Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Detecção Molecular de *Giardia* spp. em
Amostras de Esgoto Bruto Provenientes do Estado de São
Paulo e da cidade de Lima, Peru.

Francisco Miroslav Ulloa Stanojlović

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública

Orientador(a): Prof^a. Associada Maria Helena Matté

São Paulo

2014

Detecção Molecular de *Giardia* spp. em
Amostras de Esgoto Bruto Provenientes do Estado de São
Paulo e da cidade de Lima, Peru.

Francisco Miroslav Ulloa Stanojlović

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública

Orientador(a): Prof^a. Associada Maria Helena Matté

São Paulo

2014

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Miroslava e Victor

Por su amor, constante incentivo, comprensión, confianza y por haberme
inculcado importantes valores y enseñanzas que me dan las bases para quien aspiro
llegar a ser .

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos (processo N° 190677/2011-2) concedida.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento do projeto (processo N° 2010/50797-4), por meio do qual foi possível a realização do presente trabalho.

À Professora Maria Helena Matté, por me ter aceitado como seu aluno, pelos ensinamentos, sugestões e pelo incentivo ao meu desenvolvimento profissional.

À Ronalda Silva de Araújo, pelas contribuições intelectuais e ajuda na realização do trabalho laboratorial.

À equipe do Laboratório de Saúde Pública: Milena, Luisa, Lívia, Flavia, Rafael, Mariana e Samara, pela ajuda nas diferentes etapas do trabalho.

À Miriam Lopes Silva, pela amizade e por sempre ter disposição em me ajudar, especialmente durante a minha fase de adaptação e pela revisão do português do trabalho.

À Bruna “Bru” Aguiar, pelas risadas, piadas e principalmente pela amizade (“é nozes!”), como também pelo auxílio na realização dos procedimentos laboratoriais.

À Profa. Dra. Maria Tereza Pepe Razzolini, pela atenção, sugestões, ensinamentos e disposição dispensados.

À Dra. Maria Inês Zanolli Sato pelo auxílio, sugestões, ensinamentos e disposição indispensável para a conclusão da dissertação.

À Elayse Maria Hachich, pelo fornecimento das amostras provenientes da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental).

Ao Prof. Dr. Armando Hung da Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia da Universidade de Cayetano Heredia, Lima-Peru, por permitir utilizar o laboratório de biologia molecular para o processamento das amostras.

À Luis “Lucho” M. Jara pela amizade e ajuda no processamento e envio das amostras.

À Sra. Juana Arzola Guerrero, de SEDAPAL (Servicio de Agua Potable y Alcantarillado de Lima), por me ajudar com toda a papelada e no estabelecimento de uma importante parceria para o desenvolvimento do estudo.

À SEDAPAL, e em especial à equipe da estação de tratamento de esgoto de Carapongo em Lima-Peru, através da engenheira Sara Sarmiento, da bióloga Sofía del Pilar Basilio Ascanio, e do técnico Leon, entre outros, pela ajuda e facilidades oferecidas na coleta de amostras.

À minha turma de mestrado Rafaela, Marina e Vanessa, pela grande parceria no início desta fase da minha vida, que me ajudou muito na minha adaptação.

Aos meus pais, Victor e Miroslava, a minha irmã, Katiushka, e ao meu irmão, A. Nicholas, por estarem comigo em todos os momentos, pelo amor, carinho, incentivo e por acreditar sempre em mim.

Aos meus familiares por torcer por meu sucesso, apesar da distância.

À Eliana “Titi” Masuda, quero te agradecer especialmente pelo amor, parceria, paciência, carinho, incentivo, risadas, sugestões, por me acalmar nos momentos difíceis, entre outras coisas. Enfim, por todo o inestimável apoio, sem o qual teria sido muito mais difícil à conclusão deste trabalho.

Aos amigos da faculdade e da vida em especial a Rosario e a Agda, como também Claudia, Pamela, Carolina, Alexandra, Fredy, Rosalina e Paloma, entre outros, pelo interesse e encorajamento no desenvolvimento deste estudo.

Meu sincero agradecimento a todas aquelas pessoas que direta ou indiretamente me incentivaram a persistir na realização e conclusão da dissertação!

“Ever tried. Ever failed. No matter. Try Again. Fail again. Fail better.”

— Samuel Beckett (1906 —1989)

“Science, my lad, is made up of mistakes, but they are mistakes which it is useful to make, because they lead little by little to the truth.”

“Reality provides us with facts so romantic that imagination itself could add nothing to them.”

— Jules Verne (1828 —1905)

RESUMO

Ulloa-Stanojlović FM. **Deteção molecular de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto provenientes do Estado de São Paulo e da cidade de Lima, Peru.** [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2013.

