; Oliveira, A.A.; Machado, P.M.; Salvador, D.P.; Cardoso, A.B.; 2004. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 13, 2, 79-92.

Jones, D.B.; Visvesvara, G.S.; Robinson, N.M.; 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. Trans. Ophthalmol. Soc. UK. 95, 221-232.

Muller, A.B.B.; 1999. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo. São Paulo.

Ortiz, T.P.; Ochoterena, L.E.; 1979. Análisis taxonomico de las espécies de protozoários encontradas em el agua potable de la ciudad de México D.F. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 21, 147-151.

Rose, J.B.; Huffman, D.E.; Gennacaro, A.; 2002. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. FEMS microbiology Reviews. 26, 113-123.

Salazar, H.C.; Moura, H.; Ramos, R.T.; 1982. Isolamento da amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. Rev. Saúde Pública. 16, 5, 261-267.

Silva, E.F.; Gomes, M.A.; 2005. Amebíase: *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*. In: Neves, D.P. Parasitologia Humana. 11 ed., Atheneu, São Paulo, pp.127-138.

Silva, M.A.; Rosa, J.A.; 2003. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. Rev. Saúde Pública. 37, 2, 242-246.

Smith, H.V.; Rose J.B.; 1998. Waterborne cryptosporidiosis: Current Status. Parasitology Today. 14, 1, 14-22.