

PROTOZOÁRIOS DE INTERESSE CLÍNICO DE VEICULAÇÃO HÍDRICA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Protozoars of clinical interest of water vehiculation: a systematic review

RESUMO: Cryptosporidium spp., e Giardia spp., são protozoários de veiculação hídrica, a transmissão destes agentes ocorre por via fecal-oral e são responsáveis por surtos gastroenterites em todo o mundo. Outro protozoário transmitido pela água é Acanthamoeba spp., encontrada no meio ambiente ou parasitando algum hospedeiro. Em indivíduos imunocomprometidos, esta pode ser responsável pelo desenvolvimento da encefalite amebiana granulomatosa, além de causar ceratite. Foi realizada uma revisão sistemática em três bases de dados para a seleção de artigos que tratavam da identificação destes protozoários de interesse clínico encontrados em recursos hídricos. Foram selecionados 15 artigos para a revisão sistemática a partir das bases de dados. Os 15 artigos empregaram várias metodologias para a coleta e identificação desses protozoários. Dentre as técnicas mais utilizadas estão: a filtração em membrana e a reação em cadeia da polimerase. Esses parasitos foram isolados de diversas fontes de água mostrando sua ubiquidade. Este estudo destacou a água como um importante meio de transmissão dessas doenças. Ressaltando a água como um importante veículo para a transmissão destes protozoários e pode também ser o local de controle dos mesmos através do seu tratamento.

Palavras-chave: Acanthamoeba. Cryptosporidium. Giardia. Brasil. Água.

ABSTRACT: Cryptosporidium spp., and Giardia spp., are water-borne protozoa, transmitted of these agents by fecal-oral route and are responsible for outbreaks gastroenteritis worldwide. Another protozoan transmitted by water is Acanthamoeba spp., Found freely in the environment or parasitizing some host. In immunocompromised individuals, this may be responsible for the development of granulomatous amebic encephalitis, in addition to causing keratitis. A systematic review was carried out in three databases for the selection of articles dealing with the identification of these protozoa of clinical interest found in water resources. We selected 15 articles for the systematic review from the databases. The 15 articles used several methodologies for the collect and identification of these protozoa. Among which the most used techniques are membrane filtration and polymerase chain reaction. These parasites were isolated from several sources of water showing their ubiquity. This study highlighted water as an important means of transmission of these diseases. Highlighting water as an important vehicle for the transmission of these protozoa and can also be the place to control them through their treatment.

Keywords: Acanthamoeba. Cryptosporidium. Giardia. Brazil. Water.

Geisa Bernardes Da Silva¹
Paulo Henrique Dantas De Sousa²
Roberpaulo Anacleto Neves³

1- Acadêmica do 9º período do curso de Biomedicina da Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás;

2- Acadêmico do 9º período do curso de Biomedicina da Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás;

3- Professor mestre efetivo da Escola de Ciência Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás

E-mail: roberpauloanacleto@gmail.com

Recebido em: 09/03/2019

Revisado em: 06/04/2019

Aceito em: 15/05/2019

INTRODUÇÃO

As doenças de veiculação hídrica são causadas, em sua maioria, por microorganismos patogênicos de transmissão fecal-oral, ou seja, ingestão de patógenos por meio de água e alimentos contaminados com fezes humanas ou de animais infectados (1-5). O aumento da população e a ocupação desordenada favoreceram a contaminação e poluição dos recursos hídricos, tornando-os inadequados para o consumo e constituindo uma ameaça à saúde (6). O saneamento inadequado ocasiona 88% das mortes por diarreia no mundo, no ano de 2011, de um total de 396.048 indivíduos internados com diarreia no Brasil, 138.447 foram crianças menores de cinco anos, totalizando 35% dos casos (7).

Nos últimos 25 anos, as doenças por veiculação hídrica constituíram um problema de saúde pública. *Cryptosporidium* e *Giardia* são responsáveis por surtos de gastroenterite devido à persistência de suas formas evolutivas à desinfecção da água (8). No mundo todo, cerca de 524 focos de doenças veiculadas pela água foram identificados, sendo 54,8% dos casos reportados causados por *Cryptosporidium* e 34,58% dos casos por *Giardia* (9). Em pacientes infectados, estes protozoários causam diarreia de variadas severidades, com atenção para pessoas imunocomprometidas e crianças (10,11).