Introdução – *Giardia intestinalis* é um dos principais protozoários flagelados causadores de diarreia em humanos e animais, sendo um micro-organismo re-emergente, responsável por vários surtos de veiculação hídrica em nível mundial, razão pela qual tem merecido atenção das autoridades de Saúde Pública, e deve ser avaliado e monitorado, principalmente devido ao seu impacto negativo na qualidade do abastecimento público, em particular através do esgoto. Através de técnicas de biologia molecular é possível caracterizar e genotipar cistos presentes no esgoto, e identificar a circulação dos agrupamentos A e B, patogênicos para o homem. Neste estudo foram avaliadas amostras de esgoto bruto de cidades cosmopolitas da América Latina, no Estado de São Paulo, e em Lima, Peru. **Objetivos** – Detectar através da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) a presença de *G. intestinalis* e os agrupamentos A e B, de importância para a saúde humana, em amostras de esgoto bruto provenientes do Estado de São Paulo, Brasil e de Lima, no Peru. **Material e Métodos** – Um total de 18 amostras de esgoto bruto provenientes de portos, aeroportos e estações rodoviárias, com alto trânsito de pessoas de cinco municípios do estado de São Paulo foram coletadas pela técnica de Moore. Adicionalmente, 10 amostras provenientes de dois bairros (urbano e semi-urbano) na entrada da ETE de Carapongo, Lima, no Peru foram coletadas e concentradas por centrifugação. O DNA genômico foi extraído utilizando kit comercial (*QIAamp DNA Stool Mini Kit*[®] - Qiagen, USA). A amplificação do gene *gdh* (glutamato desidrogenase) de *Giardia*, foi realizada por *nested* PCR como descrito por CACCIÓ *et al.*, 2008, e *G. intestinalis* e seus agrupamentos A e B, por meio de reações de reamplificação por PCR (*rePCR*). **Resultados** – No Estado de São Paulo 61,1% (11/18) das amostras coletadas foram consideradas positivas para *G. intestinalis*, e na cidade de Lima 60% (6/10) das amostras foram positivas para *G. intestinalis*. Os

agrupamentos A e B foram obtidos em ambos os países. **Conclusões** – Os achados indicam que na cidade de Lima e no estado de São Paulo, cistos de *Giardia* associados à giardíase humana estão circulando no esgoto bruto, de modo que a descarga dessa matriz em águas superficiais pode representar perigo para a saúde. Além disso, o diagnóstico proposto possibilita a caracterização molecular de *Giardia* presente em amostras de esgoto bruto sem a necessidade de sequenciamento ou clonagem, favorecendo as rotinas laboratoriais.

Palavras-chave: *Giardia intestinalis*; biologia molecular; Genotipagem; protozoários re-emergentes; Saúde pública.

ABSTRACT

Ulloa-Stanojlović FM. **Molecular detection of *Giardia* spp. in samples of raw wastewater from the State of São Paulo and the city of Lima, Peru.** [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2013.

Introduction – *Giardia intestinalis* is one of the major flagellated protozoans that cause diarrhea in humans and animals, and a re-emerging microorganism, responsible for several waterborne outbreaks worldwide, therefore it has received attention from public health authorities, and should be evaluated and monitored mainly due to their negative impact on the quality of public supply, in particular through the sewage. Through molecular biology techniques it is possible to characterize and to genotype cysts present in wastewater, and to identify the circulation of Assemblages A and B, that are pathogenic to humans. In this study were evaluated samples of raw wastewater from cosmopolitan cities in Latin America, in the State of São Paulo and in Lima, Peru.

Objectives – Detect, through the technique of polymerase chain reaction (PCR), the presence of *G. intestinalis* and its Assemblages A and B, of importance to human health, in samples of raw wastewater from the State of São Paulo, Brazil and Lima, Peru.

Material and Methods – A total of 18 samples of raw wastewater from harbors, airports and bus stations, with high traffic of people from five municipalities of the state of São Paulo were collected by the technique of Moore. In addition, 10 samples from two districts (urban and semi-urban) at the entrance of the WWTP Carapongo, Lima, Peru, were collected and subjected to centrifugation. Genomic DNA was extracted by using a commercial kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit ® - Qiagen, USA). The amplification of the *Giardia* *gdh* gene (glutamate dehydrogenase) was performed by nested PCR as described by Cacció *et al.*, 2008 and *G. intestinalis* and its Assemblages A and B, through PCR reamplification reactions (rePCR). **Results** – In the State of São Paulo 61.1% (11/18) of the collected samples were positive for *G. intestinalis*, and in the city of Lima 60% (6/10) of the samples were positive for *G. intestinalis*. Assemblages A

and B were obtained in both countries. **Conclusions** – The findings indicated that in the city of Lima and in the state of São Paulo, *Giardia* cysts associated with human giardiasis are circulating in raw wastewater, so that the discharge of this matrix in surface waters may pose a health hazard. Furthermore, the proposed diagnostic enables the molecular characterization of *Giardia* present in raw wastewater samples without the need of sequencing or cloning, favoring laboratory routines.

