Universidade de São Paulo

Faculdade de Saúde Pública

**Ocorrência e identificação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em
amostras de água superficial destinada ao abastecimento
público do estado de São Paulo**

Bruna Suellen Breternitz

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

Área de Concentração: Saúde Pública

Orientadora: Dr^a Maria Tereza Pepe Razzolini

São Paulo
2018

**Ocorrência e identificação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em
amostras de água superficial destinada ao abastecimento
público do estado de São Paulo**

Bruna Suellen Breternitz

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

Área de Concentração: Saúde Pública

Orientadora: Dr^a Maria Tereza Pepe Razzolini

São Paulo

2018

DEDICATÓRIA

À minha família Ailton C. Breternitz, Ediveth Ap. P. Breternitz, Brenda Breternitz e

Lincoln Zappelini sem vocês jamais chegaria tão longe, quiçá aqui.

À minha avó, Abigail Ferraz de Campos Breternitz (in memorian).

AGRADECIMENTOS

Como dizia o poeta Vinicius de Moraes:

*“Eu não ando só
Só ando em boa companhia”*

Aos meus pais, obrigada pelo exemplo de verdadeiros lutadores, trabalhadores e íntegros, que me ensinaram tantos predicados valiosos e valores que só se adquirem com uma excelente educação.

À minha irmã Brenda Breternitz, que sempre me apoiou em todos os momentos e decisões da minha vida.

Ao Lincohn Zappellini, me espelho em você. Obrigada por embrenhar-me nesse mundo da ciência.

À minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Maria Tereza Pepe Razzolini. Obrigada por me apoiar sempre, me ensinar, me orientar, me aconselhar, confiar, compreender, enfim... dividir esses anos maravilhosos de estudo e aprendizado comigo.

Dr^a Ronalda Araújo, obrigada por ser o sentido de inspiração para mim. Em 2013 quando me formava na graduação escrevi “Saiba que se sua orientação tivesse preço valeria ouro”. Hoje, em 2018, não há valor, há gratidão.

Ao Prof^o Rodrigo Soares, por aceitar fazer parte dessa jornada desde a qualificação. Suas contribuições são valiosas demais para o estudo e para mim.

À Prof^a Regina Maura, por aceitar integrar a banca de avaliação deste trabalho. Me sinto honrada, sem exageros.

Aos professores suplentes que com carinho e dedicação acompanham esse estudo.

Dr^a Milena Dropa e amiga Mi, obrigada por ter acreditado em mim em todos os momentos em que duvidei. Cada sorriso, cada abraço, cada sermão, cada dia compartilhado com você me ensinou o que é companheirismo. Você é a luz desse estudo.

À minha amiga Jéssica Santiago, companheira profissional do laboratório e da vida. Aprendo todo dia com você. Obrigada pela paciência, amizade, dedicação, sorrisos, abraços diários e por partilhar das minhas loucuras como uma verdadeira irmã.

Ao amigo e profissional Bruno Kuchkarian, você foi o braço direito desse trabalho. Muito obrigada!

Às amigas Veridiana, Geyse, Giovanna, Francisca e Solange do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Resistência Antimicrobiana (MicroRes) da Faculdade de Saúde Pública por todas as conversas e incentivos .

Às minhas amigas e companheiras do Departamento de Saúde Ambiental Sofia Oliver, Ximena Roncancio e Michele Toledo, vocês são os verdadeiros exemplos de mulheres na ciência para mim. Obrigada pela amizade e carinho nessa jornada acadêmica.

À querida amiga Denise da Veiga pelo auxílio e confecção dos lindos mapas que compõe esse estudo. Obrigada por trazer toda essa beleza à minha dissertação e amizade para toda vida.

À minha irmãzinha acadêmica, Isabela Martins. Você me ensinou, ajudou, aconselhou e encantou tanto. Obrigada, epidemiologia por colocar essa pessoa maravilhosa no meu caminho.

Às minhas amadas amigas Carol, Camilla (Cacá), Mell e Amanda vocês foram de fundamental importância para mim nessa jornada. Por todos os momentos de amor, alegrias, viagens e amizade verdadeira compartilhados nesses últimos anos.

Às amigas da graduação e vida Carolina Espolaor, Karina Costa, Camila Yonamine e Mayara Martins, Hortência Azevedo e Jéssica Puerta. Obrigada pelo incentivo desde o início do mestrado até a realização deste trabalho. Desculpe-me ausentar como amiga nesses últimos meses.

Ao profissional excelente Guilherme Gomes pela arte maravilhosa deste trabalho.

À minha família amada, todos os BRETERNITZ, um amor sem fim. Vocês acreditam em mim e é isso que me impulsiona.

Ao Profº José Manuel, Profº Antônio, Profº André Almeida, Lurdes e Maria João, amigos que fiz no Instituto Nacional de Saúde Drº Ricardo Jorge (INSA), no Porto, Portugal. O último mês partilhado com vocês enriqueceu meu coração com boas recordações e ensinamentos acadêmicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo fomento à pesquisa, essencial para a realização desse estudo.

Águas

*Desde o começo dos tempos águas e chão se amam.
Eles se entram amorosamente
E se fecundam.
Nascem formas rudimentares de seres e de plantas
Filhos dessa fecundação.
Nascem peixes para habitar os rios
E nascem pássaros para habitar as árvores.
Águas ainda ajudam na formação das conchas e dos
caranguejos.
As águas são a epifania da Natureza.
Agora penso nas águas do Pantanal
Nos nossos rios infantis
Que ainda procuram declives para correr.
Porque as águas deste lugar ainda são espraçadas
para o alvoroço dos pássaros.
Prezo os espraçados destas águas com as suas
beijadas garças.
Nossos rios precisam de idade ainda para formar
os seus barrancos
Para pousar em seus leitos.
Penso com humildade que fui convidado para o
banquete destas águas.
Porque sou de bugre.
Porque sou de brejo.
Acho que as águas iniciam os pássaros
Acho que as águas iniciam as árvores e os peixes
E acho que as águas iniciam os homens.
Nos iniciam.
E nos alimentam e nos dessedentam.
Louvo esta fonte de todos os seres, de todas as
plantas, de todas as pedras.
Louvo as natências do homem do Pantanal.
Todos somos devedores destas águas.
Somos todos começos de brejos e de rãs.
E a fala dos nossos vaqueiros carrega murmúrios
destas águas.
Parece que a fala dos nossos vaqueiros tem consoantes
líquidas
E carrega de umidez as suas palavras.
Penso que os homens deste lugar
são a continuação destas águas.*

Manoel de Barros

RESUMO

BRETERNITZ, B. S. Ocorrência e identificação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de água superficial destinada ao abastecimento público do estado de São Paulo. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2018.

Estudos de revisão sobre surtos associados à transmissão hídrica revelaram que os protozoários parasitas *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis* (sinonímia: *G. lamblia* e *G. intestinalis*) são os principais responsáveis pelo maior número de casos registrados em todo o mundo. A contaminação das águas superficiais que servem ao abastecimento público por estes protozoários representa risco à saúde humana e animal, pois ambos parasitas apresentam resistência à cloração, processo convencional utilizado para desinfecção em Estações de Tratamento de Água (ETAs). Em vista desta lacuna, o presente estudo propõe identificar espécies e genótipos de *Cryptosporidium* e *Giardia* a partir de 128 amostras de águas superficiais de 11 mananciais do estado de São Paulo, de acordo com o Método 1623.1 (USEPA, 2012). Para identificar estes parasitas, foi realizada a recuperação dos (oo) cistos a partir de lâminas raspadas, seguindo o protocolo adaptado da USEPA, em seguida, utilizou-se o PCR em tempo real para identificar os genes 18S rRNA para *Cryptosporidium* e SSU para *Giardia*. Os resultados mostraram que a frequência de ocorrência desses protozoários nos pontos de captação foi de 29,7% para *Giardia* e 30,4% para *Cryptosporidium*. Os cistos estavam presentes em 10 dos 11 pontos de captação com frequências que variaram de 17 a 100%, e concentrações que variaram de <0,1 (Limite de Detecção=0,1) a 17,7 cistos /L, o que evidenciou a baixa qualidade dessas águas. Os oocistos ocorreram em uma frequência de 17 a 50% nas amostras positivas com concentrações que variaram de <0,1 a 11,5 oocistos/L. O ensaio de PCR em tempo real detectou um total de 81,4% (57/70) de amostras positivas para *Cryptosporidium hominis-parvum-meleagridis* e 21,4% (15/70) amostras positivas para *Giardia duodenalis*. A frequência de ocorrência desses agentes patogênicos e as altas concentrações de espécies antrópicas encontradas constituem um cenário de grande preocupação do ponto de vista da saúde pública, considerando-se que amostras foram coletadas dos locais de captação para o abastecimento público de água.

Palavras chave: *Cryptosporidium*, *Giardia*, água superficial, lâminas, identificação.

ABSTRACT

BRETERNITZ, B. S. Occurrence and identification of *Cryptosporidium* and *Giardia* from surface water catchment in Sao Paulo, Brazil [Dissertation]. São Paulo, School of Public Health, University of São Paulo, 2018.

Review studies on waterborne outbreaks have been showing that *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* (synonym: *G. lamblia* and *G. intestinalis*) are the primarily responsible for the highest number of the cases recorded worldwide. Contamination of surface waters catchments by these protozoa is a risk factor to human health because both parasites are resistant to chlorination, which is a conventional process used for disinfection in water treatment plants (WTP). The present study aimed to identify species of *Cryptosporidium* and *Giardia* recovered from surface water catchment samples from 11 municipalities from the State of São Paulo, totalizing 128 samples. Quantification of both parasites was carried out according to method 1623.1 (USEPA, 2012). In order to identify parasites, the recovering of (oo)cysts from slides followed USEPA's protocol by scraping slides, then Real Time PCR using the 18S rRNA genes for *Cryptosporidium* and *SSU* for *Giardia* were carried out. Results showed that the frequency of occurrence of these protozoa at the catchment points was 29,7% for *Giardia* and 30,4% for *Cryptosporidium*. Cysts were present in 10 of 11 catchments points with frequencies varying from 17 to 100% with concentrations ranging from <0.1 (Limit of Detection=0.1) to 17.7 cysts/L, which put in evidence the low quality of water. Oocysts occurred in a frequency from 17 to 50% in positive samples with concentrations ranging from <0.1 (LD) to 11.5 oocysts/L. The real-time PCR assay detected a total of 81.4% (57/70) of positive samples for *Cryptosporidium hominis-parvum-meleagridis* and 21.4% (15/70) samples positive for *Giardia duodenalis*. The frequency of occurrence of these pathogens and the high concentrations of anthropic species found is a concerning scenario for human health, considering samples have been collected from catchment sites for public water supply.

Keywords: *Cryptosporidium*, *Giardia*, surface water, slides, identification.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 QUALIDADE DA ÁGUA E REPERCUSSÕES À SAÚDE	22
3.2 RELEVÂNCIA DOS PROTOZOÁRIOS PATOGÊNICOS <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i>	27
3.2.1 <i>Cryptosporidium</i>	30
3.2.2 <i>Giardia</i>	39
3.3 OCORRÊNCIA DOS PROTOZOÁRIOS <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i>	45
3.4 FERRAMENTAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i>	50
4. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA	55
4.1.1 Aparecida	56
4.1.2 Araçoiaba da Serra e Piedade	57
4.1.3 Biritiba Mirim	59
4.1.4 Caraguatatuba	61
4.1.5 Guaratinguetá	62
4.1.6 Itanhaém	63
4.1.7 Juquiá	64
4.1.8 Serra Negra	66

4.1.9 Socorro	67
4.1.10 Taubaté	68
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CISTOS DE <i>Giardia</i> E OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i>	69
4.3.1 Amostragem	69
4.3.2 Análises realizadas para identificação de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i>	70
4.3.3 Concentração da amostra	71
4.3.4 Eluição da amostra	71
4.3.5 Concentração das lavagens	72
4.3.6 IMS (Separação Imunomagnética)	72
4.3.7 Coloração das lâminas	74
4.3.8 Leitura das lâminas	74
4.3.9 Cálculo e expressão dos resultados	75
4.4 CONTROLE DE QUALIDADE	76
4.5 RASPAGEM DE LÂMINAS	77
4.5.1 Seleção das lâminas para raspagem	77
4.5.2 Raspagem dos (oo) cistos das lâminas	78
4.6 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i>	78
4.6.1 Extração de DNA	78
4.6.2 PCR em tempo real	79
4.6.2.1 Identificação de <i>Cryptosporidium</i> – gene 18S rRNA	79
4.6.2.2 Identificação de <i>Giardia</i> – gene <i>SSU</i>	79
4.6.2.3 Condições de amplificação do PCR em tempo real	80
5 RESULTADOS	81
5.1 RESULTADOS DE OCORRÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO	81

5.2 RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO	92
6 DISCUSSÃO	98
7 CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXOS	118

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Principais patógenos de veiculação hídrica e sua sintomatologia	24
Quadro 2 - Influência das mudanças climáticas na disseminação de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i>	27
Quadro 3 - Sequência dos pares de <i>primers</i> e da sonda utilizados, descrito por Araújo (2015)	79
Quadro 4 - Sequência dos pares de <i>primers</i> e da sonda utilizados para detecção de <i>Giardia duodenalis</i> , descritos por YU <i>et al.</i> (2008)	79
Quadro 5 - Concentração de cistos de <i>Giardia</i> em amostras de água destinadas ao abastecimento público de 11 municípios de estado de São Paulo, dezembro de 2014 a novembro de 2015	89
Quadro 6 - Concentração de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em amostras de água destinadas ao abastecimento público de 11 municípios de estado de São Paulo, dezembro de 2014 a novembro de 2015	90
Tabela 1 - As espécies de <i>Giardia</i> atualmente reconhecidas como válidas, sua distribuição de hospedeiro e diferenças do comprimento do trofozoíto	43
Tabela 2 - Os <i>assemblages</i> atualmente reconhecidos de <i>Giardia duodenalis</i> , sua distribuição de hospedeiro e taxonomia proposta	44
Tabela 3 - Distribuição de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> sp., segundo as estações do ano, de dezembro de 2014 a novembro de 2015	91
Tabela 4 - Amostras positivas e negativas identificadas por PCR em tempo real	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas de transmissão de organismos patogênicos encontrados em esgotos e fezes humanas e animais	23
Figura 2 - Representação gráfica dos principais elementos envolvidos na epidemiologia de <i>Cryptosporidium hominis</i>	31
Figura 3 - Representação gráfica dos principais elementos envolvidos na epidemiologia de <i>Cryptosporidium parvum</i>	32
Figura 4 - Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium parvum</i>	36
Figura 5 - Esquema da patogenicidade de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i>	38
Figura 6 - Trofozoíto de <i>Giardia duodenalis</i> , com característica das organelas, núcleos, corpos medianos e quatro pares de flagelos e disco ventral	39
Figura 7 - Ciclo de vida <i>Giardia duodenalis</i>	41
Figura 8 - Mapa do Estado de São Paulo indicando os 11 municípios onde foram coletadas amostras de águas superficiais	55
Figura 9 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul	56
Figura 10 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Pirapora	58
Figura 11 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Tietê	60
Figura 12 - Caracterização da bacia hidrográfica do Baixo Rio Claro	61
Figura 13 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Ribeirão Guaratinguetá	63
Figura 14 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Branco	64
Figura 15 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Juquiá	65
Figura 16 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Ribeirão da Serra	66
Figura 17 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio do Peixe	67
Figura 18 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio do Una	69

Figura 19 - Cronologia das análises realizadas para identificação de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i>	70
Figura 20 - Frequência da ocorrência de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em 11 municípios do estado de São Paulo, dezembro de 2014 a novembro de 2015	82
Figura 21 - Concentração de (oo) cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em Aparecida no período de 12 meses	83
Figura 22 - Concentração de (oo) cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em Aparecida no período de 12 meses	84
Figura 23 - Concentração de (oo) cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em Biritiba Mirim no período de 12 meses	84
Figura 24 - Concentração de (oo) cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em Caraguatatuba no período de 12 meses	85
Figura 25 - Concentração de (oo) cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em Guaratinguetá no período de 12 meses	85
Figura 26 - Concentração de (oo) cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em Juquiá no período de 12 meses	86
Figura 27 - Concentração de (oo) cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em Itanhaém no período de 12 meses	86
Figura 28 - Concentração de (oo) cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em Piedade no período de 12 meses	87
Figura 29 - Concentração de (oo) cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em Serra Negra no período de 12 meses	87
Figura 30 - Concentração de (oo) cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em Socorro no período de 12 meses	88

Figura 31 - Concentração de (oo) cistos de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em Taubaté no período de 12 meses	88
Figura 32 - Gráfico do ensaio de PCR em tempo real com a amplificação positiva do IPC e amostras de <i>Giardia</i> para análise. As linhas abaixo do <i>threshold</i> (linha de corte) representam ruídos da reação de amplificação	93
Figura 33 - Gráfico do ensaio de PCR em tempo real para análise das amostras de <i>Cryptosporidium</i> . As linhas abaixo do <i>threshold</i> (linha de corte) representam ruídos da reação de amplificação	94
Figura 34 - Distribuição do número de espécies identificadas entre os 11 municípios para <i>Cryptosporidium hominis</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> e <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	96
Figura 35 - Distribuição do número de espécies identificadas entre os 11 municípios para <i>Giardia duodenalis</i>	97
Anexo 1 - Esquema de ensaio para detecção e quantificação de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> – USEPA 1623	118

1 INTRODUÇÃO

A ação antrópica e os usos inadequados dos recursos hídricos produzem consequências ambientais, como degradação e poluição. A poluição hídrica está intrinsecamente relacionada com a saúde, pois muitas doenças que afetam o ser humano são de veiculação hídrica (TUNDISI E MATSUMURA-TUNDISI, 2011; UNICEF; WHO, 2017).

A poluição dos recursos hídricos aliada à diminuição da disponibilidade e precárias condições sanitárias representam um fator de risco à saúde humana. Áreas sem abastecimento adequado de água potável e saneamento ambiental se configuram nas maiores cargas de doenças negligenciadas que afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo, atingindo principalmente, crianças menores de cinco anos de idade, idosos e imunodeficientes (WHO, 2017).

A segurança da água para consumo humano desempenha um papel fundamental na qualidade da vida humana. A água contaminada com excretas humanas e de animais atua como veículo para disseminação de doenças infecciosas causadas por micro-organismos patogênicos, como bactérias, helmintos, vírus e protozoários. Nessa perspectiva, a presença destes agentes patogênicos em águas superficiais destinadas ao abastecimento público representa um problema em saúde pública (WHO, 2006; TUNDISI E MATSUMURA-TUNDISI, 2011; MOREIRA; BONDELIND, 2017).

A contaminação da água para consumo por protozoários patogênicos é fator de risco para milhões de pessoas. Os gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia* são os principais protozoários patogênicos de transmissão hídrica (KARANIS *et al.*, 2007; BALDURSSON; KARANIS, 2011; EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017) e encontram-se no ambiente em sua forma de resistência, oocistos e cistos, respectivamente. Estes protozoários

parasitas são cosmopolitas e podem infectar diversos hospedeiros invertebrados e vertebrados, incluindo o ser humano (FAYER, 2004; GALLAS-LINDEMANN *et al.*, 2012b; SIQUEIRA-CASTRO *et al.*, 2016; IMRE *et al.*, 2017).

As espécies dentro desses gêneros podem provocar doenças gastrointestinais, sendo elas criptosporidíase e giardíase causada pela ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* (FAYER; MORGAN; UPTON, 2000; KARANIS *et al.*, 2007; COKLIN *et al.*, 2007). A transmissão ocorre pela via fecal-oral através da disseminação de cistos e oocistos no ambiente por hospedeiros contaminados (FAYER; DUBEY; LINDSAY, 2004; MIYAMOTO; ECKMANN, 2015; EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017).

A transmissão da criptosporidíase e giardíase pela água agrava-se em países em desenvolvimento, onde existe a necessidade de melhorias nas condições sanitárias, sendo associadas às condições socioeconômicas. No Brasil, somente 49,8% do esgoto gerado é tratado (SNIS, 2016) e segundo dados do relatório da CETESB (2015) no estado de São Paulo 37% do esgoto coletado não é tratado. Dessa forma, o despejo de esgotos domésticos não tratados em corpos hídricos destinados ao abastecimento público ainda representa uma das principais causas de contaminação das águas no estado de São Paulo (CETESB, 2015).

Cryptosporidium e *Giardia* são os parasitas mais comumente relatados como contaminantes biológicos de recursos hídricos (KARANIS *et al.*, 2007; BALDURSSON; KARANIS, 2011; GALLAS-LINDEMANN *et al.*, 2012a; EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017a). Segundo a revisão de surtos epidêmicos relacionados à veiculação hídrica realizado por Efstratiou *et al.*, (2017) no período de cinco anos entre janeiro de 2011 e dezembro 2016, 381 surtos de doenças parasitárias foram relatados em todo o mundo. O agente etiológico mais comum foi *Cryptosporidium* spp. relatado em 63% (239) dos surtos,

enquanto que *Giardia* spp. foi relatado em 37% (142). Estima-se que a prevalência humana de criptosporidíase seja entre 3—5% e de giardíase seja aproximadamente 10% da população mundial.