A procura pelo lazer, envolvendo atividades aquáticas, utilização de piscinas e parques temáticos vem aumentando nos últimos anos, assim, tornam-se um risco para aquisição de doenças provocadas por novos e

"antigos" patógenos, reforçando a consciência sobre a importância das águas de recreação na transmissão de doenças. Nos Estados Unidos, foi relatado, durante os anos de 2003 e 2004, em 26 estados e Guam, a ocorrência de 62 focos de doenças relacionados com às águas de recreação. Dentre estes, 30(48,4%) dos casos, foram de gastroenterite e o *Cryptosporidium* foi o agente mais encontrado 11 (36,7%), levando a 1.206 casos de infecção por utilização de águas de recreação em piscinas (12).

Dentre os protozoários de veiculação hídrica estão as amebas de vida livre (AVL's), distribuídos por todo ambiente, com capacidade de viver sem um hospedeiro, assim como conseguem parasitar (13). Podem ser encontradas livremente em ambientes aquáticos como rios, lagos, piscinas e água potável, além do solo, poeira, ar e acidentalmente em soluções de lente de contato. Deste modo, a vasta distribuição das AVL's favorece a exposição humana (14-16).

O gênero *Acanthamoeba* é mais isolado a partir de fontes de água e solo dentre as AVL's (17). Diversos estudos brasileiros demonstraram a ocorrência de *Acanthamoeba* em isolados ambientais como, piscinas, ambientes e poeira hospitalar e água de torneira (18-23). Em indivíduos imunocomprometidos podem ocorrer o desenvolvimento da encefalite amebiana granulomatosa (EAG), lesões cutâneas, infecções renais, pulmonares e da nasofaringe, além de ceratite em imunocompetentes (24,25). As principais características dos gêneros *Acanthamoeba*, *Cryptosporidium* e *Giardia* estão descritas no quadro 1.

Quadro 1 - Principais características dos gêneros *Acanthamoeba*, *Cryptosporidium* e *Giardia*.

Gênero	Formas Evolutivas	Principais Vias de Transmissão	Grupos de Risco	Patologia Clínica	Fonte
<i>Cryptosporidium</i>	Oocisto; esporozoíto; trofozoíto; meronte tipo I e II; merozoíto; macrogameta; microgameta e zigoto.	Oocistos transmitidos através da via fecal-oral; e por meio da ingestão de alimentos, água de consumo e de recreação contaminados.	Pacientes imunossuprimidos, principalmente portadores da AIDS; crianças; indivíduos desnutridos, transplantados, submetidos à quimioterapia; e portadores de doenças infecciosas imunossupressoras.	Enterite de gravidade variável; forma oligossintomática; diarreia aquosa não piossanguinolenta; presença de dores abdominais intensas, emagrecimento, mal-estar e anorexia; pacientes podem apresentar síndrome malabsortiva, febre, mialgia, náuseas; vômitos; e 10 a 15 % dos quadros levam a colangite ou colecistite associados.	Chen, Keithly, Paya, & LaRusso, 2002; Fayer, Morgan, & Upton, 2000 (26,27)
<i>Giardia</i>	Cisto e Trofozoíto.	Cistos transmitidos pela via fecal-oral através do contato direto com fezes contaminadas; e por meio da ingestão de alimentos, água de consumo e de recreação contaminados.	Crianças que frequentam creches e pessoas com contato com estas crianças infectadas; pacientes imunossuprimidos, principalmente portadores da AIDS; e viajantes para áreas endêmicas.	Forma assintomática; diarreia aquosa e fétida; fezes com muco não sanguinolento; flatulência; cólicas abdominais; inchaço; náuseas; anorexia; mal-estar; perda de peso; e pode ocorrer malabsorção de gorduras, carboidratos, açúcares, vitaminas e apresentar deficiência de lactose.	Ortega & Adam, 1997; Thompson, 2004 (28,29)
<i>Acanthamoeba</i>	Cisto e Trofozoíto.	Entrada de trofozoítos pelo trato respiratório e ulcerações na pele; e através de microlesões na córnea.	Pacientes imunocomprometidos, HIV-positivos, submetidos à terapia imunossupressora e ao uso excessivo de esteróides, doença linfoproliferativa ou distúrbios hematológicos; diabetes mellitus; pneumonite; insuficiência renal; doenças hepáticas; gamaglobulinemia; e transplantados.	Lesões cutâneas; infecções sinusais; ceratite; encefalite amebiana granulomatosa.	Siddiqui & Khan, 2012 (30)

Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo reunir dados de pesquisas científicas sobre *Acanthamoeba*, *Cryptosporidium* e *Giardia*, que contaminam águas destinadas ao consumo humano e de recreação no Brasil, em um período compreendido de 10 anos, abordando o significado desses parasitas para a saúde pública.

MATERIAIS E MÉTODOS

A revisão sistemática foi realizada entre agosto e novembro de 2016 e a pesquisa dos unitermos para protozoários de veiculação hídrica no Brasil (*Giardia*, *Cryptosporidium* e *Acanthamoeba*) realizada no Portal de Pesquisas da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). As bases de dados utilizadas para pesquisa foram: *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE) e *Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde* (LILACS) empregando-se os seguintes unitermos: "*Cryptosporidium*", "*Giardia*", "*Acanthamoeba*", "Água" e "Brasil". A utilização dos unitermos para os três protozoários juntos "*Giardia*", "*Cryptosporidium*" e "*Acanthamoeba*" não encontrou artigo relacionado nas bases de dados e por isso foram pesquisados separadamente. Os resultados de cada um dos unitermos foram relacionados entre eles por meio do operador booleano "AND".

O atual estudo foi realizado em duas etapas: na primeira, os artigos foram avaliados, com base em seus títulos e resumos/abstract, ao mesmo tempo por dois revisores (PHDS e GBS), classificando os artigos de interesse. Em caso de discordâncias, um terceiro revisor foi consultado

(RAN). A segunda etapa consistiu na avaliação dos textos completos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, em caso de discordâncias, um último revisor foi consultado (RAN).

Para a seleção dos artigos científicos foram empregados os seguintes critérios de inclusão: a) estudos desenvolvidos no Brasil; b) publicações entre 2006 e 2016; c) ocorrência e identificação de *Giardia*, *Cryptosporidium* e Amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba*; d) artigos que continham amostras obtidas em uma ou mais fontes de água tais como mananciais, rios, lagos, represas, poços artesianos, piscinas, estações de tratamento de água, água de torneira e esgoto; e) artigos de Língua Portuguesa e Inglesa; e f) artigos de acesso livre. Como critérios de exclusão foram desconsiderados: resenhas, comentários, cartas, artigos de revisão, meta-análise, estudos que tratavam exclusivamente da parte teórica do assunto.

RESULTADO

A busca bibliográfica resultou em 74 registros, sendo 15 provenientes da base de dados LILACS, 49 provenientes da MEDLINE e 10 provenientes da SCIELO. Após a exclusão dos registros duplicados e de sobreposição entre as bases de dados, obteve-se uma amostra de 64 artigos únicos e não duplicados.

Após a fase de seleção, empregando-se os critérios de inclusão e exclusão previamente definidos, 15 artigos permaneceram elegíveis. A taxa de concordância entre os dois revisores foi de 73,3% quanto a decisão de incluir ou excluir um artigo. A análise descritiva das 15 publicações é mostrada no quadro 2.

Quadro 2– Análise descritiva dos artigos selecionados.