Keywords: *Giardia intestinalis*; molecular biology; genotyping; protozoa re-emerging; Public Health.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1.	HISTÓRICO.....	20
2.2.	CICLO DE VIDA, TRANSMISSÃO E SINTOMATOLOGIA	25
2.3.	TAXONOMIA.....	31
2.4.	EPIDEMIOLOGIA E OCORRÊNCIA NO AMBIENTE.....	34
2.4.1.	Brasil.....	40
2.4.1.1.	<i>Epidemiologia no Brasil.....</i>	40
2.4.1.2.	<i>Ocorrência no ambiente no Brasil.....</i>	42
2.4.2.	Peru.....	45
2.4.2.1.	<i>Epidemiologia no Peru.....</i>	45
2.4.2.2.	<i>Ocorrência no ambiente no Peru.....</i>	47
2.5.	DIAGNOSTICO.....	48
2.6.	BIOLOGIA MOLECULAR EM ESTUDOS DE <i>Giardia intestinalis</i>	50
2.7.	COBERTURA NO TRATAMENTO E COLETA DE ESGOTO.....	55
2.7.1.	Brasil.....	55
2.7.2.	Peru.....	56

2.8	AÇÕES REGULATÓRIAS.....	57
3.	JUSTIFICATIVA.....	61
4.	OBJETIVOS.....	62
4.1.	OBJETIVO GERAL.....	62
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	62
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
5.1.	DESCRIÇÃO DOS PONTOS E MÉTODO DE AMOSTRAGEM.....	63
5.1.1.	SÃO PAULO.....	63
5.1.1.1	<i>Preparo e concentração das amostras de esgoto</i>	64
5.1.2.	LIMA.....	65
5.1.2.1	<i>Preparo e concentração das amostras de esgoto.....</i>	69
5.2.	EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE ESGOTO.....	70
5.3.	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE – PCR.....	71
5.3.1.	Reações para detecção de <i>G. intestinalis</i>	71
5.3.2.	Confirmação da presença de <i>G. intestinalis</i> e detecção dos agrupamentos A e B de <i>G. intestinalis</i>	74
5.3.2.1.	<i>Condições e ciclos da Reação para confirmação da presença de G. intestinalis.....</i>	74
5.3.2.2	<i>Condições e ciclos de Reação para confirmação da presença de agrupamentos A e B de G. intestinalis.....</i>	75

5.4.	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	77
5.5.	CONTROLE POSITIVOS E NEGATIVOS.....	77
6.	RESULTADOS	79
6.1.	DETECÇÃO DE <i>Giardia</i> POR PCR.....	79
6.2.	DETECÇÃO DOS AGRUPAMENTOS A e B DE <i>G.intestinalis</i>	83
7.	DISCUSSÃO.....	86
8.	CONCLUSÕES.....	96
9.	RECOMENDAÇÕES.....	97
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
	ANEXOS.....	132
	Anexo 1- Declaração de anuência de pesquisa (Peru).....	132
	CURRICULO LATTES ALUNO.....	133
	CURRICULO LATTES ORIENTADORA.....	134

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Classificação atual e proposição feita por MONIS <i>et al.</i> (2009) para o gênero <i>Giardia</i> e os agrupamentos de <i>G. intestinalis</i> de acordo com seus hospedeiros.....	32
Quadro 2 -	Pesquisas para detecção de cistos <i>Giardia</i> sp. em amostras de esgoto bruto, segundo procedência, tipo de detecção e caracterização molecular.....	54
Quadro 3 -	Evolução histórica da Legislação para água para consumo humano no Brasil.....	59

Quadro 4 -	Pontos de coleta e identificação de amostras de esgoto bruto no estado de São Paulo.....	64
Quadro 5 -	Pontos de coleta de esgoto bruto na cidade de Lima (Peru).....	69
Quadro 6 -	Lista de iniciadores utilizados no presente para a amplificação de fragmento do gene <i>gdh</i> de <i>Giardia</i>	73
Quadro 7 -	Amostras controles utilizadas nesse estudo para detecção de <i>Giardia intestinalis</i> e agrupamentos A e B.....	78
Quadro 8 -	Resultados obtidos para detecção de <i>Giardia intestinalis</i> e dos agrupamentos A e B para amostras de esgoto provenientes de dois bairros da cidade de Lima, Peru.....	81
Quadro 9 -	Resultados obtidos para detecção de <i>Giardia intestinalis</i> e dos agrupamentos A e B para amostras de esgoto bruto (Mecha de Moore), Estado de São Paulo, Brasil.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Esquema de trofozoíto e cisto da <i>Giardia</i> spp.....	25
Figura 2 -	Ciclo de vida da <i>Giardia</i> spp.....	28
Figura 3 -	Mapa administrativo do estado de São Paulo, Brasil.....	63
Figura 4 -	Mecha empregada na técnica de Moore.....	65
Figura 5 -	Mapa da cidade de Lima Metropolitana, Peru.....	66
Figura 6 -	Vista da ETE (ou PTAR) de Carapongo – SEDAPAL, Lima.....	67
Figura 7 -	A- Vista da comunidade de Huaycán (Ate); B- ponto de coleta na ETE.....	68
Figura 8 -	A- Vista do bairro de Chosica; B- ponto de coleta na ETE.....	68