As doenças transmitidas por água e alimentos no Brasil são classificadas como DTAs (Doenças Transmitidas por Alimentos). Entre os anos de 2000 e 2013 foram registrados 8.746 surtos de DTAs, sendo *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. responsáveis por 13 e 22 surtos, respectivamente (ALVES, 2013). No estado de São Paulo, o Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretária da Saúde do estado de São Paulo registrou, entre os anos 2000 e 2010, 12 surtos cujo agente etiológico identificado foi *Giardia* sp. e outros 11 causados por *Cryptosporidium* sp. (CVE, 2013).

Os principais eventos para a contaminação desses protozoários em corpos hídricos são chuvas intensas que podem ocasionar escoamento superficial, as atividades agropecuárias e contaminação por esgoto (PLUTZER *et al.*, 2008; CHALMERS, R. M.; 2012; RYAN; FAYER; XIAO, 2014). As fezes de hospedeiros contaminados por estes protozoários contêm densidades de cistos da ordem de 10^5 g/fezes e oocistos cerca de 10^6 g/fezes, dessa forma a eliminação de fezes no ambiente potencializa a disseminação desses protozoários (USEPA, 1999). Segundo Ongerth (2013) as taxas de produção de oocistos de *Cryptosporidium* variaram de 2×10^6 oocistos por metano/dia de uma bacia hidrográfica montanhosa com pouca atividade humana, no entanto em áreas de produção leiteira essa concentração aumenta para 2×10^8 oocistos por metano/dia.

O potencial zoonótico é um agravante para a contaminação ambiental, pois as populações pecuárias são expressivas no mundo (gado leiteiro, gado bovino, suínos dentre outros animais de criação), e a eliminação das fezes ocorre no ambiente, em campos com pouco ou nenhum tratamento, exceto em locais onde existem programas de gerenciamento.

Os autores ressaltam o fato de pessoas infectadas e bezerros neonatais excretarem 10^9 - 10^{10} oocistos de *Cryptosporidium parvum* no período de uma semana aproximadamente (FAYER; DUBEY; LINDSAY, 2004).

Portanto, nesse contexto, faz-se necessário o monitoramento da ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em águas destinadas ao abastecimento público e recreacional. No Brasil, a Portaria de consolidação MS 05/2018, Art. 15 do anexo XX (BRASIL, 2018) estabelece a monitorização de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nos pontos de captação de água onde se verifica média geométrica anual maior ou igual a 10^3 *Escherichia coli*/100mL.

Uma vez no ambiente, as formas de resistência destes parasitas, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* são capazes de sobreviver às condições ambientais adversas mantendo-se infecciosos por longos períodos. Além disso, são resistentes à desinfecção de água por adição de cloro, processo convencional de tratamento nas Estações de Tratamento de Água (ETAs) (FAYER *et al*, 2000; BETANCOURT; ROSE, 2004).

A quantificação desses protozoários no ambiente possibilita determinar padrões de circulação, sobretudo em corpos hídricos. No entanto, as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas como uma ferramenta indispensável para a identificação e caracterização das espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* capazes de infectar o homem. Embora a detecção desses protozoários no ambiente ainda seja um desafio, a necessidade de métodos moleculares para a diferenciação em nível de espécie torna-se essencial para a elucidação de dados epidemiológicos, como a determinação das fontes de contaminação de corpos hídricos e compreensão das doenças relacionadas aos surtos (CHALMERS *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2011).

Esta pesquisa contribuirá com dados primários da ocorrência e circulação de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas superficiais destinadas ao abastecimento público no estado de São Paulo, cujas amostras foram coletadas de 11 mananciais pertencentes a sete diferentes Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHIs). Dessa forma será possível verificar se há disseminação de espécies antrópicas nos pontos de captação de água dos mananciais estudados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Quantificar e identificar oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* a partir de amostras de águas superficiais do estado de São Paulo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* de amostras de águas superficiais de 11 mananciais de abastecimento público no estado de São Paulo;
- Identificar as espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* com a aplicação de IMS (separação imunomagnética), raspagem de lâminas e PCR em tempo real utilizando o gene *18S* rRNA específicos para *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium meleagridis* e o gene *SSU* para *Giardia duodenalis*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 QUALIDADE DA ÁGUA E REPERCUSSÕES À SAÚDE

Segundo o relatório “*Drinking water, sanitation and hygiene*” publicado pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) em conjunto com a “*World Health Organization*” (WHO) mais de 844 milhões de pessoas ainda não possuem acesso à água potável e segura, e cerca de 2,3 bilhões não tem serviços adequados de saneamento básico. A ausência ou precariedade do acesso à água potável e saneamento representa um alto risco iminente à saúde humana, pois propicia a incidência de doenças infecciosas, as quais atingem as populações mais suscetíveis, como crianças menores de cinco anos, idosos e imunodeficientes (WHO; UNICEF, 2017).

A transmissão de doenças infecto-contagiosas pode ocorrer de diversas formas, porém, é indiscutível sua relação com a qualidade sanitária do meio ambiente (Figura 1) (IBGE, 2012). Dados do relatório da WHO e UNICEF (2017) apontam que 892 milhões de pessoas ainda exercem a prática da defecção ao ar livre. Essa prática pode comprometer a qualidade à água de qualidade nestas regiões, inviabilizando seu consumo, pois existe a possibilidade de contaminação dos recursos hídricos nas proximidades por escoamento superficial.

Os recursos hídricos contaminados por descargas de resíduos humanos e de animais transportam grande variedade de patógenos, entre eles bactérias, vírus, protozoários ou organismos pluricelulares que podem causar doenças gastrointestinais. Segundo o relatório “*Why children are still dying and what can be done*” (WHO; UNICEF; 2009) aproximadamente 1,7 milhões de crianças menores de cinco anos morrem anualmente devido à poluição e a falta de condições sanitárias adequadas.

Figura 1 - Rotas de transmissão de organismos patogênicos encontrados em esgotos e fezes humanas e animais

Fonte: Adaptado de Tundisi e Matsumura-Tundisi (2011)

A diarreia é um sintoma comum de infecções gastrointestinais que pode ser causada por diversos agentes patogênicos. No entanto, alguns organismos são responsáveis pela maioria dos casos agudos de diarreia (Quadro 1). O rotavírus é a principal causa de diarreia aguda, sendo responsável por cerca de 40% de todas as internações hospitalares. Os agentes patogênicos *Escherichia coli*; *Shigella*, *Campylobacter*, *Salmonella* e *Vibrio cholerae* representam as principais bactérias causadoras de gastroenterites. O protozoário parasita *Cryptosporidium* sp. é a segunda maior causa de diarreia, tem sido frequentemente isolado em crianças hospitalizadas menores de um ano e imunodeficientes, como os pacientes HIV positivos (WHO; UNICEF; 2009; KOTLOFF *et al.*, 2013).

Quadro 1 - Principais patógenos de veiculação hídrica e sua sintomatologia

Agente patogênico	Sintomatologia
Bactérias	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Diarreia aquosa (às vezes sanguinolenta), dor abdominal, febre, náuseas e vômitos
<i>Escherichia coli</i>	Diarreia (frequentemente sanguinolenta), vômitos e cólicas estomacais severas
<i>Salmonella sp.</i>	Diarreia aquosa (às vezes sanguinolenta), dor abdominal, febre, náuseas e vômitos
<i>Salmonella typhi</i>	Diarreia, aumento do baço, dor de cabeça, mal-estar, fadiga, febre, calafrios e gastroenterite
<i>Shigella sp.</i>	Diarreia aquosa e febre baixa ou moderada
<i>Vibrio cholera</i>	Diarreia, vômitos e cólicas abdominais
Helmintos	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Diarreia, cólicas, dor abdominal, náuseas e vômitos
<i>Trichuris trichuria</i>	Diarreia crônica, que pode ou não vir acompanhada de muco ou sangue misturado às fezes
Protozoários	
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Diarreia aquosa ou branda autolimitante, cólicas intestinais, flatulência, náusea, perda de peso, associada a um quadro de má absorção de nutrientes
<i>Giardia duodenalis</i>	Diarreia, seguida de períodos de prisão de ventre e disenteria aguda, dores abdominais e febre baixa
<i>Entamoeba coli</i>	Diarreia, seguida de períodos de prisão de ventre e disenteria aguda, dores abdominais e febre baixa
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Diarreia, má absorção, perda de peso, náuseas e vômitos
Vírus	
Rotavírus	Diarreia aguda, geralmente aquosa, sem sinais de muco e sangue, vômitos, febre e mal-estar
Norovírus	Diarreia, vômito, febre e dores abdominais e de cabeça
Hepatite A e B	Ocorrência de náuseas e dor abdominal, mal-estar, náuseas, urina escura, aumento do fígado e icterícia

Fonte: Adaptado de WHO (2006); Madigan, M. T *et al.* (2010) e Tundisi e Matsumura-Tundisi (2011)

Melhorias no acesso a água potável segura e condições de saneamento ambiental adequado, juntamente com a promoção de boas práticas de higiene, podem ajudar a prevenir a diarreia infantil. De fato, estima-se que 88% de óbitos por diarreia no mundo são atribuíveis a água insegura, saneamento inadequado e falta de higiene (WHO; UNICEF; 2009). O saneamento está intrinsecamente associado à saúde humana, ao desenvolvimento sustentável e a formação de uma sociedade mais equânime. O conjunto de ações em prol aos serviços sanitários trazem benefícios e melhoramento dos recursos hídricos, sobretudo, aqueles destinados ao abastecimento e distribuição de água e a saúde pública.

Nesse sentido, as metas dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODM – 6.3) para 2030 é garantir disponibilidade hídrica, gestão sustentável da água e saneamento para todos, onde haja acesso universal e equitativo. Aprimorar o manejo e desenvolvimento dos

recursos hídricos é um fator crítico para obter o cumprimento mais amplo do conjunto dos ODM. Vale ressaltar que o contingente de pessoas que ainda não tem acesso à água limpa e aos serviços de saneamento é expressivo e um problema de saúde pública atual, principalmente, na Ásia, África, América Latina e Caribe (WHO; UNICEF, 2017).

Nos países em desenvolvimento, a falta de infraestrutura básica para o fornecimento de água potável é considerada uma das principais causas para a disseminação de doenças endêmicas e epidêmicas transmitidas pela água. As rotas mais frequentes para transmissão de microrganismos patogênicos é o contato direto, onde ocorre a ingestão e inalação de água contaminada. No entanto, embora a maioria das infecções e a mortes por doenças infecciosas transmitidas pela água afetem pessoas em países em desenvolvimento, estas também podem causar morbidades e preocupações significativas em países desenvolvidos. Um número limitado de agentes infecciosos representa a maioria das doenças, dessa forma, avanços no tratamento e prevenção dessas infecções traria melhorias significativas no âmbito da saúde global (MIYAMOTO; ECKMANN, 2015).

Segundo a revisão literária de mortalidade associada a doenças de veiculação hídrica nos Estados Unidos, Gargano *et al.* (2017) documentaram entre 2003 e 2009, 6.939 óbitos anuais associados a 13 agentes patogênicos ou síndromes envolvidas em surtos de doenças de transmissão hídrica, destes 493 (7%) mortes foram causadas por sete agentes patogênicos transmitidos pela via fecal-oral, sendo eles *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *E. coli*, *Giardia*, Hepatite A, *Salmonella* e *Shigella*. A mortalidade de pacientes com condições de comprometimento imunológico foi maior entre aqueles infectados com os protozoários parasitas *Cryptosporidium* (86,2%) e *Giardia* (56,2%).

Doenças causadas por protozoários patogênicos de veiculação hídrica tem distribuição mundial, resultando em quatro bilhões de casos de diarreia e 1,6 milhão de

mortes por ano e, 62,5 milhões de anos de vida ajustadas por incapacidade (DALYs) (WHO, 2009). Dentre os parasitas entéricos responsáveis por infecções gastrointestinais, encontram-se os protozoários patogênicos *Cryptosporidium* e *Giardia* que são os principais agentes etiológicos causadores de surtos de transmissão hídrica no mundo (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017b).

Os oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* na água tornam-se uma preocupação para as autoridades sanitárias e para a gestão dos recursos hídricos responsáveis pelo abastecimento de água para consumo humano (CARMENA, 2010), uma vez que, a disseminação de oocistos e cistos em águas superficiais pode ocorrer por diversos fatores ambientais como a contaminação pela agropecuária, esgotos *in natura*, além de fatores relacionados às mudanças climáticas como as fortes chuvas (escoamento superficial), a escassez de chuvas (aumento da concentração de patógenos nos recursos de água) e o aumento da temperatura (LAL et al., 2013).

Segundo relatos de Lal *et al.* (2013) as mudanças climáticas globais poderão afetar a viabilidade e disseminação desses parasitas no ambiente, enquanto as mudanças no uso e ocupação da terra agrícola podem influenciar fontes e reservatórios de infecção (Quadro 2). Embora esses fatores possam ter efeitos independentes, sua consequência sobre a incidência de *Cryptosporidium* e *Giardia* é diretamente associada. Dessa forma, a proteção dos recursos hídricos contra os agentes patogênicos ainda permanece como uma das preocupações mais desafiadoras para toda a rede de abastecimento de água para consumo humano (CARMENA, 2010).

Quadro 2 - Influência das mudanças climáticas na disseminação de *Cryptosporidium* e *Giardia*

Mudança ambiental esperada	Efeito na sobrevivência/ transmissão de patógenos ^a	Mudança no risco ^b
Aumento de temperatura	↑ Taxa de morte de oo (cistos) ↑ Dessecação ↑ Transmissão mecânica por vetores alternativos ↑ Alongamento da estação de transmissão ↑ Introdução em áreas anteriormente muito frias	– – + + +
Aumento de precipitação	↑ Escoamento ↑ Ressuspensão de oo (cistos) em recursos de água ↑ Inundações ↑ Contaminação de recursos de água por efluente	+ + + +
Diminuição de precipitação	↑ Concentração em recursos de água ↑ Armazenamento de água ↓ Escoamento ↑ Contaminação de fontes de águas subterrâneas	+ + – +
Aumento da intensificação da agropecuária	↑ Fontes de patógeno-reservatório ↑ Contaminação de recursos de água ↑ Contaminação de fontes alimentares ↑↓ Conectividade de população ↑↓ Conectividade ecológica	+ + + +/- +/-

Fonte: Adaptado LAL *et al.* (2013)

^a ↑, aumento; ↓, diminuição.

^b +, Aumento do risco de doença; –, diminuição do risco de doença.

3.2 RELEVÂNCIA DOS PROTOZOÁRIOS PATOGÊNICOS *Cryptosporidium* E *Giardia*

Os protozoários dos gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia* são parasitas que infectam o sistema gastrointestinal de animais invertebrados e vertebrados, incluindo o homem (CARMENA, 2010; GALLAS-LINDEMANN *et al.*, 2012b; SIQUEIRA-CASTRO *et al.*, 2016; IMRE *et al.*, 2017) As espécies dentro desses gêneros constituem as causas mais comuns de diarreia protozoária, acarretando morbidades e mortalidades em todo mundo (CERTAD *et al.*, 2017).

KOTLOFF *et al.*, (2013) realizaram o estudo intitulado *Global Enteric Multicenter Study* (GEMS) para identificar os agentes etiológicos e a importância das doenças diarreicas em crianças na África e sul da Ásia. Os resultados do GEMS mostraram que o protozoário *Cryptosporidium* spp. está entre as principais causas de diarreia moderada a grave em crianças

menores de dois anos e que *Giardia duodenalis* infecta cerca de 200 milhões de pessoas no mundo, sendo responsável pela diarreia aguda em crianças menores de cinco de anos.

A epidemiologia da criptosporidíase e da giardíase é complexa. As rotas de transmissão mais frequentes são a ingestão de água ou de alimentos contaminados com cistos ou oocistos infecciosos. Contatos diretos entre pessoas ou entre pessoas e animais, também são importantes vias de transmissão para o desenvolvimento das doenças. Os indivíduos imunocomprometidos (ou seja, pacientes com HIV/AIDS e câncer, crianças ou idosos) tem maior risco nas consequências clínicas dessas doenças (FAYER *et al.*, 2000; COKLIN *et al.*, 2007; CARMENA, 2010).

A água desempenha um papel relevante na transmissão desses patógenos, uma vez que ambos os parasitas podem persistir e resistir a processos de desinfecção convencionais (cloração) nas Estações de Tratamento de Água (ETAs). Dessa forma, o monitoramento desses protozoários patogênicos na água de abastecimento é essencial para garantir água potável e segura para seus consumidores (KARANIS *et al.*, 2007; BALDURSSON; KARANIS, 2011; PRYSTAJECKY *et al.*, 2014; EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017a; ROSADO-GARCÍA *et al.*, 2017).

Nesse sentido, uma forma eficiente para garantir a segurança da água de abastecimento público é através da abordagem de avaliação e gerenciamento de riscos para a saúde pública. Essa estratégia aborda todas as etapas do abastecimento de água, desde a captação até o seu consumo, visando à água de qualidade para a população. Essas abordagens e diretrizes constituem o Plano de Segurança da Água (PSA) (WHO, 2009). No Brasil, para avaliação sistemática do sistema e para solução alternativa coletiva de abastecimento de água, sob a perspectiva dos riscos à saúde, um dos critérios é a qualidade da água distribuída, conforme os

princípios dos PSA recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ou definidos em diretrizes vigentes no país (BRASIL, 2011).

A Portaria 2.914 (BRASIL, 2018) estabelece o monitoramento de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nos pontos de captação de água onde se verifica média geométrica anual maior ou igual a 10^3 *E. coli*/100mL. Entretanto, até a publicação do Relatório de Qualidade de Águas Superficiais do estado de São Paulo em 2013 estes dados de monitoramento anual não existiam (CETESB, 2013).

Uma vez no ambiente, as formas de resistência destes parasitas são capazes de sobreviver às condições ambientais adversas mantendo-se infecciosos por longos períodos, além de apresentarem características como baixa dose infectante (FAYER *et al.*, 2000). Dessa forma, podem representar ameaça para a saúde humana e animal considerando os usos múltiplos da água (água de consumo humano, recreacional e reuso) (BETANCOURT; ROSE, 2004; KARANIS *et al.*, 2007; ADAM, 2001; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008; WHO, 2011).

O potencial zoonótico de *Cryptosporidium* e *Giardia* em animais selvagens e domésticos tem sido importante para a elucidação da susceptibilidade entre os seres humanos e outros animais à infecção (HUNTER; THOMPSON, 2005). As espécies *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* são muito comuns em animais de criação, como gado bovino e leiteiro, especialmente em bezerros (FAYER; DUBEY; LINDSAY, 2004). Segundo Dixon *et al.* (2011) os seres humanos apresentam risco de infecção para os animais, evidenciando o potencial de transmissão zooantroponótica.

Poucos estudos investigaram o potencial de transmissão de doenças zooantroponóticas (humano a animal) pelo uso agrícola de águas residuais recuperadas, para os parasitas

Cryptosporidium e *Giardia*, ressaltando que ambos protozoários são endêmicos em seres humanos e em bovinos (DI GIOVANNI *et al.*, 2006).

Os cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* possuem dimensões pequenas, aproximadamente 8-14 micrometros e 4-6 micrometros, respectivamente. A sedimentação desses protozoários pode removê-los temporariamente da ingestão dos hospedeiros, no entanto, eventos de precipitação geram turbulência nas águas podendo resultar em ressuspensão dos sedimentos, além dos (oo) cistos poderem se aderir a conjuntos de partículas em suspensão. Essas características têm implicações importantes para os gestores dos sistemas hídricos que fornecem água para consumo (CARMENA, 2010).

As fezes de hospedeiros contaminados por estes protozoários contêm elevadas densidades de cistos (10^5 g/fezes) e oocistos (10^6 g/fezes) (USEPA, 1999). A eliminação de fezes no ambiente potencializa a disseminação desses protozoários. Ambos parasitas causam patologias que variam de casos assintomáticos para sintomáticos. Com isso aspectos relevantes da biologia e epidemiologia de *Cryptosporidium* e *Giardia* sob a ótica ambiental devem ser investigados, a fim de se obter correlações entre os patógenos parasitários e a qualidade da água (XIAO *et al.*, 2017)

3.2.1 *Cryptosporidium*

O protozoário *Cryptosporidium* (Phylum Apicomplexa) causa gastroenterite esporádica, bem como surtos caracterizados por diarreia aquosa, dor abdominal, náuseas, vômitos e febre baixa. O protozoário tem distribuição global, sendo considerada a segunda maior causa de morbidades e mortalidades em crianças, somente atrás dos surtos por rotavírus (RYAN; HIJJAWI, 2015). A epidemiologia da criptosporidíase humana é complexa, envolvendo rotas

de transmissão diretas (pessoa-pessoa e animal-pessoa) e indiretas (através de água, alimentos contaminados com oocistos infecciosos). Ingestão de alimentos, água potável e recreacional contaminados, hábitos de higiene precários entre crianças, contato com fezes de hospedeiros contaminados aumenta o risco de infecção por *Cryptosporidium* spp. (Figura 2 e 3). (XIAO, 2010; CACCIÒ; CHALMERS, 2016).