Referência	Fonte da coleta (Localidade)	Total de Amostras (n)	Nº de Positividade	Metodologia Usada para Identificação
Costa & Mendoza-Sassi, 2007 (31)	Bacia hidrográfica da Lagoa dos patos; água para navegação; e criadouro para peixes e crustáceos (RS).	48	A: 12 C: 2	Filtração em Membrana
Caumo et al., 2009 (19)	Piscinas aquecidas e não aquecidas (Porto Alegre - RS).	65	A: 13	Morfologia e PCR
Machado, Stamford, Machado, Soares, & Albuquerque, 2009 (32)	Água bruta e ETA Presidente Castelo Branco (Recife - PE).	60 (água bruta); 12 (ETA)	C: 56 oocistos (água bruta)	Filtração em Membrana e IFD
Magliano et al., 2009 (21)	Água de torneira Escola (São Paulo - SP).	19	A: 2	Filtração em Membrana, Caracterização Morfológica e PCR
Sassi et al., 2010 (33)	Porto do Rio Grande localizado na Lagoa dos Patos (RS).	42	A: 28,6% G: 16,7% C: 9,5%	Filtração em Membrana, Faust, Ritchie, ELISA e PCR
Stancari & Correia, 2010 (34)	ETA entrada e saída dos reservatórios (Bauru, Brotas, Jaú, Lençóis Paulista e Torrinha - SP).	30	C: 0 G: 2 (água bruta) G: 1 (água tratada)	Filtração em Membrana, IFD, DAPI e DIC
Araújo et al., 2011 (35)	Água de recreação do Ribeirão da Fazenda no norte da costa de São Sebastião e Unidades de Gestão de Água - Bacias dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiáí, bacia do alto Tiete e Baixada Santista (SP).	12 (água de recreação) 18 (água superficial)	C: 5 (água de recreação) C: 4 (água superficial)	Filtração em Membrana e PCR
Santos, Cantusio Neto, Franco, & Guimarães, 2011 (36)	ETE Samambaia (Campinas - SP).	53 (esgoto bruto)	G: 90,5% C: 6,4%	Centrífugo-concentração e Filtração em Membrana
Alves et al., 2012 (37)	Piscinas Públicas e Recursos Hídricos de Prédios Governamentais (Distrito Federal - Brasília).	18	A: 7 (Piscinas) A: 9 (Recurso Hídrico)	Caracterização Morfológica e PCR
Sato et al., 2013 (6)	Entradas das fontes de tratamento das Regiões Metropolitana de São Paulo, Campinas, Costa Sul e Vale do Paraíba (SP).	206	G: 49,5% C: 9,2%	Filtração em Membrana, IFD, DAPI e DIC
Durigan, Abreu, Zucchi, Franco, & De Souza, 2014 (38)	Rios, córregos urbanos, esgotos hospitalares, uma ETA, sítio de captação para a cidade do Rio Atibaia (Região Metropolitana de Campinas - SP).	91	G: 6	Filtração em Membrana, Centrífugo-Sedimentação, IFD e PCR
Almeida et al., 2015 (39)	ETA (Londrina - Paraná).	24	C: 2 G: 2	Filtração em Membrana, IFD e PCR
Tiyo et al., 2015 (40)	Água para irrigação de vegetais - Poços Artesianos, Comum e Mina (PR).	84	C: 2	Filtração em Membrana e IFD
Freitas, Paiva, Carvalho Filho, Cabral, & Rocha, 2015 (41)	Rio Beberibe (PE).	16	C: 12 G: 8	Centrifugação, Ziehl Neelsen e Microscopia com micrômetro

Grott, Hartann, Filho, Franco, & Goulart, 2016 (42)	Água bruta ETA (Blumenal - SC).	67	G: 23,19% C: 7,24%	Filtração em Membrana e IFD
---	---------------------------------	----	-----------------------	-----------------------------

A: *Acanthamoeba*; C: *Cryptosporidium*; G: *Giardia*; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; IFD: Imunofluorescência Direta; ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay; DAPI: corante vital 4',6-diamidino-2-phenylindole; DIC: microscopia com contraste diferencial e interferencial de fase.