Figura 9 -	Fluxograma da sequência das PCRs realizadas até a confirmação da presença de <i>G. intestinalis</i> , agrupamentos A ou B.....	76
Figura 10 -	Fluxograma demonstrando a sequência das PCRs realizadas até a confirmação da presença de <i>G. intestinalis</i> , agrupamentos A ou B	80
Figura 11 -	Eletroforese em gel de Agarose a 3% contendo os fragmentos obtidos da <i>rePCR</i> do gene <i>gdh</i> a partir da <i>Nested PCR</i> descrita por CACCIÒ <i>et al.</i> (2008) de <i>G. intestinalis</i> (A), agrupamento A de <i>G. intestinalis</i> (B) e agrupamento B de <i>G. intestinalis</i> (C).....	84
Figura 12 -	Frequências de amostras de <i>G. intestinalis</i> positivas segundo os agrupamentos A e B detectados segundo local de coleta.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>β giardina</i> –	beta giardina
BSA –	Soro albumina bovina
CETESB –	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
DNTP –	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
<i>Efl α</i> –	Fator de elongação 1 alfa
EDTA –	Ácido etileno diamoni tetracético
ELISA –	Enzyme linked inmunosorbant assay
ETE –	Estação de tratamento de esgoto
FSP –	Faculdade de Saúde Pública
<i>Gdh</i> –	Glutamato desidrogenase
IBGE –	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFA –	Ensaio de imunofluorescência
<i>IGS</i> –	Intergenic spacer
IMS –	Separação imunomagnética
Mb –	Megabases
µg –	Micrograma
µl –	Microlitro
ML –	Mililitro
µm –	Micrômetro
MINSA –	Ministério de Salud (Peru)
Pb –	Pares de base
PCR –	Reação em cadeia pela polimerase
PVP –	Polivinilpirrolidona
qPCR –	PCR quantitativa
rePCR –	Reamplificação por PCR
RFLP –	Restriction fragment length polymorphism
RNA –	Ácido ribonucleico
Sabesp –	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SEDAPAL –	Servicio de Agua Potable y Alcantarillado de Lima
SNP –	Single nucleotide polymorphism
<i>SSU rRNA</i> –	Small subunit ribosomal RNA
rDNA –	DNA ribosomal
rRNA –	RNA ribosomal
<i>Tpi</i> –	Triose fosfato isomerase

Taq – *Thermus aquaticus*

UPCH – Universidad Peruana Cayetano Heredia

USEPA – United States Environmental Protection Agency

USP – Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por protozoários parasitas de veiculação hídrica estão amplamente disseminadas tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (KARANIS *et al.*, 2007; BALDURSSON e KARANIS, 2011).

Essas doenças parasitárias são umas das principais causas dos 4 bilhões de casos estimados de diarreia relatados anualmente, que levam à 1,6 milhões de mortes (OMS, 2002) e 62,5 milhões de anos potenciais de vida perdidos (APVP¹) (Disability Adjusted Life Years -DALY) no mundo (WRIGHT e GUNDRY, 2009).

A giardíase é uma das doenças parasitárias mais importantes transmitidas pela água, e alimentos contaminados, por práticas de higiene inadequada, com risco zoonótico, mais frequentemente diagnosticada em conjunto com a criptosporidiose. É um dos problemas de saúde pública mais importante dos serviços públicos nos países em desenvolvimento (HUNTER e THOMPSON, 2005; COTTON *et al.*, 2011).

O esgoto é uma importante fonte de microrganismos patogênicos no ambiente, e pode conter também elevada concentração de cistos de *Giardia*, disseminando esses parasitas nos corpos hídricos e impactando sua qualidade, principalmente aqueles destinados ao abastecimento público. Este parasita é preocupante porque apresenta certas características como baixa dose infectante e elevada resistência aos tratamentos convencionais utilizados nas estações de tratamento de esgoto, o que pode representar risco para a saúde humana, considerando os usos múltiplos da água (água de consumo humano, recreacional e reúso) (KARANIS *et al.*, 2007).

Os Ministérios da Saúde, tanto no Brasil quanto no Peru, preocupados com a circulação desses protozoários no meio ambiente, têm focado o problema em seus últimos regulamentos da qualidade da água para consumo humano. A Portaria 2914 de

¹APVP é um indicador ou medida da carga global de doenças, que quantifica o número de anos perdidos devido a problemas de saúde, incapacidade ou morte prematura (MURRAY e LOPEZ, 1997).

de 2011 do Ministério de Saúde que trata de água para consumo humano no Brasil requer monitoramento de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. para mananciais com média geométrica anual maior ou igual a 1000 UFC de *E. coli* em 100 mL. No regulamento de água de consumo humano no Peru, é preconizada a ausência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (MINSa, 2010; MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2011).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O protozoário parasita *Giardia* foi observado pela primeira vez por Anthony van Leeuwenhoek (1681), mas somente em 1859 foi descrito detalhadamente por Vilém Lambl, denominando-o como *Cercomonas intestinalis*. O termo *Lamblia intestinalis* foi criado em 1888 por Raphael A. Émile Blanchard, porém foi em 1915, que o parasitologista americano Charles Wardell Stiles renomeou esse protozoário como *Giardia lamblia* (FORD, 2005).