Figura 2 - Representação gráfica dos principais elementos envolvidos na epidemiologia de *Cryptosporidium hominis*

Atualmente são 31 espécies válidas, destas diversas espécies são reconhecidas como agentes patogênicos humanos, apesar da maioria dos casos sejam caracterizado por

Cryptosporidium hominis e *Cryptosporidium parvum*. Das 31 espécies, 20 espécies e genótipos foram identificados em humanos. Além disso, foram descritos mais de 40 genótipos de vários hospedeiros vertebrados (RYAN; FAYER; XIAO, 2014; RYAN *et al.*, 2016). Segundo Xiao (2010) em alguns países *Cryptosporidium meleagridis* é prevalente como *C. parvum* em populações humanas. Outras espécies de *Cryptosporidium* tem sido isoladas de humanos imunocomprometidos, como *C. canis*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. suis* (FAYER, 2010).

Figura 3 - Representação gráfica dos principais elementos envolvidos na epidemiologia de *Cryptosporidium parvum*

Fonte: Adaptado de Cacciò; Chalmers. (2016)

Entre vários grupos de subtipos de *Cryptosporidium hominis* (Ia, Ib, Id, Ie, If, Ig) o subtipo Ib foi identificado pela análise de sequência de 60 KDa do gene da glicoproteína (gp60) como o principal subtipo responsável por transmissão hídrica e alimentar em diversos países. O subtipo IbA10Ge foi encontrado em aproximadamente 50% das espécies de *Cryptosporidium hominis* associados a surtos nos Estados Unidos (EUA), incluindo o expressivo surto em Milwaukee, Wisconsin (EUA) em 1993 (LI *et al.*, 2013).

Ainda no estudo de Li *et al.* (2013) a ocorrência comum dos subtipos parentais e a aptidão biológica do subtipo recombinante com o traço IbA10G2 possivelmente facilitou a troca genética e a disseminação do subtipo virulento. Além disso, foi possível localizar a seleção do subtipo virulento IbA10G2 para uma região de 129 kb envolvendo gp60 no cromossomo 6. Essas observações podem melhorar a nossa compreensão do surgimento e disseminação de subtipos virulentos de *C. hominis*.

Recentemente, pensava-se que o *Cryptosporidium* era um parasita intracelular obrigatório que só se dividia dentro de um hospedeiro e, que os oocistos disseminados pelas fezes podiam sobreviver no meio ambiente, mas não podiam se multiplicar. À luz de dados biológicos e moleculares, incluindo a capacidade do *Cryptosporidium* para completar seu ciclo de vida na ausência de um hospedeiro e a produção de novos estágios extracelulares, o *Cryptosporidium* foi formalmente transferido de Coccidia para uma nova subclasse, Cryptogregaria, com parasitas gregarinos (RYAN *et al.*, 2016).

Segundo RYAN *et al.* (2016) as principais semelhanças entre os parasitas *Cryptosporidium* e gregarinos são a capacidade de completar seu ciclo de vida na ausência de um hospedeiro, a presença de estágios como extrascópicos syzygy (o processo no qual dois trofozoítos maduros se unem antes da formação de um gametocisto) e a capacidade de se adaptar ao meio ambiente, podendo modificar a sua estrutura celular.

As perspectivas filogenéticas de *Cryptosporidium* a partir das ferramentas moleculares foram capazes de questionar as afinidades de *Cryptosporidium* como a coccidia. Sabe-se há algum tempo que o *Cryptosporidium* carece de características morfológicas fundamentais dos coccídias e é insensível as drogas anticoccidiárias. O gênero *Cryptosporidium* é atualmente o único membro da Cryptogregaria e é descrito como parasitas epiteliais de vertebrados, possuindo características semelhantes as gregarinas, mas sem um apicoplasto (CAVALIER-SMITH, 2014).

De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (<http://www.iczn.org/iczn/index.jsp>), uma vez que a espécie foi formalmente re-classificada em um periódico publicamente disponível e revisado por pares, então a re-classificação é válida (a menos que seja contestada na literatura). Como esta re-classificação não foi até o momento contestada, *Cryptosporidium* é agora oficialmente uma gregarina, sendo a característica que a define é sizígia (o processo em que dois trofozoítos maduros se unem antes da formação de um gametocisto (RYAN *et al.*, 2016).

Os avanços recentes na biologia do protozoário *Cryptosporidium*, como a replicação fora do hospedeiro, pode representar preocupações para as indústrias de gerenciamento de recursos hídricos para abastecimento público, particularmente na área de risco do sistema de distribuição. O parasita pode utilizar da energia disponível em biofilmes bacterianos e se multiplicar nos sistemas de distribuição de água. Todavia, a compreensão do impacto desse patógeno sob essas condições e sua avaliação de risco necessita de novas discussões (RYAN *et al.*, 2016; KOH *et al.*, 2013)

No ciclo biológico do *Cryptosporidium* spp. os oocistos são liberados nas fezes contendo quatro esporozoítos infecciosos. Os esporozoítos excitam no intestino delgado e começam a invadir enterócitos. Durante a invasão, o esporozoíto é englobado pela célula hospedeira formando o vacúolo parasitóforo. Na porção inferior do trofozoíto em formação

emerge um disco de actina derivado de célula hospedeira (mostrado em vermelho na figura 4). Após a replicação assexuada, desenvolve-se um meronte tipo 1 que contém 6-8 merozoítos. Os merozoítos do tipo 1 infectam as células epiteliais adjacentes ou se desenvolvem para outro trofozoíto ou em um meronte de tipo 2. Os merozoítos originários de um meronte de tipo 2 iniciam o ciclo de reprodução sexuada. Após a infecção de outra célula, eles se desenvolvem em macrogamontes. Os microgamontes então liberam microgametas que fertilizam um macrogamonte. O zigoto diploide resultante se diferencia em quatro esporozoítos haploides e, posteriormente, a parede do oocisto é formada em torno deles. São descritas duas formas de oocistos. Os oocistos de parede fina que levam à autoinfecção, enquanto que os oocistos de paredes grossas são liberados com as fezes para infectar novos hospedeiros (LENDNER; DAUGSCHIES, 2014).

Segundo Certad *et al.* (2017) estudos recentes sugerem que a variabilidade entre as cepas parasitas, discorre do estado nutricional do hospedeiro, a composição da microbiota intestinal, a co-infecção com outros enteropatógenos, as respostas imunes e a modulação imunológica são fatores relevantes que influenciam as manifestações da criptosporidíase e da giardíase.

As manifestações clínicas após a infecção ocorrem após um período de incubação que pode variar de 2 a 14 dias, e incluem diarreia aquosa, muitas vezes profusa, bem como cólicas abdominais, náuseas, vômitos, perda de peso e febre baixa. Em indivíduos imunocompetentes, a doença geralmente é auto-limitada e dura de 1-3 semanas, o que normalmente é prolongada em hospedeiros imunocomprometidos, além disso, ocorre a má absorção dos nutrientes. Os indivíduos imunocomprometidos com infecção do ducto biliar também podem apresentar icterícia ou sintomas de pancreatite, decorrente da obstrução do trato biliar. Em crianças

menores de cinco anos, individualmente se estiverem mal nutridas, a diarreia pode ser grave e associada à mortalidade significativa (CERTAD *et al.*, 2017).

Um passo inicial crítico no estabelecimento da infecção por *Cryptosporidium* é a adesão do parasita às células hospedeiras. A maioria das proteínas envolvidas na aderência do parasita às células hospedeiras e à formação de vacúolos parasitóforos que estão presentes na superfície ou são exocitadas, a partir de vesículas secretoras especializadas do complexo apical (CERTAD *et al.*, 2017).

Figura 4 - Ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum*

Ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum*

Fonte: Adaptado Certad *et al.*, 2017

A figura 5 esquematiza a patogenicidade de ambos os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* nas interações com as células epiteliais intestinais do hospedeiro. (A) O epitélio intestinal é formado por uma única camada de células epiteliais (as células epiteliais normais são representadas em amarelo) que funciona como uma barreira física entre o lúmen e o tecido subepitelial. Dentro da barreira, as células epiteliais são mantidas unidas por estruturas complexas conhecidas como junções intercelulares. Essa barreira controla a absorção de nutrientes e evita a passagem de microorganismos, antígenos luminal e toxinas para o tecido mucoso. (B) Após a invasão, *Cryptosporidium* está localizado em um nicho extracitoplasmático dentro de um vacúolo parasitóforo (1). A interação entre *Cryptosporidium* e a superfície apical da célula epitelial resulta na ativação localizada das cascatas de sinalização, desencadeando a ruptura da barreira (2) e polimerização de filamentos de actina (3) na região da interação hospedeiro-parasita. O *Cryptosporidium* inibe a apoptose celular (as células apoptóticas são representadas em verde com núcleos fragmentados) no estágio trofozoíto, mas promove esse processo nos estádios de esporozoíto e merozoíto (4). Várias moléculas, como as fosfolipases, proteases e hemolisinas, podem causar danos celulares, aumentando a secreção de líquidos das criptas e suportando diarreia devido à secreção ativa e à má absorção. Como consequência, a morte celular (células mortas são representadas em vermelho) pode ocorrer (5) (CERTAD *et al.*, 2017).

O diagnóstico de criptosporidíase geralmente é feito por detecção de oocistos, antígenos de oocistos e DNA em amostras de fezes. Biópsias realizadas a partir de tecido também é uma alternativa para diagnósticos. O método amplamente utilizado para detecção dos protozoários em fezes é a microscopia. No entanto, a microscopia requer um operador qualificado. A sensibilidade da microscopia é melhorada com o uso de fluorescentes ou imunofluorescentes. Testes de imunofluorescência e imunocromatografia tem alta especificidade, mas moderada sensibilidade. Análises de PCR (Reação em Cadeia da

Polimerase) são mais específicos e sensíveis e estão disponíveis em laboratórios de referência para diagnóstico de infecção por *Cryptosporidium* (SHIRLEY; MOONAH; KOTLOFF, 2012).

Figura 5 – Esquema da patogenicidade de *Cryptosporidium* e *Giardia*

Fonte: Adaptado Certad *et al.*, 2017

O *Cryptosporidium* é um dos parasitas mais resistentes. Poucos medicamentos (nitazoxanida, paromomicina, halofuginona) foram considerados eficazes, e estes têm apenas efeitos parciais (LENDNER; DAUGSCHIES, 2014). Não há vacinas disponíveis para *Cryptosporidium* (MEAD, 2014) e as opções atuais de tratamento para a criptosporidíase são limitadas. A nitazoxanida (NTZ) apresenta eficácia clínica moderada em crianças e pessoas imunocompetentes, porém nenhum efeito em pessoas com HIV (AMADI *et al.*, 2009; SHIRLEY; MOONAH; KOTLOFF, 2012).

3.2.2 *Giardia*

Giardia duodenalis (sinônimos, *G. lamblia* e *G. intestinalis*) é um protozoário flagelado (Figura 6) e o agente etiológico da giardíase, uma doença gastrointestinal muito comum de humanos e animais. A transmissão ocorre diretamente, pelo contato entre os hospedeiros, e indiretamente, através da ingestão de água e alimentos contaminados (DAVID *et al.*, 2016).

Figura 6 - Trofozoíto de *Giardia duodenalis*, com característica das organelas, núcleos, corpos medianos e quatro pares de flagelos e disco ventral.

Fonte: Adaptado Monis *et al.* (2008)

Giardia tem um ciclo de vida simples (Figura 7) consiste em dois estágios diferentes de desenvolvimento estrutural e bioquímico: o trofozoíto (forma vegetativa), que coloniza o intestino do hospedeiro e o cisto (forma infecciosa). A infecção começa com a ingestão de alimentos ou água que está contaminada com cistos. O ambiente ácido do estômago induz um processo de excisão em que um cisto gera dois trofozoítos por divisão binária que podem então colonizar o intestino delgado sem invadir o epitélio. Os trofozoítos são resistentes à remoção do no lúmen intestinal porque podem se prender ao epitélio intestinal. Quando os trofozoítos migram para o trato gastrointestinal inferior, eles encontram mudanças no ambiente, incluindo pH e ácidos biliares e colesterol. Os cistos são então liberados do hospedeiro através das fezes e o ciclo de transmissão é completado após a infecção por cisto de um novo hospedeiro (LOPEZ-ROMERO *et al.*, 2015).

Os seres humanos são infectados por dois dos oito genótipos atualmente reconhecidos de *G. duodenalis*, os *assemblages* A e B. Dos muitos fatores que influenciam a epidemiologia da giardíase, três são relevantes para a sua disseminação; primeiro, o grande número de cistos que são lançados no ambiente com as fezes de hospedeiros infectados. Em segundo, a dose infecciosa baixa, teoricamente, um único cisto pode causar infecção, e os cistos são imediatamente infecciosos após a excreção. Em terceiro, os cistos são notavelmente resistentes ao estresse ambiental e podem persistir por meses, mantendo sua infectividade. Consequentemente existe um potencial de contaminação ambiental com cistos de *Giardia* (BOARATO-DAVID, E., GUIMARÃES, S.; CACCIÒ, S., 2016).

Os trofozoítos de *Giardia* aderem às células epiteliais através de uma estrutura ventral especializada, o disco adesivo (6). O anexo às células epiteliais pode direcionar redes de sinalização específicas, incluindo as de *caspases* (7), que podem ativar a apoptose (4). Isso leva à perda de junções intercelulares (2), rearranjo do citoesqueleto e disfunção barreira, que

pode contribuir para mecanismos fisiopatológicos, como secreção de eletrólitos, má absorção e diarreia subjacente (5). As interações complexas entre *Cryptosporidium* e *Giardia* com a microbiota (8) no ambiente luminal e mucoso provavelmente influenciam a infecciosidade e os resultados da doença (Figura 5) (CERTAD *et al.*, 2017)

Figura 7 - Ciclo de vida *Giardia duodenalis*

Fonte: Adaptado de Lopez-Romero *et al* (2015)

As taxas de infecção relatadas em países em desenvolvimento variam no intervalo 8-30% e países industrializados de 1-8% (CACCIÒ, 2015). As taxas são provavelmente mais elevadas em indivíduos com diarreia, mas a compreensão atual é limitada pela falta de

sistemas de relatórios de dados, programas de monitoramento em muitos países e a alta taxa de transporte assintomático de *Giardia* em humanos (SPRONG, H.; CACCIÒ, S. M.; van der GIESSEN, 2009). Isso sugere que a giardíase é fortemente subdiagnosticada, subestimada e subnotificada.

Os organismos do gênero *Giardia* são classificados, com base na morfologia do cisto e do trofozoíto. Pertencem ao filo Metamonada, subfilo Tricozoa, superclasse Eopharyngia, classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa e ordem Giardiida. A taxonomia das espécies de *Giardia* tem sido controversa, resultando em uma nomenclatura confusa com diferentes nomes usados para a mesma espécie. Até a data, seis espécies são reconhecidas no gênero, uma em anfíbios (*G. agilis*), duas em aves (*G. ardeae* e *G. psittaci*), duas em roedores (*G. muris* e *G. microti*) e uma em mamíferos (*G. duodenalis*) (THOMPSON; MONIS, 2012).

Com base na ocorrência em hospedeiros, o protozoário *Giardia* foi descrito em mais de 40 espécies. No entanto, em 1952, Filice (ADAM, 2001) propôs uma nova divisão, baseada em características morfológicas identificáveis, como a forma dos corpos medianos e o tamanho dos trofozoítos por microscopia óptica. Dessa forma, três espécies foram reconhecidas: *Giardia duodenalis*, *Giardia agilis* e *Giardia muris*. Segundo Monis; Cacciò; Thompson, (2009) Filice se esforçou para enfatizar que a taxonomia das espécies de *Giardia* era apenas temporária na ausência de critérios discriminatórios válidos, além da morfologia. Atualmente, ferramentas discriminatórias adequadas e a caracterização molecular de *Giardia* de diferentes espécies hospedeiras revelaram a existência de várias combinações genótípicas distintas.

Mais recentemente, os avanços nas técnicas microscópicas permitiram a descrição estrutural dos trofozoítos e o reconhecimento de duas novas espécies de aves, *Giardia ardeae* (ERLANDSEN *et al.*, 1990) e *Giardia psittaci* (ERLANDSEN e BEMRICK, 1987). Outra

espécie, *Giardia microti* (FEELY, 1988), que infecta vários roedores, foi reconhecida como uma espécie separada devido à presença única de trofozoítos totalmente diferenciados nos cistos. Portanto, seis espécies são atualmente reconhecidas no gênero, das quais *Giardia duodenalis* tem o maior número de hospedeiro e pode infectar várias espécies de mamíferos, incluindo humanos (Tabela 1).

Recentemente Hillman *et al.* (2016) identificaram pela primeira vez em um marsupial na Austrália ocidental a espécie *Giardia peramelis*. Amostras fecais positivas para *G. peramelis* foram obtidas desses marsupiais e foram usadas em caracterização morfológica e molecular. A amplificação e sequenciamento de PCR foram realizados pelo gene 18S rRNA e locus ITS1-5.8s-ITS2. Os resultados do estudo sugerem que esse marsupial é o hospedeiro para *G. peramelis*.

Tabela 1 - As espécies de *Giardia* atualmente reconhecidas como válidas, sua distribuição de hospedeiro e diferenças do comprimento do trofozoíto

Espécie	Hospedeiro	Comprimento/largura do trofozoíto (mm)
<i>Giardia agilis</i>	Anfíbios	20-30/4-5
<i>Giardia ardeae</i>	Aves	~10/~6
<i>Giardia duodenalis</i>	Humanos, mamíferos domésticos e selvagens	12-15/6-8
<i>Giardia microti</i>	Roedores	12-15/6-8
<i>Giardia muris</i>	Roedores	9-12/5-7
<i>Giardia psittaci</i>	Aves	~14/~6
<i>Giardia peramelis</i>	Marsupial	~12,68/7,88

Adaptado: (Thompson e Monis, 2012; Hillman *et al.*, 2016).

A aplicação de procedimentos moleculares para identificação de espécies de *Giardia* revelaram a diversidade genética intra-específica existente para o parasita (THOMPSON, 2004). Thompson *et al.* (2000) ressaltam que o termo *assemblage* ou genótipos aborda da melhor forma as diferenças de cada grupo.

Com o desenvolvimento de procedimentos para a propagação de trofozoítos em condições axênicas, a comparação molecular de cepas de *Giardia* de diferentes hospedeiros tornou-se possível. A investigação do polimorfismo de proteínas (isoenzimas) foi usada pela primeira vez para revelar grandes quantidades de variabilidade genética entre cepas de *Giardia duodenalis*. A análise de *assemblages* dos dados de isoenzimas identificou grupos de cepas geneticamente relacionadas que, na maioria dos casos, foram derivadas de hospedeiros específicos (Monis *et al.*, 1999). Estes grupos são designados como *assemblages*, para ressaltar o fato de que eles compartilham semelhanças genéticas, mas não são idênticos entre si.

A validade dos *assemblages* foi corroborada por dados de sequência de DNA que, após a introdução de técnicas de amplificação de sequências de DNA, foram gerados a partir de isolados. Com base em estudos moleculares de parasitas isolados de muitos hospedeiros, foram descritas oito *assemblagens* (A-H), dos quais os *assemblages* A e B infectam seres humanos e outros animais, *Assemblages* C e D são restritos a carnívoros, *Assemblage* E gados, *Assemblage* F para gatos, *Assemblage* G para ratos e *Assemblage* H para mamíferos marinhos (FENG; XIAO, 2011) (Tabela 2).

Tabela 2 - Os *assemblages* atualmente reconhecidos de *Giardia duodenalis*, sua distribuição de hospedeiro e taxonomia proposta

<i>Assemblages</i>	Hospedeiro	Nome de espécie proposto
A	Seres humanos e outros animais	<i>Giardia duodenalis</i>
B	Seres humanos e outros animais	<i>Giardia enterica</i>
C	Cachorro e outros carnívoros	<i>Giardia canis</i>
D	Cachorro e outros carnívoros	<i>Giardia canis</i>
E	Gados	<i>Giardia bovis</i>
F	Gatos	<i>Giardia cati</i>
G	Ratos	<i>Giardia simondi</i>
H	Mamíferos marinhos	NR

NR – Não Relatado

Adaptado: (Thompson e Monis, 2012)

As manifestações clínicas da giardíase variam de assintomáticas a diarreia aguda ou crônica com dor abdominal, flatulência, perda de peso, lesões intestinais e a síndrome da má absorção de nutrientes, que pode durar vários meses (LOPEZ-ROMERO *et al.*, 2015). Em comparação com a criptosporidíase, a giardíase é frequentemente associada à diarreia e doença crônica mais prolongada, mesmo em indivíduos imunocompetentes, que, particularmente em crianças, podem levar a sequelas de longo prazo, incluindo déficits intelectuais e incapacidade cognitiva. Além disso, as opções de tratamento são atualmente mais amplas que as da criptosporidíase, mas a resistência a medicamentos antimicrobianos existentes está se tornando um problema clínico que ainda não foi descrito para a criptosporidíase (MIYAMOTO; ECKMANN, 2015).