Entre os 15 artigos selecionados foram identificadas várias metodologias para isolamento e identificação das AVL's, dentre elas destacamos: técnicas de filtração em membrana de acetato celulose e policarbonato, caracterização morfológica, imunofluorescência direta (IFD), análise de material corado (Ziehl Neelsen) em microscopia, corante vital 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), microscopia com contraste diferencial e interferencial de fase (DIC), centrífugo-sedimentação, microscopia com micrômetro, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *Faust* e *Ritchie* e reação em cadeia da polimerase (PCR).

Todos os estudos utilizaram mais de uma metodologia, exceto Costa & Mendoza-Sassi, 2007, que descreveu somente o uso da filtração em membrana e análises laboratoriais das quais não foram relatadas. O intuito de utilizar mais de uma metodologia é de complementar ou confirmar os resultados obtidos. Filtração em membrana foi o método mais realizado (12 artigos), seguido pela PCR (7 artigos), pois participa do processo de captação dos protozoários na água, aumenta a confiabilidade e realiza a genotipagem respectivamente.

A análise crítica das publicações neste estudo possibilitou observar uma abrangência quanto ao tipo de amostra de água utilizada para identificação dos protozoários, que foram: bacia hidrográfica de diversos rios, água para navegação, criadouro para peixes e crustáceos, piscinas, água bruta, ETA (Estação

Tratamento de Água) e ETE (Estação Tratamento de Esgoto), água de torneira, água que margeia um porto, água de recreação de uma fazenda, poço artesiano, poço comum e mina utilizados para irrigação de vegetais, recursos hídricos de prédios governamentais, córregos urbanos e esgotos hospitalares. A positividade de *Acanthamoeba*, *Cryptosporidium* e *Giardia* em diferentes localidades mostra a ampla distribuição. Porém, foram restritas apenas a alguns estados do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Distrito Federal e Pernambuco).

A somatória de todos os 15 artigos revisados totalizou 865 amostras coletadas, uma média de 57,6 amostras por estudo. Dentre o total de amostras, a positividade foi: 191 (22,08%) para *Giardia*, 61 (7,05%) para *Cryptosporidium* e 55 (6,36%) para *Acanthamoeba*.

DISCUSSÃO

Ao longo do tempo, os estudos envolvendo a identificação de protozoários de veiculação hídrica tornaram-se fundamentais para estabelecer critérios de controle de qualidade da água destinada ao consumo e recreação. O aumento do número de pessoas transplantadas e portadores de doenças imunodepressoras tem elevado o número de casos dessas doenças veiculadas pela água devido a maior susceptibilidade desses indivíduos adquirirem a infecção (6,8,9).

O encontro das AVL's patogênicas não necessariamente indica que o indivíduo desenvolverá a doença. Essas têm como

substrato *Escherichia coli* e outras bactérias. Em um dos estudos houve a identificação de uma quantidade superior a 1.000 UFC/100 ml de *E. coli* na água, fato que favoreceu o desencistamento das amebas de vida livre (31).

Conhecer os prováveis locais contaminados permite avaliar o risco de transmissão desses patógenos, visto que a água pode contaminar alimentos, o que propicia o desenvolvimento de quadros diarreicos pela comunidade exposta (31). Machado, Stamford, Machado, Soares, & Albuquerque, 2009, complementam que além do local estudado, o nível de contaminação e a eficiência da metodologia utilizada também influenciam no processo de identificação.

A presença de *Acanthamoeba* em água de piscina está relacionada à resistência de seus cistos ao processo de cloração da água, insuficiência da desinfecção bem como a falta de limpeza das instalações (19).

A cultura é um método importante para identificação de *Acanthamoeba*, pois permite aumentar o número de protozoários e consequentemente elevar a quantidade de DNA a ser extraído. Foi confirmado por Caumo et al., 2009, que o sucesso da extração de DNA foi consequência do uso da cultura. Quanto à temperatura, a variação de 12 graus (30°C – 42°C) em cinco isolados de *Acanthamoeba* cultivados em Ágar manitol foi indicativa de patogenicidade. Alves et al., 2012, identificaram *Acanthamoeba* potencialmente patogênica usando a cultura em Ágar manitol de amostras de piscina e recursos hídricos. Caumo et al., 2009, traz também que o aumento da temperatura ambiental favorece o desenvolvimento de cepas termotolerantes que são mais propícias a causar infecções tanto em

humanos quanto em animais. Para mais, a positividade de 20% em piscinas com *Acanthamoeba* na cidade de Porto Alegre demonstra a ubiquidade deste protozoário.