Inicialmente esse protozoário era considerado como um agente comensal humano, até que durante a primeira guerra mundial (1914-1918), FANTHAM e PORTER (1916) verificaram que os cistos obtidos de fezes de soldados ingleses com diarreia causavam sintomas semelhantes quando eram fornecidos a animais de laboratório. Em 1921, Clifford Dobell sugeriu que o parasita *Giardia* poderia ser um patógeno e em 1926, Reginald Miller, um médico inglês, demonstrou que algumas crianças infectadas com o parasita sofriam de má absorção, enquanto outras eram portadoras assintomáticas (COX, 2002). Finalmente em 1954 RENDTORFF apresentou fortes evidências sobre a relação entre esse parasita e a doença clínica.

Apesar de o protozoário parasita *Giardia* ter sido identificado pela primeira vez há mais de 200 anos, existem estudos que demonstraram que este causava agravos na população humana há mais de 3.000 anos (ORTEGA e BONAVIA, 2003).

Giardia é um protozoário parasita flagelado intestinal que pode ser encontrado em quase todas as classes de vertebrados, e é responsável pela doença conhecida como giardíase (MONIS *et al.*, 2009).

Trata-se de um micro-organismo microaerófilo, que possui características não usuais, como a presença de dois núcleos semelhantes diplóides transcricionalmente ativos; ausência de mitocôndrias e peroxissomos, e uma única organela de ligação, o disco ventral de sucção ou adesivo (ADAM, 2001; THOMPSON e MONIS, 2004; THOMPSON, 2004).

Durante muito tempo, foram descritas e nomeadas mais de 40 espécies de *Giardia* principalmente com base na ocorrência em um determinado hospedeiro. No entanto, em 1952, Filice (appud ADAM, 2001) propôs uma nova divisão, baseada em características morfológicas distinguíveis por meio de microscópio óptico, mais especificamente, a forma dos corpos medianos e o formato e comprimento do trofozoíto. Deste modo, três espécies passaram a ser reconhecidas: *Giardia intestinalis* (sinônimo: *G. lamblia* ou *G. duodenalis*), *G. agilis* e *G. muris*.

No final dos anos de 1970, foram relatados surtos de giardíase de veiculação hídrica, e que foram relacionados à presença de castores nas proximidades de reservatórios de água (SHAW *et al.*, 1977; DAVIES e HIBLER, 1979; DYKES *et al.*, 1980). A partir de então, como base em resultados dos dados epidemiológicos, o protozoário *Giardia* passou a ser considerado como uma parasita zoonótico pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 1981).

No final da década dos anos 1980, com o emprego da microscopia eletrônica de varredura, foram descritas novas espécies de *Giardia* em aves: *G. psittaci* e *G. ardeae* (ERLANDSEN e BEMRICK, 1987; ERLANDSEN *et al.* 1990). Ainda nessa época, com base nas diferenças das sequências do fragmento *16S rRNA* de diferentes espécies de *Giardia* quando comparadas com *G. intestinalis* de origem humana, foi descrita uma

nova espécie proveniente de roedores (camundongo e rato almiscarado): *G. microti* (van KEULEN *et al.*, 1998; ADAM, 2001).

Paralelamente surgiram estudos sobre a transmissão cruzada de *Giardia*, onde os autores buscavam esclarecer a especificidade da infecção desse parasita e seu potencial zoonótico. No estudo realizado por NASH *et al.* em 1987, os autores buscaram reproduzir a infecção em dois grupos de voluntários humanos com duas cepas de *G. intestinalis*, GS/M e Isr pertencentes ao *National Institute of Health* (NIH), também provenientes de humanos, mas somente observaram infecção com a cepa GS/M.

No estudo conduzido por ERLANDSEN *et al.* (1988) os autores infectaram castores e ratos almiscarados com isolados de *Giardia* provenientes de humanos para observar a ocorrência de infecção nos animais e observaram que as doses responsáveis pela infecção eram elevadas, situação que dificilmente ocorreria na natureza. Apesar dos autores terem utilizado um isolado não caracterizado de *Giardia*, estes concluíram que apenas hospedeiros humanos teriam importância na disseminação de surtos de giardíase.

As dificuldades de classificação deste parasito levaram à utilização de abordagens como a determinação das isoenzimas e análise do DNA (THOMPSON, 2004). A análise eletroforética de isoenzimas é um método importante que avalia as formas moleculares variadas de uma mesma enzima produzida por diferentes membros de uma espécie de organismo. O método fornece informações valiosas para o estudo da diversidade genética, porém a dificuldade na obtenção de dados está na necessidade de cultura “in vitro” dos organismos (THOMPSON, 2004).

ANDREWS *et al.* (1989) utilizaram o método de análise eletroforética de isoenzimas para aumentar o número de marcadores genéticos de *G. intestinalis* provenientes de humanos. Os autores identificaram a presença de quatro grupos genéticos de características alélicas diferentes dentro das amostras estudadas, os quais sugeriram tratar-se de um complexo de espécies.