Atualmente existem várias opções de tratamento para a giardíase. Os mais utilizados no mundo são os membros da família de 5-nitroimidazole (5-NI), como metronidazol e tinidazol. Porém, ainda permanecem importantes desafios terapêuticos no âmbito do tratamento definitivo. Um dos principais objetivos atualmente são melhorias na dosagem, idealmente sob a forma de uma única dose oral altamente eficaz, o que torna-se uma necessidade para todas as doenças de infecção tropical (MIYAMOTO; ECKMANN, 2015; EINARSSON; MA'AYEH; SVÄRD, 2016).

3.3 OCORRÊNCIA DOS PROTOZOÁRIOS *Cryptosporidium* E *Giardia*

Segundo a revisão de surtos epidêmicos relacionados à veiculação hídrica realizado por Karanis *et al.* (2007), durante o período de 1984 a 2004 foram relatados 325 surtos de protozooses em todo mundo. Os agentes etiológicos mais prevalentes foram *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum*, responsáveis por 132 surtos (40,6%) e 165 surtos (50,8%), respectivamente. Entre 2004 e 2010, mais 199 surtos foram relatados, dos quais 70

(35,1%) foram ocasionados por *Giardia duodenalis* e 120 (60,3%) por *Cryptosporidium* spp (BALDURSSON; KARANIS, 2011).

Dez anos depois, Efstratiou *et al.*, (2017) realizaram uma revisão de surtos epidêmicos relacionados à veiculação hídrica, no período de cinco anos, entre janeiro de 2011 e dezembro 2016. Foram relatados 381 surtos de doenças parasitárias em todo o mundo. O agente etiológico mais comum foi *Cryptosporidium* spp., relatado em 63% (239) dos surtos, enquanto *Giardia* spp. foi relatado em 37% (142) dos surtos. Estima-se que a prevalência humana de criptosporidíase seja entre 3—5% e de giardíase seja aproximadamente 10% da população mundial. Na China, Xiao *et al.* (2012) avaliaram 66 pontos de captação de água para abastecimento público de 33 municípios. As concentrações encontradas variaram de abaixo do limite de detecção (<LD) a 6/10L oocistos de *Cryptosporidium* sp.

Na Alemanha, o rio Rhine é um dos rios mais longos da Europa, e seus afluentes captam diversos tipos de materiais por erosão. No Lower Rhine foi realizado um estudo com amostras de diferentes tipos de água coletadas durante 2009 e 2011. Das 206 amostras de águas residuais 134 (65%) foram positivas para cistos de *Giardia* e 64 amostras (31,1%) para oocistos de *Cryptosporidium* (GALLAS-LINDEMANN *et al.*, 2012b). Para análise de água superficial foram coletadas 190 amostras, sendo elas 18 (9,5%) positivas para oocistos de *Cryptosporidium* e nove (4,2%) para cistos de *Giardia*. As análises utilizadas para detecção dos parasitas foram concentração em sacarose e identificação por microscopia, teste de imunofluorescência.

PLUTZER *et al.*, (2007) investigaram os sistemas públicos de água potável para obter informações sobre a distribuição de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* na Hungria. Um total de 76 amostras de água potável e brutas foram examinadas utilizando o método 1623/USEPA. Destas 15 (48,4%) de 34 amostras de água bruta testadas foram

positivas para *Giardia* e 7 (26,6%) para *Cryptosporidium*. Doze (26,7%) de 45 amostras de água potável foram positivas para *Giardia* e seis (13,3%) para *Cryptosporidium*.

Nos Estados Unidos, seis bacias hidrográficas foram analisadas para detecção de *Cryptosporidium*, através do método 1623/USEPA e da técnica de PCR para cultura de célula integrada (CC-PCR). A eficiência de recuperação média foi de 58,5% para a técnica CC-PCR e 72% para o método 1623, mas os valores não foram significativamente diferentes. Os oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em 60 (10,1%) de 593 amostras pelo método 1623/USEPA. Houve 87% de concordância entre o número total de amostras positivas, conforme determinado pelo método 1623 e CC-PCR para quatro bacias. Oocistos infecciosos foram detectados em todas as bacias hidrográficas. Aproximadamente 37% dos oocistos de *Cryptosporidium* detectados pelo método 1623 de imunofluorescência eram viáveis e infecciosos. A análise da sequência de DNA dos isolados de *Cryptosporidium parvum* detectados por CC-PCR mostrou a presença de ambos os genótipos bovino e humano (LECHEVALLIER *et al.*, 2003).

Hofstra *et al.* (2013) construíram cenários em nível global para estimar as cargas de oocistos de *Cryptosporidium* lançadas anualmente em corpos hídricos. Os autores verificaram áreas onde a carga de oocistos lançados por ano em corpos hídricos por fontes não pontuais varia entre 10^{11} a 10^{14} . Além disso, foram construídos cenários para calcular o efeito das emissões diretas de oocistos por fezes humanas, com uma faixa de 20 – 100% (com intervalos de 20%) de pessoas não conectadas a redes coletoras de esgotos. Quando foram considerados 20% e 40% de emissões por fontes humanas, são lançados cerca de 10^{11} a 10^{14} oocistos/ano nos corpos hídricos, semelhante às fontes não pontuais.

No Brasil, há escassez de dados e relatórios sobre a ocorrência de surtos causados por estes protozoários em águas (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012; FREGONESI *et al.*, 2012).

No país as doenças transmitidas por água e alimentos são classificadas como DTAs (Doenças Transmitidas por Alimentos). Os dados mais recentes foram disponíveis por Alves (2013), onde nos anos de 2000 e 2013 foram registrados 8.746 surtos de DTAs, sendo *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. responsáveis por 13 e 22 surtos, respectivamente. No estado de São Paulo, o Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretária da Saúde registrou, entre os anos 2000 e 2010, 12 surtos cujo agente etiológico identificado foi *Giardia* sp. e outros 11 causados por *Cryptosporidium* sp. (CVE, 2013).

Pesquisas realizadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais evidenciam a circulação destes protozoários em águas superficiais que servem ao abastecimento público destas regiões. Hachich *et al.* (2004) analisaram 278 amostras de águas superficiais coletadas em 10 bacias hidrográficas no estado de São Paulo durante 19 meses. Os autores detectaram cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em 27% e 2,5% das amostras, respectivamente, com concentrações que variaram de não detectável a 521 cistos/L e de não detectável a 20 oocistos/L. Heller *et al.* (2004) monitoraram dois mananciais que servem ao abastecimento público da cidade de Viçosa (Minas Gerais) entre setembro de 2000 e dezembro de 2001. Os autores observaram concentrações médias de 4-7 cistos/L e 6-20 oocistos/L e concentrações máximas de 510 oocistos/L e 140 cistos/L.

Em outra pesquisa realizada com amostras de água bruta do estado de São Paulo, foram observadas concentrações que variaram de não detectável a 0,3 cistos/L e de não detectável a 0,2 oocistos/L (RAZZOLINI, *et al.*, 2010). No mesmo estado, Sato *et al* (2013) avaliaram a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de água, durante 24 meses. Das 206 amostras coletadas, *Giardia* foi detectada em 49,5% com concentrações que variaram de 0,1 cistos/L a 97 cistos/L. *Cryptosporidium* foi detectado em 9,2% das amostras, com concentrações que variaram entre 0,1 oocistos/L a 6 oocistos/L. Vale ressaltar que baixas

quantidades de cistos e oocistos ingeridos podem causar infecção no hospedeiro (FAYER *et al.*, 2000; ADAM, 2001).

Branco *et al.*(2012) realizaram um estudo para determinar a ocorrência de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de águas das principais nascentes de uma cidade turística localizada na região sudoeste de São Paulo. A técnica empregada para detecção dos protozoários foi o ensaio de imunofluorescência direta. Pelo menos um protozoário patogênico foi detectado em 25% das nascentes (3/12) com concentrações médias que variaram de 0,2 a 0,3 oocistos/L e 0,07 a 0,1 cistos/L.

No estado do Paraná Nishi *et al.* (2009) verificaram a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em um sistema público de tratamento de água. Foram analisadas 30 amostras, 15 de água bruta e 15 de água tratada. As amostras foram examinadas por meio da técnica de filtração por membrana e imunofluorescência direta. Das amostras de água bruta, 26,6% foram positivas para *Cryptosporidium* (concentração média de 0,15 oocistos/L) e 6,66% foram positivos para *Giardia* (concentração média de 0,2 cistos/L). Todas as amostras de água tratada foram negativas.

Franco *et al.* (2001) coletaram amostras de água bruta do rio Atibaia (Campinas, São Paulo) durante três semanas. As amostras foram processadas por meio da filtração em membrana e identificadas por ensaio de imunofluorescência. Todas as amostras de água bruta foram positivas para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Em outro estudo no rio Atibaia, Neto *et al.*, (2010) detectaram cistos de *Giardia* spp. em 87,5% das amostras de água com concentrações que variaram de 2,5 a 120 cistos/L e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em 62,5% das amostras com concentrações de 15 a 60 oocistos/L.

No mesmo estado, ARAÚJO *et al.* (2011) detectaram oocistos de *Cryptosporidium* em 30 amostras de água de diferentes locais do estado. As amostras foram concentradas através

de filtros de membrana e identificadas por meio da técnica *nested* PCR. Os oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em 30% das amostras. Na cidade de Londrina (Paraná) foi investigada a ocorrência dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em 48 amostras de água, sendo 24 de água bruta e 24 de água tratada em uma estação de tratamento. As amostras foram processadas por meio das técnicas de filtração em membranas, imunofluorescência e identificação por *nested* PCR. Na imunofluorescência, 2/24 (8,33%) amostras de água bruta foram positivas para *Giardia* spp. Na *nested* PCR 2/24 (8,33%) amostras de água bruta foram positivas para *Giardia* spp., e 2/24 (8,33%) amostras foram positivas para *Cryptosporidium* spp. (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Segundo a revisão sistemática de Coelho *et al.* (2017) sobre estudos de identificação de *Giardia duodenalis* no Brasil a região sudeste apresenta os maiores responsáveis em publicações, sendo São Paulo responsável por 32%, Rio de Janeiro 15%, Minas Gerais 13% e Espírito Santo 2%. Em contraste, as regiões Norte, Nordeste e Médio Oeste em conjunto são responsáveis por apenas 13,3% de todos os estudos, o que representa outro motivo para a desigualdade entre as regiões.

3.4 FERRAMENTAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* E *Giardia*

A quantificação aliada a técnicas moleculares torna a análise mais específica e sensível. Para caracterizar oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* alguns estudos têm descrito e avaliado métodos de genotipagem a partir de lâminas de amostras clínicas e ambientais (AMAR *et al.*, 2001; SUNNOTEL *et al.*, 2006; Di GIOVANNI *et al.*, 2010; WARE *et al.*, 2013). Segundo Ware *et al.* (2013) uma limitação dos métodos USEPA 1623 e 1623.1 (USEPA, 2005 e 2012) são os poucos cistos e oocistos recuperados e fixados em lâminas. Sendo assim, é importante que os protocolos a serem desenvolvidos para a raspagem

destes protozoários a partir de lâminas sejam eficientes para transferir todos os cistos e oocistos para posteriores análises moleculares.

Em um estudo de Nichols *et al.* (2010) foram analisadas 1.042 lâminas obtidas do método USEPA para quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* para determinar espécies em amostras de água dos quais 55,7% das lâminas continham um ou dois oocistos. Ruecker *et al.* (2011) estudaram o desempenho do método *nested* PCR-RFLP para a caracterização molecular de oocistos de *Cryptosporidium* a partir de lâminas processadas de acordo com o método 1623 (USEPA, 2005). Dentre 20 lâminas avaliadas foi possível realizar a detecção a partir de um único oocisto em 60% das lâminas.

Almeida *et al.* (2010) a partir de lâminas positivas de *Cryptosporidium* e *Giardia* realizaram extração de DNA para posterior genotipagem de amostras de água da região norte de Portugal. A caracterização genética foi executada em 80 amostras. A raspagem das lâminas foi realizada com o auxílio de cotonete embebido em água destilada, onde após a raspagem a ponta do cotonete foi cortada e colocada em um tubo de 1,5 ml para extração de DNA com o kit *QIAamp* DNA Mini. No entanto, os autores relatam que não foi possível amplificar por PCR convencional o DNA extraído das lâminas contendo menos de 50 (oo) cistos.

Apesar de existirem estudos que descrevam a sensibilidade da genotipagem a partir de raspagem de lâminas com baixas concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* (Nichols *et al.*, 2010; Di Giovanni *et al.* 2010; Ruecker *et al.*, 2011), não existem dados para raspagem de lâminas para cistos de *Giardia* ou para ambos protozoários a partir de uma mesma lâmina (WARE *et al.*, 2013). No Brasil, até o momento e pela literatura consultada, estudos que utilizem técnicas de raspagem de lâminas para posterior caracterização molecular de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas superficiais não foram relatados.

Na última década, no entanto, várias técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para detectar e diferenciar *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. espécie/genótipo/subtipo/*assemblages*. Essas ferramentas são cada vez mais usadas em estudos epidemiológicos da criptosporidíase e giardíase em áreas endêmicas e epidêmicas, o que melhorou significativamente a nossa compreensão da transmissão da criptosporidíase nos humanos e nos animais (XIAO, 2010; THOMPSON; ASH, 2016)

Os principais marcadores moleculares utilizados para caracterizar, diagnosticar e identificar *Giardia* são: *Small Subunit Ribosomal DNA* (SSU-rDNA); regiões de transcrição interna (ITS-2); β -giardina; *triosephosphate isomerase* (*tpi*), fator de alongamento 1 alpha (*ef1- α*) e o gene *glutamate dehydrogenase* (*gdh*) (ADAM, 2001; THOMPSON; ASH, 2016).

O gene SSU ou 18 rRNA é a sequência mais conservada e possui muitos números de cópias no gene. β -giardina apresenta cópia única, sendo específica para *Giardia duodenalis* e codifica uma proteína estrutural do disco ventral dos trofozoítos. O gene *gdh* apresenta um alto grau de polimorfismo em *G. duodenalis*, que permite a diferenciação no nível genótipo e intragenotipo (PLUTZER et al., 2008). O gene da enzima *tpi* possui pouco números de cópias no gene e alto grau relativo de variabilidade de sequência, podendo diferenciar e identificar em níveis de espécie, *assemblages* e sub-*assemblages*. O gene *ef1- α* também possui baixo número de cópias no gene do parasita, não é um gene específico para *Giardia* e possui moderado grau relativo de variabilidade da sequência. É possível identificar espécies, *assemblages* e sub-*assemblages*. A região ITS-2 tem alto número de cópias no gene, apesar de não ser específico para *Giardia* é possível identificar em níveis de *assemblages* e sub-*assemblages*. Os genes que são únicos para *Giardia* são: β -giardina, *Giardia lamblia open reading frame* - C4 (fragmento de leitura aberta), onde faz a leitura do código genético

desconsiderando os íntrons e o gene *variable surface protein* (*vsp*) proteína de superfície variável. (KOEHLER et al., 2014).

Para *Cryptosporidium* o gene mais comumente usado para caracterização das espécies é o *SSU* (18 rRNA) devido as múltiplas cópias do gene e a presença de regiões semi-conservadas e hiper-variáveis, o que permite o desenvolvimento de *primers* (XIAO, 2010). Genes adicionais que geralmente incluem a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), a proteína de parede de oocistos de *Cryptosporidium* (COWP) e a região transcrita interna 1 (ITS-1) (THOMPSON; ASH, 2016). Uma das ferramentas de subtipagem conhecidos é a análise de seqüência de DNA da glicoproteína de 60 kDa (gp60, também chamada gp40 /15) (XIAO, 2010).

O primeiro estudo de genotipagem de espécies de *Cryptosporidium* em águas superficiais para abastecimento público na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) foi realizado em 2011, onde incluiu o reservatório de Guarapiranga (UGRHI-06). Apesar das dificuldades de detecção dos parasitas em amostras ambientais foi possível a detecção das espécies de *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium meleagridis*, espécies que podem causar infecções no homem (ARAÚJO et al., 2011).

Recentemente Peralta et al. (2016) identificaram e caracterizaram genótipos e subtipos de *Cryptosporidium*, a fim de determinar a diversidade genética em amostras obtidas em hospitais do Rio de Janeiro, Brasil e Buenos Aires, Argentina. As amostras foram analisadas por microscopia, PCR em tempo real, 18S rDNA/RFLP e sequencia de gp60. Entre as 89 amostras do Rio de Janeiro, *Cryptosporidium* spp foi detectado em 26 por microscopia e PCR em tempo real. Nas amostras de Buenos Aires, *Cryptosporidium* foi diagnosticado em 15 pacientes dos 132 estudados. O PCR em tempo real e 18S rDNA/RFLP detectaram *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* e co-infecções de ambas as espécies. Nas

amostras brasileiras, foram observados os sub-tipos IbA10G2 e IIcA5G3. Os autores ressaltam que diferenciar as espécies e subtipos requer o uso de ferramentas moleculares de alta resolução para mais informações são necessárias maior número de amostras para fornecer subsídios sobre linhagens dos subtipos, elucidar a variação geográfica, patogenia em espécies e genótipos de *Cryptosporidium*.

Das ferramentas moleculares disponíveis atualmente o PCR em tempo real é uma das técnicas que tem demonstrado poder de discriminação e aplicação rápida para o diagnóstico específico de espécies e genótipos de interesse clínico e ambiental de *Giardia* e *Cryptosporidium*. Essa ferramenta associada a marcadores genéticos específicos desenhados na forma de *primers* e sondas genéticas, pode amplificar qualitativamente e quantificar os organismos de diferentes matrizes. A sensibilidade da técnica do qPCR pode ser até 10^6 mais sensível que o PCR convencional (ARAÚJO, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETAS

O estado de São Paulo compreende 645 municípios, sendo considerado o estado mais populoso do Brasil, com aproximadamente 44 milhões de habitantes, cerca de 22% da população brasileira (IBGE, 2015). O presente estudo abrange 11 municípios do estado, sendo eles: Aparecida, Araçoiaba da Serra, Biritiba Mirim, Caraguatatuba, Guaratinguetá, Itanhaém, Juquiá, Piedade, Serra Negra, Socorro e Taubaté (Figura 8). Estes municípios estão localizados dentro de sete Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHIs).

Figura 8 – Mapa do Estado de São Paulo indicando os 11 municípios onde foram coletadas amostras de águas superficiais

Fonte: Elaboração ArcGIS (VEIGA, DENISE)

A espacial distribuição das áreas pertencentes aos municípios foi realizada através do *software ArcGIS 10.1*, que contrata informações das áreas das bacias hidrográficas com os parâmetros das substâncias que se pretende pesquisar. Os modelos hidrológicos conseguem prever o impacto que o uso e a ocupação do solo podem provocar na qualidade e quantidade de águas superficiais (VEIGA, D. P.B, 2017). As imagens de cada município mostra as áreas de drenagem determinantes dos pontos de captação de água.

4.1.1 Aparecida

Figura 9: Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul

Fonte: Elaboração *ArcGIS* (VEIGA, DENISE)

O município de Aparecida (UGRHI – 02) localiza-se no vale do Paraíba Paulista, nordeste da capital do estado. O município ocupa uma área demográfica de 121.076 Km²,

sendo que 7,06 Km² estão em perímetro de contribuição da bacia hidrográfica. No último censo demográfico realizado pelo IBGE, no ano de 2015, compreendia 36.217 pessoas.

A captação de água para as análises ocorreu no Rio Paraíba do Sul. A caracterização da bacia hidrográfica pertencente à área de estudo demonstrou o uso dominante para pasto de 39,0%. Os valores de área urbana na ocupação da bacia foram de 16,20%. O cultivo de culturas madeireiras (silvicultura) também foi identificado na região 10,76%.

O total de 23,0% corresponde à área de mata preservada na bacia do rio Paraíba do Sul. Os valores para ocupação por corpos de água e solo exposto são 5,90% e 5,05%, respectivamente. Segundo os dados do relatório “Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo – parte I – Águas doces” (CETESB, 2015) a coleta de esgoto no município de Aparecida corresponde a 79%, no entanto, todo resíduo coletado não passa por tratamentos sanitários. A distribuição de água para a população urbana é total.

No local de coleta foram constatados ocupação humana irregular e lançamentos de esgotos domésticos próximos do ponto de captação. A estação de tratamento apresentava-se em condições precárias, sem manutenção, produtos químicos vencidos, depósitos de lixo e lavagem de caminhões de lixo na área da ETA.