Magliano et al., 2009, identificou a presença de *Acanthamoeba* spp. T4 em água tratada de torneira. Acredita-se que isso se deu pela possível formação de um biofilme na caixa d'água utilizada, além disso, esse isolado era filogeneticamente próximo a da *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461, que é causadora de ceratite. Sassi et al., 2010, cita que além da contaminação do Rio Grande (Rio Grande do Sul) por esgoto a movimentação de embarcações poderia ter sido um fator crucial no transporte de micro-organismos de um corpo d'água para outro.

Referente ao uso de membrana para filtração, dobras ou amasso podem impedir que (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* fiquem retidos impossibilitando sua identificação. Na estação de tratamento de água (ETA) de um dos cinco municípios avaliados é utilizada apenas a filtração como tratamento de água. Devido a isso, a presença do cisto de *Giardia* relatada indica que esse método unicamente não é efetivo. Já onde a ETA utiliza floculação e decantação as chances de passagem de cistos de *Giardia* da água bruta para água tratada é diminuída. Outro dado importante foi a presença de coliformes termotolerantes em todas as amostras de água bruta analisadas, isso é indicativo de contaminação por dejetos humanos. Apesar de haver a presença de bactérias na água, elas foram toleradas segundo a legislação, visto que são menos resistentes que protozoários. Além disso, os protozoários são melhores para indicar a qualidade da água (34).

Ainda sobre a filtração de membrana, Santos, Neto, Franco, & Guimarães, 2011, afirmam que a técnica é uma boa opção, porém não recomendada para filtração de esgoto bruto. As grandes quantidades de partículas saturam a membrana mais rápido e dificulta o processo de identificação sendo necessária a troca por mais vezes, acarretando na perda de amostra, deixando o processo mais trabalhoso e oneroso.

Grandes volumes de água precisam ser captados para identificar oocistos em amostras de águas superficiais devido estarem em pouca quantidade (diluídos). Os estudos genotípicos de *Cryptosporidium* em amostras ambientais são escassos no Brasil. A pesquisa identificou *C. hominis* e *C. meleagridis* em água de recreação e superficial respectivamente. A utilização das águas do Ribeirão da Fazenda em São Sebastião para lazer favoreceu a contaminação por dejetos humanos, expondo a população à aquisição de doenças entéricas devido à diminuição da qualidade da água (35).

Na cidade de São Paulo Sato et al., 2013, demonstrou a alta presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* afirmando a necessidade de tratar corretamente todo o esgoto doméstico gerado, levando em conta que São Paulo possui alta densidade populacional.

É necessário ampliar os estudos genéticos, pois os resultados para *Giardia* podem estar subestimados e adotar políticas que evitem a propagação da doença. O estudo molecular realizado em Campinas pode contribuir para evidenciar o perfil epidemiológico dessa protozoose (38).

É importante o uso de águas subterrâneas de boa qualidade para a irrigação

de frutas e vegetais em pequenas propriedades. A água encontrada em poços comuns está mais sujeita a contaminação por efluentes devido à pouca profundidade. A profundidade ideal para poços artesanais é de 90 a 130 metros e poços comuns de 14 a 37 metros, evitando então a possível aquisição de giardíase e criptosporidiose pela via fecal-oral (40). Quanto às águas de recreação, esta é um importante veículo para aquisição de doenças por meio da ingestão acidental (42).

CONCLUSÃO

A realização desta revisão sistemática permitiu verificar o papel da água como meio de veiculação de *Acanthamoeba*, *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas de recreação e consumo. Devido a ingestão de alimentos contaminados, uso de água tratada contaminada, ingestão acidental durante a recreação e a falhas no processo de tratamento. Além disso, é importante salientar a necessidade de novos estudos para a verificação dos protozoários veiculadas na água oferecida à população, bem como a ampliação e melhoria da rede de tratamento de esgoto.