A maioria das espécies de *Giardia* está adaptada a um determinado tipo de hospedeiro, porém *G. intestinalis* é a exceção, pois infecta várias espécies de mamíferos. A aplicação de procedimentos de análise de DNA em estudos com esta espécie, em conjunto com técnicas como a relatada anteriormente revelaram a diversidade genética

intra-específica existente nesse protozoário parasita (THOMPSON, 2004; APPELBEE *et al.*, 2005).

NASH *et al.* (1985) avaliaram as proteínas de superfície de isolados clínicos de *Giardia* humanas e animais, as quais foram comparadas e analisadas com os padrões de bandas de DNA previamente estabelecidos. Os diferentes padrões genéticos encontrados foram agrupados em três grupos (1,2 e 3) de acordo com as suas similaridades.

HOMAN *et al.* (1992) avaliaram isolados clínicos de *Giardia* procedentes da Polônia e da Bélgica os quais foram submetidos a análise de isoenzimas. Os isolados obtidos dos indivíduos da Bélgica e Polônia exibiam padrões individuais de isoenzimas, que após a análise molecular levou à separação de todos os isolados em dois grupos principais, nomeados como "Polonês" e "Belga".

MAYRHOFER *et al.* (1995), na Austrália, avaliaram isolados de *G. intestinalis* que foram analisados em diferentes *loci* enzimáticos e comparados com *G. muris* e um isolado de felino. Os isolados de *G. intestinalis* demonstraram ser extremamente heterogêneos, mas conseguiram ser agrupados em dois grandes conjuntos genéticos (A e B), separados por diferenças alélicas fixas em cerca de 60% dos *loci* examinados.

Os estudos citados anteriormente serviram como base para uma nova classificação dos diferentes grupos de *G. intestinalis*. Os grupos de *G. intestinalis*, na América do Norte foram denominados com números de 1 a 3; na Europa, como "Polonês" e "Belga" e na Austrália como *Assemblages* ou agrupamentos A e B.

MONIS *et al.* (1996), avaliaram isolados humanos e animais de *G. intestinalis* por meio de análise do gene glutamato desidrogenase (*gdh*) amplificando com ajuda de PCR e examinando com enzimas de restrição (*Restriction fragment length polymorphism* - RFLP), e observaram que os isolados pertencentes aos grupos "Polonês", 1, 2 e *Assemblage* A foram equivalentes, e os grupos "Belga", 3 e o *Assemblage* B tinham também elevada correspondência.

THOMPSON *et al.* (2000), salientam que o termo *Assemblage* ou agrupamento é o que melhor reflete as diferenças de cada grupo de uma coleção de parasitos isolados, e que não estão limitados a nenhuma localidade geográfica particular.

THOMPSON (2004) em sua revisão destaca que os isolados do *Assemblage A* podem ser agrupados em dois “clusters” ou subgrupos diferentes, AI que pode agrupar uma mistura de isolados animais estreitamente relacionados e isolados humanos geograficamente disseminados, e que apresenta potencial zoonótico. Em contraste, o subgrupo AII consiste inteiramente de isolados humanos. Enquanto, os isolados do *Assemblage B* compreende dois subgrupos, III e IV, sendo o último aparentemente específico humano.

Muitos outros pesquisadores confirmaram a existência de diferentes agrupamentos de *Giardia intestinalis* que parecem ser específicos a determinados hospedeiros animais. Os agrupamentos C e D foram identificados em cães, gatos, coiotes e lobos; o E em animais com casco como bovinos, ovinos, caprinos, suínos, entre outros; os agrupamentos F e G em gatos e ratos respectivamente, e recentemente foi identificado o agrupamento H em mamíferos marinhos (HOPKINS *et al.*, 1997; MONIS *et al.*, 1999, 2009; LASEK-NESSELQUIST *et al.*, 2010; SANTÍN *et al.*, 2013).

Finalmente, outro dado importante foi o relato de MORRISON *et al.* (2007) de que o genoma de *G. intestinalis*, da cepa isolada de humano, WB clone C6 (ATCC 30957), identificado como agrupamento A, é de aproximadamente 11.7 Mb de tamanho distribuído em cinco cromossomos. O genoma é mais compacto do que os dos outros protozoários e codifica um repertório limitado de funções metabólicas, o que indica que se trata de um genoma adaptado ao ciclo de vida do parasita.

FRANZÉN *et al.* (2009) relataram o sequenciamento do genoma de *G. intestinalis*, da cepa isolada de humano, GS (ATCC 5058), identificado como agrupamento B, infectante para homens e animais, o qual apresentou homologia com o agrupamento A em $77\% \pm 5\%$ de nucleotídeos e $78\% \pm 14\%$ de aminoácidos nas regiões de codificação de proteínas e, além disso, a diversidade da sequência é mais acentuada no isolado GS (média de 0,5%) do que no isolado de WB ($<0,01\%$), razões pelas quais os autores sugeriram que os dois isolados do estudo representavam duas espécies distintas (THOMPSON, 2000; MONIS *et al.*, 2009), embora tivessem poucos caracteres de importância epidemiológica ou biológica para diferenciá-los.