4.1.2 Araçoiaba da Serra e Piedade

Os mananciais onde foram realizadas as coletas para os municípios de Araçoiaba da Serra (UGRHI – 10) e Piedade (UGRHI – 10) pertencem à mesma bacia hidrográfica caracterizada na figura 10. A área de contribuição da bacia é estimada em 474 Km². O uso e ocupação da bacia hidrográfica que abastece os dois municípios compreende em 37,13% de mata, 18,14% de pastagem, 15,8% de silvicultura, 14,4 de solo exposto, 10,13% agricultura e 4,5% de área urbana.

No município de Araçoiaba da Serra, o manancial onde foram realizadas as coletas é pouco preservado. Apresentou-se com alta turbidez, e presença em suas margens de lavoura de feijão, milho e criação de gado. Além da área utilizada para a agropecuária, a área urbana também exerce pressão antrópica (área urbana: 4,5%) nos mananciais. Nas proximidades são encontrados cemitério e estação elevatória de esgoto com deficiência de funcionamento e vazamentos de esgoto bruto no rio Pirapora, onde ocorre a captação de água para abastecimento público do município.

Figura 10 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Pirapora

Fonte: Elaboração *ArcGIS* (VEIGA, DENISE)

A população do município de Araçoiaba da Serra segundo o último censo do IBGE (2010) corresponde a 27.299 habitantes, distribuídas em uma unidade territorial de 255.327 Km² aproximadamente. Dados do relatório da CETESB (2015) relatam que a coleta de esgoto

do município é de 37,5%, porém, todo esgoto coletado é tratado, sendo o rio Vacariu o corpo receptor.

O rio Pirapora é o mesmo rio que serve para captação de água para o município de Piedade, no entanto, nas proximidades do manancial onde foram realizadas as coletas há presença de esgoto correndo em valas à montante. Cultivo de cebola, batata, milho, couve alface, culturas irrigadas e não irrigadas. Captação de água do rio para lavagem de legumes. Presença de lixo e fezes humanas nas margens do rio utilizado como sanitário pelos trabalhadores dos lavadores de legumes.

O município de Piedade corresponde a uma área territorial de 746,86 Km² e uma população de 52.123 habitantes (IBGE, 2010). A população urbana corresponde aproximadamente a 24.922 pessoas. A coleta de esgoto em Piedade é de 56%, onde 96% do esgoto coletado é tratado. O corpo hídrico que receptor é o próprio rio Pirapora (CETESB, 2015).

4.1.3 Biritiba Mirim

O município de Biritiba Mirim faz parte da UGRHI – 06 – Alto do Tietê, compreende uma área territorial de 317.406 Km². A população da cidade corresponde a 28.575 habitantes (IBGE, 2010), sendo 26.468 residentes da área urbana (CETESB, 2015). A cobertura do saneamento na cidade é abrangente, onde 97% do esgoto é coletado e 99% deste é tratado. A captação de água para o município é realizada no rio Tietê, mesmo rio que serve de corpo receptor.

No local de coleta foi observado ocupação urbana em área superior a captação, com uso de fossa de cultura de eucalipto não irrigado, couve, alface, repolho e caqui irrigado, presença de bombas de captação de particulares, porto de areia. Segundo relato de agricultor

local, a água entra pelos canis de irrigação por gravidade, e nos períodos de cheias o rio invade as lavouras e é bombeado de volta levando resíduos para o leito do rio.

Figura 11 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Tietê

Fonte: Elaboração *ArcGIS* (VEIGA, DENISE)

O uso e ocupação do solo pertencente à bacia hidrográfica do município de Biritiba Mirim representa 38,88% de mata preservada, 25,67% de silvicultura, 11,38% de agricultura, 10,96% de solo exposto, sem cobertura vegetal. Os recursos hídricos correspondem em 9,10%, a área urbanizada em 2,1% e a pastagem 1,9% da bacia.

4.1.4 Caraguatatuba

O município de Caraguatatuba (UGRHI – 03 – Litoral Norte) pertence ao litoral norte do estado de São Paulo, à Mesorregião do Vale do Paraíba Paulista e Microrregião de Caraguatatuba. O município ocupa uma área territorial de 484.947 Km², aproximadamente. O perímetro de ocupação da bacia hidrográfica é de 85.15 Km² (Figura 12). Dados do relatório da CETESB (2015) descrevem o município com 109.442 habitantes na área urbana.

Figura 12 - Caracterização da bacia hidrográfica do Baixo Rio Claro

Fonte: Elaboração *ArcGIS* (VEIGA, DENISE)

A caracterização da bacia enfatiza a preservação da área. A coleta de esgoto do município é de 71%, e 100% do esgoto coletado é tratado. A captação da água é realizada no Baixo Rio Claro, sendo os corpos receptores rios diversos e o mar. O manancial é preservado

dentro do Parque Estadual da Serra do Mar, no entanto, apresenta assoreamento no ponto de captação.

A montante do ponto de captação a presença de gado bovino, bubalino, ocupação humana irregular com lançamento de esgoto no rio, praias usadas por banhistas e um criadouro de peixes ornamentais, lavoura de pimentões, cacau e mandioca. O uso e ocupação do solo corresponde em 96,68% de mata, 1,68% de pastagem e 1,63% de área urbana.

4.1.5 Guaratinguetá

Guaratinguetá (UGRHI – 02 – Paraíba do Sul) é um município localizado na região do Vale do Paraíba. A população é estimada em 113.433 (CETESB, 2015), distribuída em uma área territorial de 148.91 Km². A área da bacia corresponde um total de 165,09 Km² (Figura X). O ponto onde foram realizadas as coletas foi no manancial Ribeirão Guaratinguetá.

O manancial não se encontrava em preservação adequada, com presença de gado bovino e bubalino, lavouras de arroz e milho em suas margens. A caracterização da bacia é dividida por mata (42%), criação de gado (41,55%), solo exposto (8,75%), agricultura (4,9%), área urbana (2,52%) e corpos hídricos (0,28%). A montante do ponto de captação foi observado depósito clandestino de lixo. A ETA presente no local apresentava-se em boas condições de funcionamento, atendendo as determinações da Portaria 2.914 (2018).

Ribeirão Guaratinguetá abastece o município de Guaratinguetá, no entanto, diversos corpos hídricos servem de corpo receptor (Rio Paraíba, Ribeirão Guaratinguetá, São Gonçalo e Motas, Córrego dos escritores). A coleta de esgoto, segundo relatório da Cetesb (2015) é realizada em sua totalidade, porém somente 18% de todo o esgoto coletado é tratado.

Figura 13 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Ribeirão Guaratinguetá

Fonte: Elaboração *ArcGIS* (VEIGA, DENISE)

4.1.6 Itanhaém

Localizada na Mesorregião do Litoral Sul do estado de São Paulo, região da Baixada Santista, o município de Itanhaém (UGRHI – 07 – Baixada Santista) tem sua população estimada em 95.321 habitantes (CETESB, 2015), e densidade demográfica 114,69 hab/km². A área de ocupação da bacia hidrográfica (Figura 13) pertencente ao município é de 523.32 Km².

O ponto de captação para realização das coletas do município de Itanhaém foi no Rio Branco. A área da bacia é ocupada por 73,30% de mata preservada, 9,07% de área urbana, 8,93% de água e 8,7% de pasto. O rio apresentou-se em condições de preservação nas coletas

realizadas. Apesar de aspectos de preservação do manancial os índices de coleta de esgoto do município é baixo (30%). A totalidade do esgoto coletado é tratado (100%). (CETESB, 2015). Os rios que servem de corpos receptores são o Rio do Poço e o Rio de Curitiba em Itanhaém.

Figura 14 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Branco

Fonte: Elaboração *ArcGIS* (VEIGA, DENISE)

4.1.7 Juquiá

Juquiá (UGRHI – 11 – Ribeira de Iguape/Litoral Sul) está localizado na mesorregião do Litoral Sul Paulista e microregião de Registro, Vale do Ribeirão ao sul do estado de São Paulo. A população estimada do município é de 12.201 habitantes, e densidade demográfica de 23.68 Km² (IBGE, 2010).

Figura 15. Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Juquiá

Fonte: Elaboração *ArcGIS* (VEIGA, DENISE)

A área de concentração de ocupação da bacia hidrográfica é 4747.83 km², sendo dividida em 83,55% de mata preservada, 10,78% em agricultura, 4,08% de solo exposto, 0,86% em área urbana e 0,72 de água (Figura 15). Em torno do ponto de captação no Rio Juquiá foi observada ocupação humana, cultura de banana e cana-de-açúcar na margem à montante. Há bananais plantados nas margens do rio e em topos de morro.

Segundo o relatório da Cetesb (2015) 72% do esgoto no município é coletado, sendo destes 95% tratados. Os corpos receptores são o Rio Juquiá (87%), Rio do Cedro (12%) e o Rio Açungu (1%). O mapa evidencia que o município que apresenta boa condição, suas áreas determinantes mais preservadas, mananciais com mata ciliar e menor presença de áreas urbanas.

4.1.8 Serra Negra

Figura 16 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Ribeirão da Serra

Fonte: Elaboração ArcGIS (VEIGA, DENISE)

O município de Serra Negra (UGRHI – 09 – Mogi Guaçu) possui uma unidade territorial de aproximadamente de 203,736 Km², onde a área de contribuição da bacia hidrográfica é estimada em 49,60 Km². A população urbana do município em 2015 foi de 24.564 habitantes e densidade demográfica de 129.52 hab/Km² (IBGE, 2010; CETESB,2015).

O ponto de captação para abastecimento do município é no Rio Ribeirão da Serra. O manancial encontra-se com assoreamento no ponto de captação. A região próxima ao ponto possui intensa atividade agrícola (lavoura de feijão, café, berinjela, tomate e hortaliças) e pecuária (criação de porcos e bois) a montante.

Estes dados são evidenciados na caracterização da bacia, onde 48,95% da área é destinada a agricultura, 28,83% mata preservada, 10,38% solo exposto, 7,52% pasto, 3,52%

área urbana e 0,80% presença de açudes. A coleta de esgoto do município é de 85% e o tratamento é realizado em sua totalidade (100%). O corpo hídrico receptor é o Rio Ribeirão da Serra Negra.

4.1.9 Socorro

O município de Socorro (UGRHI – 9 – Mogi Guaçu) fica as margens do rio do Peixe e na Serra da Mantiqueira. Sua população é estimada em 26.898 habitantes, distribuídos em uma área territorial de 449.029 Km² e densidade demográfica de 81,7 hab/Km² (IBGE, 2010). A área de concentração da bacia hidrográfica é de 602.74 Km² (Figura 17). O manancial onde é realizada a captação de água para abastecimento é o rio do Peixe.

Figura 17 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio do Peixe

Fonte: Elaboração *ArcGIS* (VEIGA, DENISE)

O manancial encontra-se pouco preservado e com alta turbidez no ponto de captação. As margens do rio a presença de lavoura de café e milho, além de criação de gado, granja e porcos, com abatedouro clandestino. Áreas urbanas foram vistas nas margens do rio, como pousadas, vilas, onde não havia coleta de esgoto.

Os dados sobre saneamento básico do relatório da Cetesb (2015) apontam que a coleta de esgoto é realizada em 90% do município de Socorro e 92% do esgoto é tratado. O corpo hídrico receptor é o próprio rio do Peixe que serve de abastecimento.

4.1.10 Taubaté

O município de Taubaté (UGRHI – 02 – Paraíba do Sul), localizado na região do Vale do Paraíba possui uma área territorial de 625.000 Km² e aproximadamente 295.810 habitantes, sendo a estimativa da densidade demográfica de 445,98 hab/ Km² (IBGE, 2010; CETESB, 2015). A área de contribuição da bacia hidrográfica é de 434,45 Km², e o manancial que abastece o município é o rio Una (Figura 18).

O rio Una encontra-se assoreado nas proximidades do ponto de captação. As margens do rio há grande extensão de cultivo de arroz. A pressão antrópica é evidenciada com a presença de sítios destinados ao turismo, além da presença de um assentamento com cerca de 40 famílias. Há animais de pastagem nas proximidades do manancial, como bovinos e equinos.

A ocupação e uso da bacia é caracterizada em 40% de pasto, 36,50% de mata preservada, 9,30% de silvicultura, 8,60% de solo exposto, 6,85% de agricultura, 1,60% de área urbana e 0,15 de corpos d'água. Dados do relatório da Cetesb (2015) apontam que 93% do esgoto é coletado no município e 100% é tratado. Os corpos hídricos receptores são os Córregos Judeu, Piracanguá e José Raimundo.

Figura 18 - Caracterização da bacia hidrográfica do Rio do Una

Fonte: Elaboração ArcGIS (VEIGA, DENISE)

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CISTOS DE *Giardia* E OOCISTOS DE *Cryptosporidium*

4.3.1 Amostragem

Foram realizadas coletas de amostras de águas superficiais de 11 mananciais localizados no estado de São Paulo. As coletas foram realizadas nos pontos de captação de cada manancial em uma frequência mensal, iniciadas em dezembro de 2014 e se estendendo até novembro de 2015, totalizando 128 amostras em 12 meses. As coletas foram realizadas segundo método analítico EPA/Método 1623.1/2012, da *Environmental Protection Agency* (USEPA, 2012).

As amostras de águas superficiais foram transferidas para frascos de polipropileno com capacidade de 10L, e transportadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental e Resistência Antimicrobiana (MicroRes) Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (HSA/FSP) sob-refrigeração ($>0^{\circ}\text{C}$ a 8°C) e analisadas dentro de um período máximo de 24 horas.

4.3.2 Análises realizadas para identificação de *Cryptosporidium* e *Giardia*

Todas as amostras foram processadas pelo Método 1623.1 (USEPA, 2012) (**Anexo 1**). Após a quantificação foi realizada a lavagem e raspagem das lâminas positivas obtidas, onde os protocolos de Nichols; Campbell; Smith, 2006 e USEPA (2010) foram adaptados. Seguida a raspagem das lâminas foi realizada a extração do DNA genômico com a utilização de *Kit* comercial e identificação das espécies humanas por da reação de amplificação PCR em tempo real (Figura 19).

Figura 19. Cronologia das análises realizadas para identificação de *Cryptosporidium* e *Giardia*

4.3.3 Concentração da amostra pela técnica 1623.1 (USEPA, 2012)

- Primeiramente, o fluxo da bomba a vácuo foi ajustado a 1L a 4L por minuto mediante passagem de água reagente, após esse ajuste foi realizado a filtração da amostra;
- O filtro de espuma do sistema Filta-Max® foi colocado no compartimento do filtro e foi fechado para a passagem da amostra;
- Após a passagem da amostra, deixou-se a pressão diminuir para escoamento total do fluxo. Nessa etapa, quando havia saturação do filtro de espuma, o mesmo era trocado quantas vezes necessárias;
- Após a filtração, o filtro de espuma do sistema Filta-Max® foi transferido à estação de lavagem (Idexx®) para a realização da etapa de eluição.

4.3.4 Eluição da amostra

- A etapa de eluição realizou-se com a adição de 600 mL do tampão PBST (solução salina tamponada com fosfato) ao tubo concentrador da estação de lavagem contendo o filtro de espuma;
- Para a primeira lavagem do filtro de espuma foram necessários 20 movimentos manuais da alavanca da estação de lavagem;
- O eluído obtido foi concentrado em membrana filtrante (seção abaixo)
- Em seguida foi realizada a segunda lavagem da amostra, a fim de otimizar o desprendimento dos cistos e oocistos do filtro de espuma, onde foram realizados 10 movimentos manuais da alavanca da estação de lavagem;
- Após a segunda lavagem, o eluído obtido também foi concentrado em membrana filtrante.

4.3.5 Concentração das lavagens

- Os eluídos obtidos a partir das duas lavagens foram concentrados em uma membrana filtrante com o auxílio de uma bomba a vácuo manual (a força do vácuo não excedeu 30 cm/Hg);
- Após a passagem dos eluídos pela membrana filtrante, a mesma foi transferida com o auxílio de uma pinça esterilizada para uma embalagem plástica (fornecida); onde foram adicionados 5 mL de PBST;
- A membrana foi friccionada manualmente através da embalagem plástica para que ocorresse o desprendimento dos cistos e oocistos presentes;
- Utilizando uma pipeta *Pasteur*, o eluato contido na embalagem plástica foi transferido para tubos cônicos do tipo *Falcon* de 50 mL e centrifugados por 15 minutos a 2500 rpm. Após a centrifugação, o volume do *pellet* foi anotado.

4.3.6 IMS (Separação Imunomagnética)

- Após a concentração, o volume final de 5 mL do concentrado foi transferido para o tubo de *Leighton* (tubo de lado plano) e foram adicionados 1 mL SL-A 10X e 1 mL do tampão SL-B 10X (a partir do tampão SL-A 10X fornecido foi preparada uma diluição de 1X do tampão);
- Em seguida foi adicionado ao tubo *Leighton* (contendo concentrado e tampões A e B) 100 µL de *Dynabeads* GC-Combo;
- O tubo foi fixado a um *mixer* rotatório, onde ocorreu a agitação por 1 hora a 18 rpm da amostra;

- Passado o tempo de agitação no *mixer*, o tubo foi removido e colocado a um concentrador de partículas magnéticas (MPC-1) com o lado plano do tubo junto ao magneto (ímã);
- Antes de remover tubo do MPC-1, o sobrenadante foi desprezado, e em seguida, o tubo é removido do MPC-1 para a ressuspensão da amostra com a adição de 1 mL do tampão SLA-1X (preparado anteriormente, a partir do tampão SL-A 10X, solução estoque fornecida), nessa etapa não houve agitação em agitador tipo Vortex;
- A amostra ressuspensa contida no tubo de *Leighton* foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL;
- O tubo de microcentrífuga contendo a amostra foi colocado e um segundo concentrador de partículas magnéticas (MPC-M), com sua faixa magnética e durante 1 minuto realizou-se um balanço manual de 180° por segundo. Ao final dessa etapa, as partículas foram visualizadas (mancha de coloração marrom) na parte posterior do tubo;
- O sobrenadante obtido no tubo MPC-M foi imediatamente aspirado e desprezado;
- Para a primeira dissociação dos cistos e oocistos das partículas, a faixa magnética foi removida do MPC-M e foram adicionados ao tubo de microcentrífuga 100 µL de água purificada e o mesmo foi submetido à agitação em agitador tipo *Vortex*;
- Após a agitação, o tubo foi transferido a um banho úmido e incubado a 80° C por 10 minutos;
- O tubo de microcentrífuga foi submetido à nova agitação em agitador tipo *Vortex* e foi colocado novamente no MPC-M, nesse momento com a faixa magnética, em seguida, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo de microcentrífuga previamente identificado;
- A etapa da dissociação foi repetida pela segunda vez;

- O conteúdo dos tubos de microcentrífuga obtidos a partir das duas dissociações foram transferidos para uma das três cavidades (poços) da lâmina de imunofluorescência.

4.3.7 Coloração das lâminas

- Os controles positivos (cistos de *Giardia* sp./oocistos de *Cryptosporidium* sp.) e controle negativo (água destilada) foram adicionados cada um em uma cavidade da lâmina de imunofluorescência. A lâmina foi deixada em repouso para secar em temperatura de 35° C a 45° C por cerca de 60 minutos;
- Foram adicionados em lâminas secas 10 µL de metanol absoluto em cada cavidade da lâmina contendo os controles, positivo e negativo, e a amostra. Em seguida, a lâmina foi colocada em estufa a 42,5° C por 10 minutos;
- Após a secagem, foram adicionados 50 µL do corante em cada cavidade da lâmina e a mesma foi incubada em câmara úmida escura durante 30 minutos;
- Em seguida, 50 µL de solução DAPI para uso foi adicionado, e a lâmina foi deixada em repouso por 1 minuto em câmara úmida;
- Para a finalização da montagem da lâmina foram adicionados 30 µL de DABCO/Glicerol e a lamínula foi sobreposta. A lâmina foi selada com esmalte e levada ao microscópio para leitura.

4.3.8 Leitura das lâminas

- Cada lâmina foi examinada sistematicamente, com movimentos verticais e horizontais;
- Quando o controle positivo apresenta cistos e oocistos na quantidade esperada e o controle negativo não esteja contaminado foi utilizada a epifluorescência para examinar

a amostra, em um aumento de 200X, na busca de cistos e oocistos que apresentem fluorescência verde maçã brilhante;

- A análise foi realizada mediante ensaio de imunofluorescência (IFA), características de coloração com DAPI e microscopia interferencial e diferencial de contraste de fase (D.I.C.). Foram registradas as ocorrências de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*;
- As lâminas foram armazenadas a 4° C para posterior recuperação dos cistos e oocistos.

4.3.9 Cálculo e expressão dos resultados

Os números de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foram calculados conforme a fórmula:

$$N^o \text{ de (oo)cistos} = \frac{\text{número de (oo)cistos confirmado s}}{V \times F \times R}$$

Onde:

F= fração do *pellet* purificado por IMS

R= fração de amostra analisada ao microscópio

V= volume de amostra filtrada (L)

Os resultados foram expressos em: número de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*/L.

4.4 CONTROLE DE QUALIDADE

Foi realizado o ensaio de Precisão e Recuperação Inicial (PRI) segundo Método USEPA 1623.1/2012 como parte do controle de qualidade da análise da quantificação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. Realizou-se a taxa de recuperação desses protozoários utilizando-se suspensão padronizada *EasySeed*TM (BTF, Austrália) contendo 100 de cistos de *Giardia* e 100 oocistos de *Cryptosporidium*.