REFERÊNCIAS

1. Tundisi JG. Água no século XXI: Enfrentando a escassez. RiMa, IIE; 2003. 248 p.
2. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução N° 274. Recomendam a adoção de sistemáticas de avaliação da qualidade ambiental das águas. Brasília; 2000.
3. UNICEF and World Health Organization (WHO). Progress on sanitation and drinking water: 2015 update and MDG assessment [Internet]. 2015 [Acesso em: 12 de novembro de 2016]. Available from: https://www.unicef.org/publications/index_82419.html.
4. Trata Brasil. Situação Saneamento no Brasil [Internet]. 2013 [Acesso em 12 de novembro de 2016]. Available from: <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento-no-brasil>

5. Amaral LA do, Filho AN, Junior ODR, Ferreira FLA, Barros LSS. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Rev Saúde Pública*. 2003;37(4):510-4.
6. Sato MIZ, Galvani AT, Padula JA, Nardocci AC, Lauretto M de S, Razzolini MTP, et al. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. *Sci Total Environ* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;442(1):389-96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.077>.
7. Trata Brasil. Esgotamento sanitário inadequado e impactos na saúde da população 2008-2011 [Internet]. 2011 [Acesso em 12 de novembro de 2016]. Available from: <http://www.tratabrasil.org.br/esgotamento-sanitario-inadequado-e-impactos-na-saude-da-populacao>.
8. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health*. 2007;5(1):1-38.
9. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks e An update 2004 e 2010. *Water Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;45(20):6603-14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>.
10. Carvalho-Almeida TT, Pinto PLS, Quadros CMS, Torres DMAG V, Kanamura HY, Casimiro AM. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2006;48(1):27-32.
11. Gonçalves EM do N, Silva AJ da, Eduardo M, Paula B de, Uemura IH, Moura INS, et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. *Clinics*. 2006;61(119):9-15.
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water – United States, 2003-2004. *Surveillance Summaries*. *MMRW* 1996;55:2-25 [Internet]. 2006 [Acesso em 12 de outubro de 2016]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5512a1.htm>.
13. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*. 2004;34(9):1001-27.
14. Hoffmann R, Michel R. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2001;203(3):215-9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463904700310>.
15. Dendana F, Sellami H, Jarraya F, Sellami A, Makni F, Cheikhrouhou F, et al. Free-living amoebae (FLA): detection, morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* genus in the hydraulic system of an haemodialysis unit in Tunisia. *Parasite*. 2007;15(2):137-42.
16. Trabelsi H, Sellami A, Dendana F, Sellami H, Cheikh-Rouhou F, Makni F, et al. Free-living Amoebae (FLA): morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* in dental unit water. *Parasite*. 2005;17(1):67-70.
17. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbio*. 2007;50(1):1-26.
18. Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K, Rott MB. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Curr Microbiol*. 2010;60(3):185-190.
19. Caumo K, Frasson AP, Pens CJ, Panatieri LF, Frazzon APG, Rott MB. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009;103(6):477-485.
20. Magliano Ana CM, Teixeira MMG, Alfieri SC. Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterization of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences. *Parasitology* [Internet]. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2012;139(1):45-52. Available from: <https://www.cambridge.org/core/article/revisiting-the-acanthamoeba-species-that-form-star-shaped-cysts-genotypes-t7-t8-t9-and-t17-characterization-of-seven-new-brazilian-environmental-isolates-and-phylogenetic-inferences/DFEEB7557A730B24A17A161AE0AF A201>.
21. Magliano ACM, Silva FM da, Teixeira MMG, Alfieri SC. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. *Exp Parasitol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;123(3):231-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.07.006>.
22. Silva MA da, Rosa JA da. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. *Rev Saúde Pública*. 2003;37(2):242-6.
23. Winck MAT, Caumo K, Rott MB. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande do Sul, Brazil. *Curr Microbiol* [Internet]. 2011;63(5):464. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-011-0003-5>.
24. Aichelburg AC, Walochnik J, Assadian O, Prosch H, Steuer A, Perneczky G, et al. Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* sp. infection with miltefosine. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(11):1743-6.
25. Arance-gil Á, Gutiérrez-ortega ÁR, Villa-collor C, Nieto-bona A, Lopes-ferreira D, González-méijome JM. Corneal cross-linking for *Acanthamoeba* keratitis in an orthokeratology patient after swimming in contaminated water. *Contact Lens Anterior Eye* [Internet]. British Contact Lens Association; 2014;37(3):224-7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clae.2013.11.008>.