2.2 CICLO DE VIDA, TRANSMISSÃO E SINTOMATOLOGIA

O protozoário *Giardia* apresenta dois núcleos, como todos os membros da ordem Diplomonadida, situados na região anterior do trofozoíto (ADAM, 2001, ANKARKLEV *et al.*, 2010). Utilizando vários marcadores de nucléolos, um compartimento nucleolar foi identificado em cada um dos núcleos do trofozoíto do protozoário, o que até então não tinha sido observado em *Giardia* (JIMÉNEZ-GARCÍA *et al.*, 2008). Ter dois núcleos com expressão gênica assimétrica confere ao parasito possibilidades únicas para a regulação da expressão gênica (ANKARKLEV *et al.*, 2010).

O ciclo de vida de *Giardia* é simples, tem duas fases, trofozoíto e cisto (ADAM, 2001; COOPER *et al.*, 2010). Os esquemas de trofozoíto e cisto de *Giardia* spp. estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Esquema da *Giardia* spp., de (A) Trofozoíto e (B) Cisto.

Fonte: ANKARKLEV *et al.*, (2010), modificado pelo autor.

O trofozoíto (Figura 1 - A) é a forma móvel do parasito, tem formato piriforme, mede entre 12 a 15 µm de comprimento por 5 a 9 µm de largura e apresenta a superfície dorsal convexa (ADAM, 2001; ANKARKLEV *et al.*, 2010).

O citoesqueleto do trofozoíto é formado por organelas compostas de microtúbulos, o disco ventral, corpos basais, quatro pares de flagelos e um par de corpos medianos estruturas exclusivas de *Giardia*, os quais estão situados no meio do corpo e dorsalmente aos flagelos caudais (ADAM, 2001; ELMENDORF *et al.*, 2003; THOMPSON, 2004).

O “disco ventral” ou “disco adesivo” cobre a metade anterior do lado ventral do parasita e foi reportado como um importante mediador para a ligação às células epiteliais intestinais no lúmen do hospedeiro (INGE *et al.*, 1988; KATELARIS *et al.*, 1995; SOUSA *et al.*, 2001). É uma estrutura única, mesmo dentro da ordem Diplomonadida, apenas *Giardia* spp. possui um disco ventral (ELMENDORF *et al.*, 2003), que modula sua concavidade, durante a fixação, para se tornar mais côncava (SOUSA *et al.*, 2001). Durante o encistamento é fragmentada em quatro estruturas em forma crescente visíveis por microscopia ótica no cisto maduro (PALM *et al.*, 2005).

O corpo mediano é um componente do citoesqueleto, que está localizado na linha média e dorsal para o flagelo caudal, consiste de um grupo de microtúbulos em um conjunto apertado (ADAM, 2001), foi proposto como o local de montagem para microtúbulos a ser incorporada no disco ventral (MENG *et al.*, 1996). Sua morfologia ajuda a definir as características morfológicas de diferentes espécies de *Giardia*, a função do corpo mediano é desconhecida (ADAM, 2001; ELMENDORF *et al.*, 2003).

Os flagelos, em número de oito, originam-se dos corpos basais situados próximos aos núcleos e emergem das regiões anterior, posterior, ventral e caudal do trofozoíto. Os flagelos parecem ser importantes para a mobilidade, mas não para a adesão ao intestino do hospedeiro (FAUBERT, 2000).

Segundo relatam MONIS *et al.* (2009), as relações filogenéticas de *Giardia* tem duas hipóteses diferentes. Uma que sugere que é proveniente de uma linhagem de eucariotos que divergiu antes da obtenção de mitocôndria (THOMPSON e MONIS, 2004), e outra propõem que esses protozoários foram parte das muitas linhagens

divergentes eucarióticas que se adaptaram a um estilo de vida microaerofílico ao invés de divergir, antes da endossimbiose do ancestral mitocondrial (MORRISON *et al.*, 2007).

No entanto, a descoberta da expressão da proteína chaperona 60 (*Cpn60*), que tem relação mitocondrial direta, codificado no núcleo de *G. intestinalis* (ROGER *et al.*, 1998) alterou o pressuposto de longa data que afirmava que a *Giardia* é principalmente um organismo sem mitocôndria. A confirmação do fato se deu em 2003 quando TOVAR *et al.*, (2003) descreveram a presença das mitossomas na *Giardia* spp, ampliando sua lista de organelas.

Foi demonstrado que a montagem de aglomerados de proteínas de ferro-enxofre (Fe-S), uma função importante identificada da mitocôndria (LILL e KISPAL, 2000), é compartimentada nas espécies de *Giardia* pela localização do centro de Fe-S de síntese da subunidade S, da cisteína desulfurasa (IscS), e do metalochaperona (IscU) para alongar as estruturas de dupla membrana que são, aproximadamente, 140 x 60 nm de tamanho. O número destas mitossomas varia de 25 a 100 por célula, com a acumulação distinta para os corpos basais e nas bases dos axonemes flagelares (TOVAR *et al.*, 2003). Parecem existir dois tipos de mitossomas em *Giardia*: as mitossomas periféricas, que estão espalhadas por todo o citoplasma, e as mitossomas centrais (REGOES *et al.*, 2005; HEHL *et al.*, 2007). A mitossoma central se divide e segrega ativamente durante a mitose, enquanto as organelas periféricas não são coordenadamente replicadas e se segregam em células-filhas estocasticamente (REGOES *et al.*, 2005).