A suspensão padronizada foi adicionada a 10L de água reagente seguindo as instruções do fabricante e todo o procedimento foi realizado segundo o método USEPA 1623.1 (2012) e todas as informações relativas à análise constam das fichas de laboratório. Para a determinação da taxa de recuperação calculou-se a média dos cinco ensaios realizados (n=5), bem como o desvio padrão (SD) e o desvio padrão relativo (SDR). A taxa de recuperação foi calculada segundo a equação:

$$R = [(\text{número de cistos/oocistos}) / (\text{número de cistos/oocistos da suspensão padronizada})] \times 100$$

Para o cálculo da determinação do desvio padrão relativo utilizou-se a equação abaixo, como descrita no Método USEPA 1623.1 (2012).

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

A taxa de recuperação considerada aceitável utilizando-se o método USEPA 1623.1 está na faixa de 24 e 100% tanto para *Giardia* como para *Cryptosporidium*

Segundo método USEPA 1623.1/2012, a cada 20 amostras analisadas pelo laboratório deve se efetuar a semeadura experimental (*SPIKE*) para acompanhamento do desempenho do método utilizando-se suspensão padronizada *EasySeed*TM (BTF, Austrália) contendo 100 de

cistos de *Giardia* e 100 oocistos de *Cryptosporidium*. Para o cálculo da porcentagem de recuperação utilizou-se a seguinte equação.

$$R = 100 \times [(N_{sp} - N_s)]/T$$

Onde:

R(%)= Recuperação

N_{sp}= número de cistos/oocistos na amostra com *Spike*

N_s= número de cistos/oocistos na amostra sem *Spike*

T= número de cistos/oocistos contidos na solução padronizada

4.5 RASPAGEM DE LÂMINAS

4.5.1 Seleção das lâminas para raspagem

A raspagem dos cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* a partir das lâminas positivas foi adaptada segundo os métodos descritos por Di Giovanni *et al.* (2010) “*Cryptosporidium* genotyping method for regulatory microscope slides” e Nichols; Campbell; Smith, (2006). As lâminas que obtiveram resultados positivos, acima do Limite de Detecção (LD- >0,1) das 128 amostras foram selecionadas para raspagem, totalizando 56 (56/128) positivas. Foram consideradas positivas as lâminas que ao menos um cisto ou oocisto foi encontrado. Outras 14 lâminas cuja recuperação foi abaixo do limite de detecção (LD- <0,1) foram selecionadas de forma aleatória, totalizando 70 (n=70) lâminas para a raspagem e posterior identificação.

4.5.2 Raspagem de (oo) cistos das lâminas

- Após a seleção das lâminas, para a raspagem, a lamínula foi retirada cuidadosamente com o auxílio de um bisturi;
- Para a lavagem das lâminas foi utilizado PBST *anti-foam* aquecido. A cavidade da amostras foi lavada com o auxílio de uma pipeta, bem como a lamínula, para que não houvesse perdas e o conteúdo recolhido em tubos microcentrífuga ;
- Utilizando uma alça bacteriológica de 1 µL, a cavidade da amostra e a lamínula foram novamente lavadas e raspadas em movimentos lineares em toda sua área;
- O conteúdo proveniente da lavagem e raspagem foi retido em tubos microcentrífuga de 2 mL;
- Após a lavagem os tubos foram centrifugados por 5 min a 14.000 rpm e o sedimento foi retirado com o auxílio de uma pipeta para as análises moleculares.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* e *Giardia*

4.6.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA total foram retirados 200 µL do sedimento obtido após as lavagens e raspagens das lâminas. A extração do DNA foi realizada por meio de *kit* comercial QIAamp® DNA *Stool Mini Kit* (Qiagen, Germany), processada de acordo com as instruções do fabricante e conservado sob refrigeração a 4°C até o momento da utilização.

4.6.2 PCR em tempo real

4.6.2.1 Identificação de *Cryptosporidium* - gene *18S rRNA*

Para a identificação de *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium meleagridis* a partir da detecção das regiões do gene *18S rRNA* em amostras de águas superficiais foram utilizados *primers* e sonda (Quadro 3) descritos por Araújo (2015).

Quadro 3 - Sequência dos pares de *primers* e da sonda utilizados, descrito por Araújo (2015)

Oligonucleotídeos	Sequência	Posição dos nucleotídeos
Primer-F	5' -CCTAATACAGGGAGGTAGTGAC- 3'	440-461
Primer-R	5' -CGCTATTGGAGCTGGAATTACC- 3'	587-589
Sonda -HPM	FAM 5'-ACAGGACTTTTGGTTTGTGTA- 3'MGB	475-497 Região variável

4.6.2.2 Identificação de *Giardia duodenalis* - gene *SSU*

Para identificar *Giardia duodenalis*, a partir do gene *SSU* em amostras de águas superficiais foram utilizados *primers* descritos por YU *et al.* (2008) e sonda adaptada para MGB seguindo o próprio autor (Quadro 4).

Quadro 4 - Sequência dos pares de *primers* e da sonda utilizados para detecção de *Giardia duodenalis*, descritos por YU *et al.* (2008)

Oligonucleotídeos	Sequência	Posição dos nucleotídeos
Iniciador-F	5'-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3'	80-99
Iniciador-R	5'-TTGCCAGCGGTGTCCG-3'	142-127
Sonda - YU	FAM 5'-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-3' MGB	105-124

4.6.2.3 Condições de amplificação da PCR em tempo real para *Cryptosporidium* e *Giardia*

Para amplificação dos fragmentos alvo *18S rRNA* (*Cryptosporidium*) e *SSU* (*Giardia*) foram utilizadas reações com volume final de 20 µL, sendo 4,9 µL de água ultra pura MiliQ®, 10 µL de TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems™), 0,2 µL de cada *primer* (Forward - F e Reverse - R - Exxtend Exxpress - Brasil), 0,30 µL (150 µM) de sonda TaqMan-MGB (Minor Groove Binder), 2 µL de IPC (*Internal Positive Control*) 10X-Mix, 0,4 µL de IPC DNA 50X (Applied Biosystems™) e 2 µL do DNA extraído da amostra. As amostras foram amplificadas e analisadas pelo equipamento Step One Plus – Real Time PCR System (Applied Biosystems™).

As amostras foram amplificadas em duplicatas para verificar a precisão e reprodução durante a detecção. Os ciclos e condições de amplificação dos fragmentos (*18S rRNA* e *SSU*) foram os mesmos: pré-PCR por 2 minutos a 50° C e desnaturação inicial para ativação da enzima AmpliTaq Gold® a 95° C por 10 minutos. Seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95° C (desnaturação) e 1 minuto a 60° C (anelamento e extensão).

As análises dos resultados obtidos foram feitas através do *software* fornecido, concomitantemente com a utilização do controle positivo das reações IPC, que indica se há possíveis inibidores na reação. Para rejeitar resultados falso-positivos fora testado e analisada a especificidades dos *primers* e das sondas para detecção de *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium meleagridis* e *Giardia duodenalis* em conjunto com o DNA de outros microrganismos entre eles *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium muris* e *Klebsiella* sp. Quando realizada análise para *Cryptosporidium* sp., *Giardia* era controle positivo e quando realizada análise para *Giardia*, *Cryptosporidium hominis* também era controle positivo dos *primers* e sonda, em conjunto com os outros microrganismos.

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DE OCORRÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO (USEPA 1623.1)

De dezembro de 2014 a novembro de 2015 foram realizadas coletas mensais nos pontos de captação de 11 municípios do estado de São Paulo, sendo eles Aparecida, Araçoiaba da Serra, Biritiba Mirim Caraguatatuba, Guaratinguetá, Itanhaém, Juquiá, Piedade, Serra Negra, Socorro e Taubaté, totalizando 128 amostras em 12 meses.

Os controles positivos para medir a eficiência de recuperação da análise de amostras de água permitem determinar as concentrações de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras coletadas no ambiente. A Precisão e Recuperação Inicial (PRI) segundo Método USEPA 1623.1/2012, como parte do controle de qualidade da análise da quantificação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* apresentou recuperação inicial de 48% para cistos de *Giardia* e 45% para oocistos de *Cryptosporidium*. Para a recuperação da matriz os valores foram 52% e 48% para cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, respectivamente.

As concentrações dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* variaram entre as amostras coletadas nos municípios (Quadros 5 e 6), todavia fica evidente que o ponto de captação de águas dos municípios de Aparecida, Araçoiaba da Serra, Itanhaém, Piedade, Socorro e Taubaté são os mais comprometidos em sua qualidade, pois apresentaram maiores ocorrências desses protozoários patogênicos (Figura 20) .

A presença de cistos de *Giardia* foi verificada em 29,7% (38/128) das amostras examinadas com concentrações que variaram de <0,1 cisto/L (limite de detecção - LD) a 17,7 cistos/L (QUADRO 5). Oocistos de *Cryptosporidium* ocorreram em 30,4% (39/128) com concentrações que variaram de <0,1 oocisto/L (limite de detecção – LD) a 11,5 oocistos/L

(QUADRO 6). A representação gráfica das variações de concentrações em cada município está está representadas nas figuras 21—31, onde valores que estiveram abaixo do limite de detecção ($<0,1$) são representados pelo valor 0,001.

A frequência de ocorrência foi elevada em alguns municípios, sendo 83,3% em Aparecida, 50% em Araçoiaba da Serra, 36,3% em Itanhaém e 33% em Socorro e Taubaté, para *Giardia*. Para *Cryptosporidium* foram encontradas frequências elevadas em Taubaté e Aparecida com 58,3%, Itanhaém com 45%, Araçoiaba da Serra com 41,6% e Socorro e Piedade com 33%. A maior frequência de ocorrência durante o período de coleta para cistos de *Giardia* foi no município de Aparecida. Os oocistos de *Cryptosporidium* foram mais frequentes nos municípios de Aparecida e Taubaté (Figura 20).

Figura 20 - Frequência da ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em 11 municípios do estado de São Paulo, dezembro de 2014 a novembro de 2015

O município de Biritiba Mirim durante o ano de coleta não apresentou concentrações acima do limite de detecção - LD para cistos de *Giardia*, não resultando em ocorrências no

período de estudo. A frequência de *Cryptosporidium* foi maior comparada a frequência durante os meses de análise para *Giardia*. No entanto, em quatro municípios Caraguatatuba, Juquiá, Serra Negra e Socorro a frequência para ambos os parasitas foi igual 20%, 8%, 25% e 33%, respectivamente (Figura 20).

Os quadros 5 e 6 apresentam as concentrações de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* encontrados durante os 12 meses de coleta. Para *Giardia* o mês de janeiro/2015, sazonalidade no verão, correspondeu ao mês que mais houve frequência nos pontos de captação dos municípios de Araçoiaba da Serra, Caraguatatuba, Guaratinguetá, Aparecida, Juquiá e Serra Negra. Para *Cryptosporidium* o mês que teve mais frequência da ocorrência nos pontos de captação foi em junho/2015, sazonalidade no inverno. Os municípios que tiveram ocorrências nos pontos de captação, neste mesmo mês foram Aparecida, Araçoiaba da Serra, Itanhaém, Juquiá, Piedade, Serra Negra, Socorro e Taubaté.

Figura 21. Concentração de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em Aparecida no período de 12 meses

Figura 22. Concentração de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em Araçoiaba da Serra no período de 12 meses

Figura 23. Concentração de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em Biritiba Mirim no período de 12 meses

Figura 24. Concentração de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em Caraguatatuba no período de 12 meses

Figura 25. Concentração de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em Guaratinguetá no período de 12 meses

Figura 26. Concentração de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em Juquiá no período de 12 meses

Figura 27. Concentração de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em Itanhaém no período de 12 meses

Figura 28. Concentração de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em Piedade no período de 12 meses

Figura 29. Concentração de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em Serra Negra no período de 12 meses

Figura 30. Concentração de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em Socorro no período de 12 meses

Figura 31. Concentração de (oo) cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em Taubaté no período de 12 meses

Quadro 5 - Concentração de cistos de *Giardia* em amostras de água destinadas ao abastecimento público de 11 municípios de estado de São Paulo, dezembro de 2014 a novembro de 2015

<i>Giardia</i> spp.													Valores	
Municípios	dez/14	jan/15	fev/15	mar/15	abr/15	mai/15	jun/15	jul/15	ago/15	set/15	out/15	nov/15	Min.	Máx.
Itanhaém	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,0	< 0,1	< 0,1	0,1	NR	< 0,1	< 0,1	0,1	0,1	<0,1	1,0
Taubaté	0,1	< 0,1	< 0,1	1,0	< 0,1	0,12	< 0,1	< 0,1	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	<0,1	1,0
Caraguatatuba	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	NR	NR	< 0,1	<0,1	0,1
Guaratinguetá	< 0,1	0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	NR	< 0,1	<0,1	0,1
Aparecida	0,2	6,7	0,5	3,6	17,7	0,63	0,2	0,1	< 0,1	0,4	1,66	< 0,1	<0,1	17,7
Juquiá	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	<0,1	0,1
Biritiba Mirim	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	<0,1	<0,1
Serra Negra	0,8	2,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	<0,1	2,4
Socorro	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,4	0,2	< 0,1	< 0,1	0,2	0,3	< 0,1	< 0,1	<0,1	0,4
Piedade	< 0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	<0,1	<0,1
Araçoiaba da Serra	< 0,1	1	< 0,1	< 0,1	0,44	0,1	0,67	0,33	1,05	< 0,1	< 0,1	< 0,1	<0,1	1,05

NR: Não realizado

Quadro 6 - Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água destinadas ao abastecimento público de 11 municípios de estado de São Paulo, dezembro de 2014 a novembro de 2015

<i>Cryptosporidium</i> spp.													Valores	
Municípios	dez/14	jan/15	fev/15	mar/15	abr/15	mai/15	jun/15	jul/15	ago/15	set/15	out/15	nov/15	Min.	Máx
Itanhaém	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,2	< 0,1	< 0,1	0,1	NR	<0,1	<0,1	0,2	< 0,1	<0,1	1,2
Taubaté	< 0,1	< 0,1	< 0,1	11,5	0,5	0,24	0,80	0,2	< 0,1	0,2	< 0,1	0,5	<0,1	11,5
Caraguatatuba	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	NR	NR	< 0,1	<0,1	0,1
Guaratinguetá	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	NR	< 0,1	<0,1	0,1
Aparecida	< 0,1	0,1	1,3	0,3	< 0,1	0,13	0,1	< 0,1	0,25	< 0,1	0,33	< 0,1	<0,1	1,3
Juquiá	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	<0,1	<0,1
Biritiba Mirim	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,2	<0,1	2
Serra Negra	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,5	< 0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,4	<0,1	1,4
Socorro	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,2	0,1	< 0,1	0,1	0,2	< 0,1	< 0,1	<0,1	0,2
0,2	< 0,1	< 0,1	0,2	< 0,1	< 0,1	0,1	0,2	< 0,1	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	<0,1	0,2
Araçoiaba da Serra	< 0,1	2,9	< 0,1	< 0,1	0,77	0,4	1,3	< 0,1	1,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	<0,1	2,9

NR: Não realizado

A tabela 3 apresenta a distribuição dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*, segundo as estações do ano, durante o período de estudo. A presença de oocistos de *Cryptosporidium* nos pontos de captação de água foi mais incidente no inverno (61,5%). Para cistos de *Giardia* a maior frequência apresentada ocorreu no verão (62,5%). No entanto, a estação de ano que apresentou maior frequência desses protozoários foi o inverno.

Tabela 3 - Distribuição de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp., segundo as estações do ano, de dezembro de 2014 a novembro de 2015

Protozoário	Quantidade e porcentagem de (oo) cistos frequentes (%)				Total
	Verão (dez a mar)	Outono (mar a jun)	Inverno (jun a set)	Primavera (set a nov)	
<i>Cryptosporidium</i> sp.	9 (37,5)	8 (50)	16 (61,5)	6 (54,5)	39 (50,6)
<i>Giardia</i> sp.	15 (62,5)	8 (50)	10 (38,5)	5 (45,5)	38 (49,4)
Total	24 (31,1)	16 (20,8)	26 (33,8)	11 (14,3)	77 (100)

As amostras positivas (Tabela 4) pelo ensaio de imunofluorescência (IFA) (USEPA 1623.1/2012) foram selecionadas para lavagem e raspagem das lâminas (DI GIOVANNI *et al.*, 2010; NICHOLS; CAMPBELL; SMITH, 2006) e, posterior identificação por PCR em tempo real, totalizando 56 amostras positivas. As lâminas que continham ao menos um (oo) cisto foi considerada positiva e selecionada. Além destas, outras 14 lâminas negativas (<LD) foram escolhidas aleatoriamente, dessa forma, foram identificadas 70 amostras (n=70).

5.2 RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium meleagridis* E *Giardia duodenalis*

Nas amostras de águas superficiais selecionadas para identificação (n=70), o ensaio de PCR em tempo real detectou um total de 81,4% (57/70) de amostras positivas para *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium meleagridis* e 21,4% (15/70) de amostras positivas para *Giardia duodenalis* (Tabela 4).

Ao longo dos 12 meses de estudo o protozoário *Cryptosporidium* foi detectado e identificado, mesmo em baixas concentrações, no entanto, os meses das coletas que tiveram o maior número de amostras identificadas periodicamente foram junho, julho, agosto e setembro (066/15 a 100/15), meses cuja estação do ano predominante é o inverno. Dado que corrobora com a maior frequência de oocistos encontrados nos pontos de captação.

Em todas amostras negativas (abaixo do limite de detecção- <LD) as espécies antrópicas (*C. hominis*, *C. parvum*) e zoonótica (*C. meleagridis*) de *Cryptosporidium* foram identificadas. Os Cts (número de ciclos necessários para ultrapassar o threshold - limiar) das amostras negativas variaram entre 30 e 33, evidenciando concentrações relativamente altas do DNA do parasita, mesmo nestas amostras. As 14 amostras negativas foram selecionadas aleatoriamente, sem períodos específicos do ano. Foi selecionada uma amostra negativa de cada município, com exceção de Araçoiaba da Serra, Itanhaém e Taubaté que totalizaram duas amostras negativas de cada município.

Giardia duodenalis foi identificada a partir do mês de abril (044/15, 047/15 e 050/15), seguido dos meses de maio (059/15 e 065/15), junho (071/15 e 76/15), julho (081/15 e 087/15), agosto (094/15 e 100/15), setembro (104/15, 106/15 e 112/15) e outubro (115/15). As amostras identificadas como *Giardia duodenalis*, a partir dos *primers* e sonda para o gene

SSU, (YU *et al.*, 2008), os Cts variaram entre 33–40. A amostra que teve o menor Ct = 33 foi a 081/15. *Giardia duodenalis* foi identificada somente em uma amostra (112/15) negativa, segundo o método de quantificação (USEPA/1623.1).

Figura 32 – Gráfico do ensaio de PCR em tempo real com a amplificação positiva do IPC e amostras de *Giardia* para análise. As linhas abaixo do *threshold* (linha de corte) representam ruídos da reação de amplificação

As figuras 32 e 33 representam a amplificação das amostras de *Cryptosporidium* e *Giardia*, onde as curvas que ultrapassaram a linha de corte foram positivas para as espécies de *Cryptosporidium hominis*, *parvum e meleagridis* e *Giardia duodenalis*.

Figura 33 – Gráfico do ensaio de PCR em tempo real para análise das amostras de *Cryptosporidium*. As linhas abaixo do *threshold* (linha de corte) representam ruídos da reação de amplificação

As amostras detectadas pelos *primers* e sonda do gene *18S rRNA*, descrito por Araújo (2015) identificaram *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* ou *Cryptosporidium meleagridis*. Entre as amostras identificadas os Cts variaram entre os Cts de 25–40. As amostras que tiveram maiores concentrações do DNA do parasita, com Cts igual ou menor que o Ct 30 foram: 066/15, 078/15, 081/15, 093/15, 094/15, 104/15, 115/15, 124/15, 125/15, 130/15 e 131/15. A amostra 093/15 teve o menor Ct = 25.