26. Chen X-M, Keithly JS, Paya C V, LaRusso NF. Cryptosporidiosis. *N Engl J Med* [Internet]. Massachusetts Medical Society; 2002 May 30;346(22):1723–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra013170>.
27. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* [Internet]. 2000 Nov;30(12–13):1305–22. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S020751900001351>
28. Ortega YR, Adam RD. *Giardia*: Overview and Update. *Clin Infect Dis*. 1997;25(3):545–9.
29. Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. 2004;126:15–35.
30. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors* [Internet]. 2012;5(1):6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-6>.
31. Costa CFS da, Mendoza-Sassi RA. Identificação de patógenos humanos nas águas que margeiam a cidade do Rio Grande/RS. *Rev Baiana Saúde Pública*. 2007;31(2):201–11.
32. Machado ECL, Stamford TLM, Machado EHL, Soares DS, Albuquerque MNL. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife-PE. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2009;61(6):1459–62.
33. Sassi RAM, Costa CFS da, Scaini CJ, Almeida PES de, Gatti FA dos A, Silveira ES, et al. Microrganismos patogênicos em amostras de água no porto brasileiro de Rio Grande: Um problema de saúde pública. *VITTALLE - Rev Ciências da Saúde* [Internet]. 2011;22(2):51–61. Available from: <https://www.seer.furg.br/vittalle/article/view/1498>.
34. Stancari RCA, Correia M. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em mananciais e águas de abastecimento público. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(4):453–60.
35. Araújo RS, Dropa M, Fernandes LN, Carvalho TT, Sato MIZ, Soares RM, et al. Genotypic characterization of *Cryptosporidium hominis* from water samples in São Paulo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(5):834–8.
36. Santos LU dos, Neto R, Franco RMB, Guimarães JR. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. *Eng Sanit e Ambient* [Internet]. 2011;16(2):115–20. Available from: http://www.scielo.br/pdf/esa/v16n2/v16n2a03.pdf%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522011000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
37. Alves D de SMM, Moraes AS, Nitz N, Gurgel-Gonçalves R, Cuba CAC. Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* similar to genotypes T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasília, Federal District, Brazil. *Exp Parasitol*. 2012;131(1):239–244.
38. Durigan M, Abreu AG, Zucchi MI, Franco RMB, De Souza AP. Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus genotyping reveals zoonotic potential between clinical and environmental sources in a metropolitan region of Brazil. *PLoS One*. 2014;9(12):1–27.
39. Almeida JC, Martins FDC, Neto JMF, Santos MM Dos, Garcia JL, Navarro IT, et al. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. 2015;24(3):303–8.
40. Tiyo R, Souza CZ de, Nishi L, Brustolin CF, Ratti BA, Falavigna Guilherme AL. Water from different sources used for the irrigation of vegetables to be marketed: research on *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., and coliforms in Parana, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(4):333–6.
41. Freitas DA de, Paiva ALR de, Filho JAA de C, Cabral JJ da S, Rocha FJS. Occurrence of *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and other pathogenic intestinal parasites in the Beberibe river in the State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(2):220–3.
42. Grott, Cristina S, Hartmann B, Filho HH da S, Franco RMB, Goulart JAG. Detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água bruta das estações de tratamento no município de Blumenau, SC, Brasil. *Rev Ambient e Agua*. 2016;11(3):691–701.