Tabela 4 – Amostras positivas e negativas identificadas por PCR em tempo real

Nº Amostra	Quantificação (USEPA, 2012)		PCR em tempo real	
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i> (Araújo 2015)	<i>Giardia</i> (Yu et al., 2009)
615/14	<LD	1 cisto	–	–
618/14	<LD	2 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	–
621/14	<LD	4 cistos	–	–
003/15	<LD	1 cisto	–	–
004/15	<LD	1 cisto	–	–
005/15	1 oocisto	67 cistos	–	–
006/15	<LD	1 cisto	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	–

Nº Amostra	Quantificação (USEPA, 2012)		PCR em tempo real	
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i> (Araújo 2015)	<i>Giardia</i> (Yu et al., 2009)
012/15	29 oocistos	10 cistos	—	—
019/15	13 oocistos	5 cistos	—	—
024/15	2 oocistos	1 cisto	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
029/15	6 oocistos	5 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
030/15	23 oocistos	2 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
031/15	1 oocisto	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
032/15	1 oocisto	1 cisto	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
033/15	3 oocistos	36 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
036/15	1 oocisto	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
041/15	5 oocistos	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
044/15	<LD	160 cistos	—	<i>duodenalis</i>
047/15	<LD	3 cistos	—	<i>duodenalis</i>
050/15	7 oocistos	4 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	<i>duodenalis</i>
056/15	2 oocistos	1 cisto	—	—
057/15	<LD	1 cisto	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
059/15	1 oocisto	5 cistos	—	<i>duodenalis</i>
063/15	2 oocistos	2 cistos	—	—
064/15	1 oocisto	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
065/15	4 oocistos	1 cisto	—	<i>duodenalis</i>
066/15	1 oocisto	1 cisto	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
067/15	8 oocistos	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
070/15	1 oocisto	2 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
071/15	1 oocisto	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	<i>duodenalis</i>
073/15	1 oocisto	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
074/15	1 oocisto	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
075/15	2 oocistos	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
076/15	12 oocistos	6 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	<i>duodenalis</i>
078/15	2 oocistos	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
081/15	<LD	1 cisto	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	<i>duodenalis</i>
083/15	20 oocistos	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
087/15	<LD	3 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	<i>duodenalis</i>
091/15	<LD	2 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
092/15	1 oocisto	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
093/15	<LD	1 cisto	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
094/15	2 oocistos	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	<i>duodenalis</i>
098/15	1 oocisto	2 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
099/15	2 oocistos	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
100/15	11 oocistos	10 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	<i>duodenalis</i>
104/15	2 oocistos	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	<i>duodenalis</i>
106/15	<LD	4 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	<i>duodenalis</i>
109/15	<LD	1 cisto	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
110/15	2 oocistos	3 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
113/15	2 oocistos	1 cisto	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
115/15	3 oocistos	15 cistos	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	<i>duodenalis</i>
124/15	<LD	1 cisto	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
125/15	2 oocistos	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
130/15	2 oocistos	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
131/15	7 oocistos	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
AMOSTRAS NEGATIVAS (abaixo <LD)				
097/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
018/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
038/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
128/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
614/14	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
055/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
096/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
068/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
134/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
112/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	<i>duodenalis</i>
010/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
060/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—
114/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	—

Nº Amostra	Quantificação (USEPA, 2012)		PCR em tempo real	
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i> (Araújo 2015)	<i>Giardia</i> (Yu et al., 2009)
016/15	<LD	<LD	<i>hominis/parvum/meleagridis</i>	–

<LD – abaixo do limite de detecção

(–) – amostra não identificada

Em todos os 11 municípios *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium meleagris* foi identificado. Das 57 amostras positivas para as espécies, nove ocorreram no município de Taubaté; oito de Aparecida; seis em Itanhaém, Araçoiaba da Serra e Serra Negra; cinco em Piedade; quatro em Caraguatatuba e Socorro; três em Juquiá, Guaratinguetá e Biritiba Mirim (Figura 33). A frequência das espécies de *Cryptosporidium* encontradas foi maior em Taubaté (15,8%), seguido de Aparecida (14%), Araçoiaba da Serra, Itanhaém e Serra Negra (10,5%), Piedade (8,8%), Caraguatatuba e Socorro (7,0%), Biritiba Mirim, Guaratinguetá e Juquiá (5,3%).

Figura 34 – Número de espécies identificadas entre os 11 municípios para *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium meleagris*

A espécie de *Giardia duodenalis* foi identificada em cinco municípios seis em Aparecida e Araçoiaba da Serra; uma em Juquiá, Socorro e Taubaté. Totalizando as 15 amostras identificadas para a espécie pelo ensaio de PCR em tempo real (Figura 32). A frequência de *Giardia duodenalis* encontrada foi maior em Aparecida e Araçoiaba da Serra (40%), seguido de Juquiá, Socorro e Taubaté (6,7%).

Figura 35 – Número de espécies identificadas entre os 11 municípios para *Giardia duodenalis*

O controle exógeno IPC (*internal positive control*) foi utilizado nas corridas dos ensaios para *Giardia*, pois as amostras são provenientes da mesma lâmina. Os dados referentes às amostras e o IPC foram analisados para que não houvesse a ocorrência de resultados falso-negativos, que podem ser decorrentes por conta da presença de inibidores no DNA. Na figura 32 estão representadas as curvas para amostras positivas na identificação de *Giardia duodenalis* e as curvas de amplificação do controle IPC.

6 DISCUSSÃO

Os protozoários patogênicos *Cryptosporidium* e *Giardia* constituem atualmente as causas mais comuns de diarreia com elevada morbidade e mortalidade. O esgoto é uma importante fonte de microrganismos patogênicos no ambiente e pode conter elevadas concentrações desses parasitas. As precárias condições sanitárias podem disseminar ambos os protozoários em corpos hídricos e impactar principalmente aqueles destinados ao abastecimento público.

Nos municípios que apresentaram situação mais crítica em relação à ocorrência de patógenos: Aparecida, Araçoiaba da Serra, Itanhaém, Socorro, Taubaté e Piedade também foram observadas condições muito severas de degradação dos mananciais, devido à presença de áreas urbanas, lançamento de esgotos domésticos sem tratamento e a presença de rebanho de bovinos, como constatado nas imagens das áreas de drenagem determinantes dos pontos de captação destes municípios descritos na seção 4 - Material e Métodos. Em relação ao tratamento de esgotos domésticos, estes municípios têm baixa cobertura da rede de coleta e ainda, em alguns deles, o manancial de captação é o mesmo do corpo receptor de efluentes.

Da mesma forma, as imagens também evidenciam que os municípios que apresentaram melhores condições também apresentam suas áreas determinantes mais preservadas, mananciais com mata ciliar e menor presença de áreas urbanas (Biritiba Mirim, Caraguatatuba e Juquiá). Deve ser enfatizado que, embora ambos os patógenos apresentem dose infecciosa baixa, estes também apresentam elevada resistência ao processo de desinfecção e concentrações como as observadas neste estudo, ainda que considerada a eficiência de remoção ideal no tratamento, podem resultar em riscos à saúde humana, como demonstrado no estudo de Sato *et al.* (2013).

Devido a esta situação, a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em águas superficiais, especialmente aquelas destinadas ao abastecimento de água potável, é de grande importância para a saúde pública. A fim de fornecer água potável e segura, os sistemas tratamento de água devem otimizar cinco elementos-chave: proteção dos recursos hídricos, tratamento adequado, distribuição segura, monitoramento apropriado e resiliência adequada a resultados de monitoramento adverso (HUCK; COFFEY, 2004).

A ocorrência desses protozoários em fontes de água tem sido relatada por diversos autores em todo o mundo (DALY et al., 2010; BALDURSSON; KARANIS, 2011; GALLAS-LINDEMANN et al., 2012a; EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017a; ROSADO-GARCÍA et al., 2017; RAMO et al., 2017). Diversos eventos podem influenciar a carga ambiental de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em águas superficiais, incluindo práticas agrícolas, contaminação por esgoto, chuvas intensas e antagonicamente a diminuição da precipitação (concentração da matéria). Nas águas estagnadas, os (oo) cistos se estabelecem lentamente no sedimento. Isso pode ocorrer em ambientes naturais em que o fluxo de água é baixo (lagos, córregos e rios de fluxo lântico) e em ambientes artificiais como reservatórios para produção de água potável (MEDEMA et al., 1998; CARMENA et al., 2007; LAL et al., 2013).

Em estudo realizado por Xiao et al. (2012) foram avaliados os pontos de captação de água para abastecimento público de 66 sistemas de tratamento em 33 cidade chinesas os autores relataram concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* que variaram de 0 a 6/10L (média de 0,7/10L), valores semelhantes aos encontrados no presente estudo.

No Brasil, investigação realizada por Sato et al. (2013) mostrou frequência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* de 49,5% e 9,2%, respectivamente, em amostras avaliadas de pontos de captação de água para abastecimento publico nas regiões

metropolitanas de São Paulo, Campinas, da Baixada Santista e região do Vale do Paraíba. As concentrações máximas encontradas foram de 97 cistos/L para *Giardia* e de 6 oocistos/L para *Cryptosporidium*. Resultados similares foram encontrados por Prystajec *et al.* (2014) em monitoramento de (oo) cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* realizado por dois anos na British Columbia (Canadá). *Giardia* foi mais frequente do que *Cryptosporidium* e apresentou concentrações mais elevadas.

No estudo de Ramo *et al.* (2017) amostras de água bruta e água tratada foram coletadas de 20 Estações de Tratamento de Água (ETA), localizadas nas cidades mais populosas de Aragón (nordeste da Espanha). Essas estações fornecem água potável para quase 1 milhão de pessoas, o que representa mais de 75% da população. De cada estação de tratamento de água, as amostras de água bruta (não tratada) e água potável (tratada) foram coletadas em quatro momentos diferentes, cada amostra representando uma estação diferente (primavera, verão, outono e inverno) e processadas de acordo com o método 1623 da USEPA. Ambos os parasitas foram identificados na água bruta durante todo o ano, com uma menor frequência no outono e um pico no inverno, concentrações média de 67 ± 38 oocistos por 100 L e 125 ± 241 cistos por 100 L. Este estudo, assim como o de Ramo *et al.* (2017), teve uma abordagem espacial e temporal significativa, onde as maiores prevalências de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* foram detectados na mesma estação do ano, o inverno. Em uma análise individual de cada parasita, *Cryptosporidium* foi mais prevalente no inverno e *Giardia* no verão, em ambos os estudos. No entanto, vale enfatizar que os anos (2014/2015) de coleta das amostras foi um ano atípico no estado e São Paulo, devido à crise hídrica nos reservatórios que servem de abastecimento público que sofreram com períodos longos de escassez (CETESB, 2015).

Diferenças referentes à frequência e concentração podem ser observadas, mas mostram a importância de se monitorar esses patógenos especialmente pela relevância em saúde pública como enfatiza o estudo realizado por Widerström *et al.* (2014), o qual relata surto de criptosporidíase associado à ingestão de água tratada. Em Östersund (Suécia) 45% da população, aproximadamente 27.000 habitantes, foi acometida por criptosporidíase cujo agente etiológico identificado foi *Cryptosporidium hominis* subtipo IbA10G2. O parasita estava presente nas amostras clínicas dos pacientes e na água tratada para consumo humano. Os autores observaram que o processo de tratamento não foi significativamente eficiente em remover os oocistos desse protozoário repercutindo em sérios problemas de saúde a seus consumidores. No presente estudo, a frequência de amostras positivas para *Giardia* e *Cryptosporidium* foi maior do que as encontradas por Ryu; Morteza (2008) que avaliaram no período de quatro anos a qualidade das águas superficiais da região central do estado do Arizona (EUA). Dentre as 162 amostras analisadas 10% estavam contaminadas com oocistos de *Cryptosporidium* e 27% por cistos de *Giardia*.

Em relação à distribuição de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em água Ongerth; Saaed (2013) demonstraram através do modelo estatístico de Poisson a distribuição de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em amostras de águas com concentrações próximas ou abaixo do limite de detecção, obtidas a partir método analítico o Método 1623 da USEPA. Em amostras com volumes de 50 L de água foram semeados oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* com concentrações de 0,2/L, 1-2/ L e 6-8 / L, respectivamente. Os volumes semeados de 50 L foram analisados em cinco alíquotas de 10 L para determinar o número de oocistos e cistos em cada. Os dados das análises das amostras de água superficial com o volume de 10 L não encontraram nenhum dos protozoários, resultando em um resultado abaixo do limite de detecção.

Neste estudo, obteve-se frequência de concentrações abaixo do limite de detecção, sendo 72 amostras das 128 coletadas, abaixo do limite de detecção. Ongerth; Saaed, (2013), discutem que os resultados analíticos negativos dependem apenas do volume da amostra coletada e da eficiência da análise. No entanto, vale ressaltar que a etapa de concentração das amostras ambientais propicia um acúmulo de partículas que possuem tamanhos semelhantes aos dos oo (cistos) nos poros das cápsulas e membranas de filtração. A presença dessas sujidades na amostra é um dos principais fatores interferentes da eficiência de recuperação do método (FRANCO *et al.* 2012). Além disso, para minimizar os resultados abaixo do limite de detecção, por conta das características das amostras, outro fator pelo qual o número de (oo) cistos presentes em amostras de água superficial sejam encontrados em menores quantidades deve-se ao fato de que estes podem estar mais diluídos nos corpos hídricos, sendo necessários volumes de 10 L a 100 L para a realização da análise (ARAÚJO, 2008). Deste modo, a baixa concentração de oocistos verificada neste estudo não elimina a possibilidade de circulação deste parasita nos 11 mananciais analisados. Em contrapartida, grandes volumes podem tornar as análises mais onerosas.

Sunnotel *et al.* (2006) detectaram *Cryptosporidium* a partir de lâminas clínicas. As lâminas arquivadas por até três anos foram examinadas quanto à presença de oocistos com o auxílio de um microscópio de fluorescência equipado com um sistema de filtro de isotiocianato de fluoresceína. Nas contagens de oocistos foram observados números baixos entre 1 a 20 oocistos. O sistema de microdissecção a laser PALM (Microlaser, Bernried, Alemanha) foi utilizado para detectar e dissecar oocistos únicos ou grupos de oocistos das lâminas. No entanto, os autores ressaltam que a sensibilidade foi aumentado quando se usava tecnologia de PCR em tempo real, quando comparado com uma abordagem de PCR convencional e *nested* PCR para detectar 18S.

A utilização de amostras armazenadas em lâminas derivadas de laboratórios de saúde pública e de serviços de água destaca-se como uma ferramenta rápida de rastreio de alto rendimento para o monitoramento rotineiro de *Cryptosporidium* e *Giardia*, fornecendo atualizações epidemiológicas, auxiliando identificar e rastrear patógenos e suas rotas de infecção (SUNNOTEL *et al.*; 2006). A utilização do método 1623.1 (USEPA, 2012) combinado com ensaios moleculares de PCR em tempo real, a partir das lavagens e raspagem de lâminas forneceu para este estudo a identificação das principais espécies humanas de *Cryptosporidium* e *Giardia*.

Um desafio para a técnica de raspagem é a retenção de parasitas nos poços das lâminas, devido as etapas de lavagens e fixação da montagem das lâminas no método 1623.1 (USEPA, 2012). Segundo os resultados obtidos por Ware *et al.* (2013), durante a coloração das lâminas cerca de 20% dos parasitas podem ser perdidos. Perdas semelhantes durante a coloração foram observadas também em lâminas fixados em metanol. Outro cuidado que deve-se tomar ao realizar a técnica de raspagem de lâminas é no momento da remoção das lamínulas, que pode resultar em perdas de (oo) cistos. Neste estudo, todas as lamínulas foram lavadas com PBS aquecido e raspadas na mesma área do poço designado para amostras.

A técnica de raspagem de lâminas empregada para esse estudo foi adaptada a partir dos protocolos desenvolvidos por Nichols *et al.* (2010) e Di Giovanni *et. al.* (2010). Antes de realizar a raspagem de lâminas diversos protocolos e ferramentas foram testados. Em ensaios moleculares prévios, a utilização de alça bacteriológica em conjunto com o tampão PBS aquecido mostrou-se mais eficiente. No estudo de Di Giovanni *et. al.* (2010), células de espuma fechadas foram mais eficientes na tentativa de recuperar os (oo) cistos para genotipagem, pois os autores reconhecem que a área de contato é aumentada com a utilização da espuma, tornado a raspagem mais uniforme. No entanto, a adaptação das células de

espumas para esse estudo não desempenhou bons resultados de recuperação, uma vez que os (oo) cistos se aderem facilmente ao material.

Todas as amostras negativas neste estudo foram positivas nas análises moleculares por ensaio de PCR em tempo real para os parasitas *Cryptosporidium hominis/parvum/meleagridis*, detectados por sonda e *primers* específicos descritos por Araújo (2015). Tais resultados também foram observados por PERALTA *et al.*, (2016) onde das 26 amostras analisadas por microscopia nove foram negativas, no entanto nas análises posteriores por PCR em tempo real todas foram identificadas como *Cryptosporidium hominis*. Além disso, as amostras positivas por microscopia foram analisadas por um ensaio de PCR *TaqMan* anteriormente descrito que permitiu a diferenciação de *C. hominis* e *C. parvum* em nível da espécie. De acordo com nossos resultados, ambos os métodos poderiam ser empregados simultaneamente para melhorar e confirmar os resultados. Estes resultados conferem alta sensibilidade do método de detecção de PCR em tempo real.

A introdução de PCR em tempo real com sondas de detecção fluorescente pode reduzir o risco de contaminação, tempo de trabalho e custos de reagentes através da possibilidade de combinar ensaios para a detecção de diferentes alvos em um ensaio (VERWEIJ *et al.*, 2004). GAO *et al.*, (2014) utilizaram separação imunomagnética (IMS) em conjunto com qPCR para melhorar a taxa de detecção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes de vitelos. Os autores concluíram que os ensaios de detecção e quantificação são confiáveis para *Cryptosporidium parvum* a partir de amostras contaminadas, podendo ser aplicável a amostras ambientais, portanto, concluíram, que a técnica mostrou-se específica, sensível e eficiente.

Outro fator importante a ser observado é a qualidade do DNA para a realização das análises moleculares, sendo considerado um fator limitante na eficiência dos ensaios de PCR

em tempo real (HOORFAR *et al.*, 2003). No presente estudo, a purificação por IMS permite a diminuição de inibidores ambientais nas amostras de água. O *kit* utilizado para a separação imunomagnética foi *Dynabeads* GC-Combo com *Dynabeads* anti-*Cryptosporidium* e *Dynabeads* anti-*Giardia*. A purificação de IMS torna-se um passo importante e eficiente de pré-PCR para separação e isolamento de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* a partir de amostras de água e fezes (COKLIN *et al.*, 2011).

Em 2011 Araújo *et al.* identificou *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium* sp. em amostras de águas recreativas e *Cryptosporidium meleagridis* em amostras de águas superficiais. O estudo foi o primeiro relato de *Cryptosporidium hominis* em amostras ambientais no Brasil. Os autores ressaltam a importância das ferramentas moleculares para a identificação específica em corpos hídricos, além da epidemiologia e dinâmica de transmissão desses patógenos.

Franco *et al.* (2016) evidenciaram a circulação desses patógenos em rios do estado de São Paulo. Oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em 42,8% das amostras coletadas do rio Atibaia e em 85,7% das amostras provenientes do rio Capivari. Cistos de *Giardia* foram encontradas em 100% das amostras do rio Atibaia e Capivari. Ambos os protozoários foram detectados por imunofluorescência. As análises moleculares identificaram a presença de *C. hominis* e *C. parvum* e *Giardia duodenalis* subgrupo BIII.

No presente estudo, a circulação de cistos de *Giardia* foi evidenciado em dez dos 11 pontos de captação de água dos municípios estudados, exceto Biritiba Mirim. O ponto determinante da área de captação do município é realizado no rio Tietê. Dados desse estudo, assim como de Franco *et al.* (2016) evidencia a circulação desse protozoário nos rios do estado de São Paulo. As espécies antrópicas mais frequentes de ambos protozoários também foram identificadas pelos autores.

Os ensaios moleculares de PCR e tempo real baseados em sondas *TaqMan* são fundamentais para detectar e identificar diferentes espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* em matrizes ambientais. Staggs *et al.* (2013) determinou a aplicabilidade do ensaio de qPCR baseado em *TaqMan* para detectar *C. hominis*, *C. parvum* e outras espécies de *Cryptosporidium* spp em amostras de água. Foi determinada especificidade e sensibilidade analítica de dez ensaios de qPCR. Foi investigada a capacidade desses ensaios detectarem de forma confiável baixas concentrações de oocistos em matrizes ambientais devido a dificuldades em recuperá-los e identificá-los.

O presente estudo foi capaz de detectar e identificar pelo sistema *Taqman* cistos e oocistos em baixas quantidades presentes nas lâminas. Em todas as lâminas negativas para a microscopia *Cryptosporidium hominis-parvum-meleagridis* foi identificado. Ramírez *et al.* (2015) analisaram 181 amostras clínicas de crianças assintomáticas em Virgen, Cundinamarca, Colômbia. Para o diagnóstico de *Giardia duodenalis* foi realizada a microscopia das amostras fecais, em seguida a extração de DNA, utilizando o kit *QIAmp DNA Stool Mini Kit* e identificação do parasita através da comparação de três marcadores *SSU rDNA*, *tpi* e *gdh* por qPCR. A prevalência do *SSU rDNA* foi de 80%, *tpi* de 77% e *gdh* de 76%. Os autores ressaltam que ao aplicar o método de qPCR em comparação com a microscopia, a sensibilidade aumento de 5,8% para 31,5% para *Giardia*. E o marcador *SSU rDNA* foi mais sensível do que o *tpi* e o *gdh*, sugerindo que este *locus* é ideal para a detecção de *Giardia*. Neste estudo, das 15 amostras identificadas como *Giardia duodenalis* pelo marcador da região *SSU rDNA*, quatro foram identificadas pelo ensaio de PCR em tempo real mesmo com o resultado da microscopia abaixo do limite de detecção. Nesse estudo, A detecção em microscopia pode ter ocorrido abaixo do limite de detecção devido interferência da matriz na interação anticorpo e (oo) cistos e ainda na sujidade das lâminas que, dessa forma dificultando sua leitura. No entanto, essas amostras poderão ser sequenciadas para

confirmação das espécies encontradas. Dessa forma, nossos dados corroboram com os achados de Ramírez *et al.* (2015).

7 CONCLUSÕES

A circulação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foi evidenciada ao longo dos 12 meses de estudo nas áreas de drenagem determinantes dos pontos de captação de água do estado de São Paulo. As ferramentas utilizadas para identificação dos protozoários patogênicos foram eficientes, uma vez que *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium meleagridis* e *Giardia duodenalis* foram detectados nas amostras de água bruta coletadas das bacias hidrográficas estudadas.

Nesse sentido, a técnica de raspagem de lâminas adaptada de protocolos já existentes foi uma ferramenta útil, relativamente simples e de baixo custo que fornece informações adicionais obtidas através da microscopia. E as sondas utilizadas neste estudo para o gene 18S rRNA específicos para *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium meleagridis* e o gene SSU para *Giardia duodenalis* foram capazes de identificar essas espécies que infectam o homem a partir de matrizes ambientais. Estas técnicas mostraram-se eficazes e com bom desempenho em conjunto com o método de quantificação Método 1623.1.

A frequência elevada da ocorrência destes protozoários patogênicos, as concentrações elevadas e as espécies antrópicas (*Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*) e zoonótica (*Cryptosporidium meleagridis*) encontradas configuram-se um cenário de preocupação do ponto de vista de saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Review**. v. 14, n. 3, p. 447-475, 2001.
- AMAR, C.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; McLAUCHLIN, J. Extraction and genotyping of *Cryptosporidium parvum* DNA from fecal smears on glass slides stained conventionally for direct microscope examination. **Jornal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 1, p. 401-403, 2001
- ALMEIDA, J. C.; MARTINS, F. D. C.; FERREIRA NETO, J. M.; SANTOS, M. M. Dos; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; KURODA, E. K.; FREIRE, R. L. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 303–308, 2015.
- ALMEIDA, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new Real-Time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1895-1901, 2010.
- ALVES, R. M. S. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos**. Apresentado no VI Congresso Latino Americano e XII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos; 2013; Gramado, BR. [acesso em 01 de novembro 2017]. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/atividadelegislativa/comissoes/comissoespermanentes/cmads/audiencias-publicas/audiencia-publica-2013/crueldade-a-que-os-animais-de-producao-sao-expostos-em-abatedouros-municipais/apresentacoes/apresentacao-da-sra-rejane-alves/view>.
- AMADI, B.; MWIYA, M.; SIANONGO, S.; PAYNE, L.; WATUKA, A.; KATUBULUSHI, M.; KELLY, P. High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 195, 2009. Disponível em: <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-9-195>>.
- ARAUJO, R. S.; DROPA, M.; FERNANDES, L. N.; CARVALHO, T. T.; SATO, M. I.; SOARES, R. M.; MATTE, G. R.; MATTE, M. H. Genotypic characterization of *Cryptosporidium hominis* from water samples in Sao Paulo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 5, p. 834–838, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22049036>>.
- ARAUJO, R. S. Quantificação e caracterização genotípica de *Cryptosporidium* spp. isolados de água bruta superficial e esgoto bruto para a monitorização em mananciais de abastecimento público na região metropolitana de São Paulo (RMSP). [Tese de doutorado] , 2015.
- BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6603–6614, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>>.
- BETANCOURT, W. Q.; ROSE, J. B. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1–2 SPEC.ISS., p. 219–234, 2004.

BRANCO, N.; LEAL, D. A. G.; FRANCO, R. M. B. A Parasitological Survey of Natural Water Springs and Inhabitants of a Tourist City in Southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 5, p. 410–417, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial**, nº 239, Seção 1, página 39 de 14/12/2011. Brasília, 2018.

CACCIÒ, S. M.; CHALMERS, R. M. Human cryptosporidiosis in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 6, p. 471–480, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.021>>.

CARMENA, D. Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection, surveillance and implications for public health. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, n. Table 2, p. 3–14, 2010.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; GARCÍA-PRSEDO, I.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; COSTA, J. M. C.; MEZO, M. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Water Research**, v. 42, p. 3528–3538, 2008.

CERTAD, G.; VISCOGLIOSI, E.; CHAB??, M.; CACCI??, S. M. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 561–576, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.006>>.

CAVALIER-SMITH, T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. **Eur. J. Protistol**, v. 50, p. 472–495, 2014.

CHALMERS, R. M.; FERGUSON, C.; CACCIO, S.; GASSER, R. B.; ELOSTA, Y. G. A.; HEIJNEN, L.; XIAO, L.; HADFIELD, S.; SINCLAIR, M.; STEVENS, M. Direct comparison of selected methods for genetic characterization of *Cryptosporidium parvum*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 397–410, 2005.

CHALMERS, R. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. **Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita**, v. 48, n. 4, p. 429–446, 2012.

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. Governo do estado de São Paulo**, 2012. (Série Relatórios) Secretaria do meio ambiente - Companhia Ambiental do estado de São Paulo, 2013.

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo**, 2014. (Série Relatórios) Secretaria do meio ambiente - Companhia Ambiental do estado de São Paulo, 2015.

COELHO, H. C.; DURIGAN, M.; LEAL, D. A. G.; SCHNEIDER, A. B.; FRANCO, R. M. B.; SINGER, S. M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. **Plos Neglected Tropical Diseases**, p. 1–22, 2017.

DALY, E. R.; ROY, S. J.; BLANEY, D. D.; MANNING, J. S.; HILL, V. R. XIAO, L.; STULL, J. W. Outbreak of giardiasis associated with a community drinking-water source. **Epidemiology Infect**, v. 138, p. 491-500, 2010.

DAVID, E.B.; GUIMARAES, S.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA-SEQUEIRAL, T. C. G.; BITTENCOURT, G. N.; NARDI, A. R. M.; RIBOLLA, P. E. M.; FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; TOSINI, F.; BELLA, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, n.103, 2015.

DI GIOVANNI, G. D.; BETANCOURT, W. Q.; HERNANDEZ, J.; ASSADIAN, N. W.; FLORES MARGEZ, J. P.; LOPEZ, E. J. Investigation of potential zoonanthroponotic transmission of cryptosporidiosis and giardiasis through agricultural use of reclaimed wastewater. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 16, n. 6, p. 405–418, 2006.

DIXON, B.; PARRINGTON, L.; COOK, A.; PINTAR, K.; POLLARI, F.; KELTON, D.; FARBER, J. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1–2, p. 20–26, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.032>>.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. **Water Research**, v. 114, p. 14–22, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>>.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. **Water Research**, v. 123, p. 96–112, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.042>>.

EINARSSON, E.; MA'AYEH, S.; SVENDSEN, S. G. An up-date on *Giardia* and giardiasis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 47–52, 2016.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 90–97, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.005>>.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: From land to sea. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 531–536, 2004.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1305–1322, 2000.

FENG, Y. XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110-140, 2011.

FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; LEAL, D. A. G. PARASITOLOGIA AMBIENTAL: MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO E DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM AMOSTRAS DE ÁGUA. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 2, p. 119–135, 2012. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/19320>>.

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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 43, n. 2, p. 109–111, 2001.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde Pública. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 9, p. 36-43, 2007.

FREGONESI, B. M.; SAMPAIO, C. D. F.; RAGAZZI, M. F.; TONANI, K. A. D. A.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Cryptosporidium and Giardia : challenges in public water supplies. **O Mundo da Saúde**, v. 36, n. 4, p. 602–609, 2012. Disponível em: <http://www.saocamilosp.br/pdf/mundo_saude/97/09.pdf>.

GALLAS-LINDEMANN, C.; SOTIRIADOU, I.; PLUTZER, J.; KARANIS, P. Prevalence and distribution of Cryptosporidium and Giardia in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. **Epidemiology and Infection**, n. 2013, p. 1–13, 2012a.

GAO, S.; ZHANG, M.; AMER, S.; LUO, J. Development of an immunomagnetic bead separation-coupled quantitative PCR method for rapid and sensitive detection of Cryptosporidium parvum oocysts in calf feces. p. 2069–2077, 2014.

GARGANO, J. W.; ADAM, E. A.; COLLIER, S. A.; FULLERTON, K. E.; FEINMAN, S. J.; BEACH, M. J. Mortality from selected diseases that can be transmitted by water – United States, 2003–2009. **Journal of Water and Health**, p. wh2017301, 2017. Disponível em: <<http://jwh.iwaponline.com/lookup/doi/10.2166/wh.2017.301>>.

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

HELENA, R.; PERALTA, S.; VELÁSQUEZ, J. N.; CUNHA, F. D. S.; PANTANO, M. L.; SODRÉ, F. C.; SILVA, S.; ASTUDILLO, O. G.; PERALTA, J. M.; CARNEVALE, S. Genetic diversity of Cryptosporidium identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina. v. 111, n. January, p. 30–36, 2016.

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

HILLMAN, A.; ASH, A.; ELLIOT, A.; LYMBERY, A.; PEREZ, C.; ANDREW THOMPSON, R. C. Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isoodon obesulus*). **International Journal for Parasitology Parasites and Wildlife**, v. 5, p. 110-115, 2016.

HOFSTRA, N.; BOUWMAN, A. F.; BEUSEN, A. H. W.; MEDEMA, G. J. Exploring global *Cryptosporidium* emissions to surface water. **Science of the Environment**. v. 443, p. 10-19, 2013.

HUNTER, P. R.; THOMPSON, R. C. A. The zoonotic transmission of Giardia and Cryptosporidium. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11–12, p. 1181–1190, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010-2012-2015. Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=sp>>. Acesso em: 08 de outubro de 2017.

IMRE, K.; SALA, C.; MORAR, A.; ILIE, M. S.; PLUTZER, J.; IMRE, M.; HORA, F. Ş.; BADEA, C.; HERBEI, M. V.; GHEORGHE, D. Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp . as contaminant protozoa of the main rivers of western Romania : genetic characterization and public health potential of the isolates. **Environ Sci Pollut Res for**, 2017.

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

KOEHLER, A. V.; JEX, A. R.; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; GASSER, R. B. Giardia/giardiasis - A perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 280–289, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.009>>.

KOH, W.; CLODE, P. L.; MONIS, P.; THOMPSON, R. C. A. Multiplication of the waterborne pathogen Cryptosporidium parvum in an aquatic biofilm system. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 270, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3848567&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HOORFAR, J.; COOK, N.; MALORNY, B.; WAGNER, M.; DE MEDICI, D.; ABDULMAWJOOD, A.; FACH, P. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. **J. Clin. Microbiol.**, vol. 41, 2003.

KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S. O.; SUR, D.; BREIMAN, R. F.; FARUQUE, A. S. G.; ZAIDI, A. K. M.; SAHA, D.; ALONSO, P. L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J. B.; OMORE, R.; OUNDO, J. O.; HOSSAIN, A.; DAS, S. K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ADEGBOLA, R. A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M. J.; AKINSOLA, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C. E.; MINTZ, E. D.; BERKELEY, L. Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-BROWNE, R. M.; LEVINE, M. M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209–222, 2013.

HUCK, P. M.; COFFEY, B. M. The importance of robustness in drinking-water systems. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 67, p. 1581-1590, 2004.

LAL, A.; BAKER, M. G.; HALES, S.; FRENCH, N. P. Potential effects of global environmental changes on cryptosporidiosis and giardiasis transmission. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 83–90, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.10.005>>.

LECHEVALLIER, M. W.; GIOVANNI, G. D. Di; JENNIFER, L.; BUKHARI, Z.; BUKHARI, S.; ROSEN, J. S.; FREY, M. M.; CLANCY, J. L.; SOBRINHO, J. Comparison of Method 1623 and Cell Culture-PCR for Detection of Cryptosporidium spp . in Source Waters Comparison of Method 1623 and Cell Culture-PCR for Detection of Cryptosporidium

spp. in Source Waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 971–979, 2003.

LENDNER, M.; DAUGSCHIES, A. Cryptosporidium infections: molecular advances. **Parasitology**, v. 141, n. 11, p. 1511–1532, 2014. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182014000237>.

LI, N.; XIAO, L.; CAMA, V. A.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R. H.; GUO, M.; FENG, Y. Genetic recombination and Cryptosporidium hominis virulent subtype IbA10G2. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 10, p. 1573–1582, 2013.

LOPEZ-ROMERO, G.; QUINTERO, J.; ASTIAZARÁN-GARCÍA, H.; VELAZQUEZ, C. Host defences against Giardia lamblia. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 8, p. 394–406, 2015.

MEAD, J. R. Prospects for immunotherapy and vaccines against *Cryptosporidium*. **Human Vaccines & Immunotherapeutic**, v.10, n. 6, p. 1505-1513, 2014.

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

MIYAMOTO, Y.; ECKMANN, L. Drug development against the major diarrhea-causing parasites of the small intestine, *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Frontiers in Microbiology**, 2015.

MONIS, P. T.; CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. A. Variation in Giardia: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 93–100, 2009.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Molecular systematics of the parasitic protozan *Giardia intestinalis*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 1135-1144, 1999.

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

NICHOLS, R. A. B.; CAMPBELL, B. M.; SMITH, H. V. Molecular Fingerprinting of *Cryptosporidium* Oocysts Isolated during Water Monitoring. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5428-5435, 2006.

NICHOLS, R. A. B.; CONNELLY, C. B.; SULLIVAN, C. B.; SMITH, H. V. Identification of *Cryptosporidium* Species and Genotypes in Scottish Raw and Drinking Waters during a One-Year Monitoring Period. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 17, p. 5977-5986, 2010.

NISHI, L.; BAESSO, M. L.; SANTANA, R. G.; FREGADOLLI, P.; FALAVIGNA, D. L. M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Investigation of cryptosporidium spp. and giardia spp. in a public water-treatment system. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n. 5, p. 221–228, 2009.

ONGERTH, J. E. The concentration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water - The role and importance of recovery efficiency. **Water Research**, v. 47, n. 7, p. 2479–2488, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.015>>.

ONGERTH, J. E.; SAAED, F. M. A. Distribution of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia*

cysts in water above and below the normal limit of detection. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 467–471, 2013.

PLUTZER, J.; KARANIS, P.; DOMOKOS, K.; TÖRÖKNÉ, A.; MÁRIALIGETI, K. Detection and characterisation of Giardia and Cryptosporidium in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, n. 5–6, p. 524–533, 2008.

PLUTZER, J.; TAKÓ, M. H.; MÁRIALIGETI, K.; TÖRÖKNÉ, A.; KARANIS, P. First investigations into the prevalence of Cryptosporidium and Giardia spp. in Hungarian drinking water. **Journal of Water and Health**, v. 5, n. 4, p. 573–584, 2007.

PRYSTAJECKY, N.; HUCK, P. M.; SCHREIER, H.; ISAAC-RENTON, J. L. Assessment of Giardia and Cryptosporidium spp. as a microbial source tracking tool for surface water: Application in a mixed-use watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2328–2336, 2014.

RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and Infection**, v.6, p. 773–785, 2004.

RAMO, A.; DEL CACHO, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; QUÍLEZ, J. Occurrence and genetic diversity of Cryptosporidium and Giardia in urban wastewater treatment plants in north-eastern Spain. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 628–638, 2017.

ROSADO-GARCIA, F. M.; GUERREO-FLORES, M.; KARANIS, G.; HINOJOSAB, M. C.; KARANIS, P. Water-borne protozoa parasites: The Latin American perspective. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 2017.

RYAN, U.; HIJAWI, N. New developments in Cryptosporidium research. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 6, p. 367–373, 2015.

RYAN, U. N. A.; FAYER, R.; XIAO, L. Cryptosporidium species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1667–1685, 2014. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182014001085>.

RYAN, U.; PAPARINI, A.; MONIS, P.; HIJAWI, N. It's official – Cryptosporidium is a gregarine: What are the implications for the water industry? **Water Research**, v. 105, p. 305–313, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.013>>.

SATO, M. I. Z.; GALVANI, A. T.; PADULA, J. A.; NARDOCCI, A. C.; LAURETOO, M. S.; RAZZOLINI, M. T. P.; HACHICH, E. M. Assessing the infection risk of Giardia and Cryptosporidium in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Science of the Total Environment**. v. 442, p. 389–396, 2013.

SHIRLEY, D.-A. T.; MOONAH, S. N.; KOTLOFF, K. L. Burden of disease from cryptosporidiosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 555–563, 2012. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001432-201210000-00012>>.

SPRONG, H.; CACCIÒ, S. M.; van der GIESSEN, J. W. Identification of zoonotic genotypes

of *Giardia duodenalis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 558, 2009.

SIQUEIRA-CASTRO, I. C. V.; GREINERT-GOULART, J. A.; BONATTI, T. R.; YAMASHIRO, S.; FRANCO, R. M. B. First report of predation of *Giardia* sp. cysts by ciliated protozoa and confirmation of predation of *Cryptosporidium* spp. oocysts by ciliate species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p. 11357–11362, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-016-6689-y>>.

STAGGS, S. E.; BECKMAN, E. M.; KEELY, S. P. MACKWAN, R.; WARE, M. W.; MOYER, A. P.; FERRETTI, J. A.; SAYED, A.; XIAO, L.; VILLEGAS, E. N. The applicability of Taqman-based quantitative real-time PCR assays for detecting and enumerating *Cryptosporidium* spp. oocysts in the environment. **Plos One**, v. 8, n. 6, 2013.

SUNNOTEL, O.; SNELLING, W. J.; XIAO, L.; MOULE, K.; MOORE, J. E.; MILLAR, B. C.; DOOLEY, J. S. G.; LOWERY, C. J. Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3285–3291, 2006.

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

THOMPSON, R. C. A. *Giardia* - from genome to proteome. **Advances in Parasitology**, v. 78, p. 57-95, 2012.

THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, 2016.

UNICEF; WHO. Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene. p. 66 pp., 2017. Disponível em: <<http://www.wipo.int/amc/en/%0Ahttp://www.wipo.int/amc/en/>>.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. **Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration /IMS/FA**. 1999. United States: United States Environmental Protection Agency, 1999.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration /IMS/FA**. 2005. United States: United States Environmental Protection Agency, 2005.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. ***Cryptosporidium* genotyping method for regulatory microscope slides**. 2010. United States: United States Environmental Protection Agency, 2010.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. **Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration /IMS/FA**. 2012. United States: United States Environmental Protection Agency, 2012.

VERWEIJ, J. J.; BLANGE, R. A.; TEMPLETON, K.; SCHINKEL, J.; BRIENEN, E. A. T.; ROOYEN, M. A. A. Van; LIESHOUT, L. Van; POLDERMAN, A. M. Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1220–1223, 2004.

VEIGA, P. B. D. O impacto do uso do solo na contaminação por agrotóxicos das águas superficiais de abastecimento público. [Dissertação de mstrado], 2017.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 80–89, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>>.

XIAO, S; AN, W; CHEN, Z; ZHANG, D; YU, J; YANG, M. The burden of drinking water-associated cryptosporidiosis in China: The large contribution of the immunodeficient population identified by quantitative microbial risk assessment. **Water Research**. v. 46, p. 4272-4280, 2012.

XIAO, S.; YIN, P.; ZHANG, Y.; HU, S. Occurrence of Cryptosporidium and Giardia and the Relationship between Protozoa and Water Quality Indicators in Swimming Pools. **Korean J Parasitol**, v. 55, n. 2, p. 129–135, 2017.

WARE, M. W.; KEELY, S. P.; VILLEGAS, E. N. Development and evaluation of an off-the-slide genotyping technique for identifying Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts directly from US EPA Method 1623 slides. **Journal of Applied Microbiology**. v. 115, p. 298-309, 2013.

WIDERSTRÖM, M.; SCHÖNNING, C.; LILJA, M.; LEBBAD, M.; LJUNG, T.; ALLESTAM, G.; FERM, M.; BJÖRKHOLM, B.; HANSEN, A.; HILTULA, J.; LANGMARK, J.; LÖFDAHL, M.; OMBERG, M.; REUTERWALL, C.; SAMUELSSON, E.; WIDGREN, K.; WALLENSTEN, A.; LINDH, J. Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, 2014.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater**. World Health Organization. vol 2. Wastewater use in Agriculture. França, 2006.

YU, X.; VAN DYKE, M. I.; PORTT, A.; HUCK, P. M. Development of a direct DNA extraction protocol for real-time PCR detection of *Giardia lamblia* from surface water. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 661-668, 2009.

ANEXO

Anexo 1 – Esquema de ensaio para detecção e quantificação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* – USEPA 1623.1

Quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* a partir de amostras de água - Filta-Max® pelo método 1623.1/EPA 2012