A identificação das mitossomas na *Giardia* coloca o evento endossimbiótico, que levou à formação da mitocôndria, invariavelmente antes da divergência evolutiva da ordem Diplomonadida (TOVAR *et al.*, 2003; ANKARKLEV *et al.*, 2010).

O cisto (Figura 1 - B) é a forma infecciosa da *Giardia*, é resistente às mudanças ambientais, o que favorece a transmissão que ocorre por via fecal-oral, direta de um indivíduo infectado para outro ou indireta por meio da contaminação do ambiente ou do alimento (ADAM, 2001; BERTRAND e SCHWARTZBROD, 2007; ROBERTSON *et al.*, 2010). O cisto é oval, mede de 8 a 12µm de comprimento por 7 a 10µm de largura e é circundado por uma parede de aproximadamente 0,3µm de espessura. Dentro do cisto

são visíveis de 2 a 4 núcleos, corpos basais, corpos medianos e elementos estruturais do disco ventral e flagelos (ADAM, 2001).

A ingestão de apenas 10 cistos em indivíduos imunocompetentes pode causar infecção (NAUMOVA *et al.*, 2007).

Após a ingestão, os cistos passam pelo ambiente ácido do estômago e desencistam na porção inicial do intestino delgado. De cada cisto saem dois trofozoítos unidos pelo citoplasma que imediatamente se divide separando-os. Cada trofozoíto fixa-se na mucosa intestinal, ao nível do duodeno e jejuno, e divide-se por divisão binária. Cada novo parasito produzido repete o processo de modo que em pouco tempo são produzidos vários deles (FAUBERT, 2000; ADAM, 2001) (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo de vida da *Giardia* spp.

Fonte: ANKARKLEV *et al.*, (2010), modificado pelo autor.

Posteriormente, alguns destes trofozoítos desprendem-se da mucosa e iniciam o processo de encistamento na porção final do intestino delgado. Inicialmente os flagelos encurtam-se, depois o citoplasma se condensa e há produção de uma membrana cística. Cistos recentemente formados têm dois núcleos, mas depois há divisão nuclear no interior do cisto e são formados quatro núcleos. Ato contínuo, o disco adesivo, corpos basais, corpos medianos e o aparelho locomotor (flagelos), são duplicados resultando em dois trofozoítos que permanecem ligados pelo citoplasma no interior do cisto. Estes cistos são eliminados do corpo do hospedeiro junto com as suas fezes (ADAM, 2001). Já foi relatado que pessoas infectadas podem excretar entre 10^8 a 10^9 cistos por grama de fezes por dia, e continuar eliminando cistos por meses (RENDTORFF, 1954; DANCIGER e LOPEZ, 1975; PICKERING *et al.*, 1984). Sabe-se também que alguns dos trofozoítos eliminados no material diarreico podem originar re-infecção (FAUBERT, 2000; ADAM, 2001).

As práticas inadequadas de higiene favorecem também a infecção (NÚÑEZ, 2004; PÉREZ *al.*, 2008; NÓE *et al.*, 2011), em especial nas crianças, que constituem a população mais afetada por este tipo de parasita intestinal, além disso, associam-se problemas cognitivos e de atraso no crescimento (BERKMAN *et al.*, 2002).

Os cistos são extremamente resistentes à maioria dos desinfetantes utilizados nos tratamentos convencionais de água, como por exemplo, as concentrações de cloro normalmente utilizados em sistemas de tratamento de água e a várias outras condições ambientais, podendo permanecer viáveis no solo ou na água até dois meses em temperaturas tão baixas quanto 8°C (ADAM, 2001; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008; OMS, 2011; FENG e XIAO, 2011).

Os pacientes podem ser assintomáticos ou sintomáticos, em caso de apresentar sintomas esses podem ser diarreia aguda ou crônica, dor abdominal, perda de peso, desidratação, má absorção dos nutrientes, fadiga, atraso de crescimento e desenvolvimento cognitivo afetado no caso da população infantil. A severidade da doença dependerá do estado imunológico e nutricional do hospedeiro, e aos fatores de virulência do parasita (FAUBERT, 2000; THOMPSON, 2004; PARTOVI *et al.*, 2007; ROBERTSON *et al.*, 2010).

PAINTLIA *et al.* (1998), READ *et al.* (2002), HAQUE *et al.* (2005), SAHAGÚN *et al.* (2008) relatam que os agrupamentos A estão relacionados a casos sintomáticos e os agrupamentos B aos casos assintomáticos, esses últimos com casos esporádicos de diarreia; entretanto HOMAN e MANK (2001) entre outros estudos sugerem a relação inversa.

LAISHRAM *et al.* (2012a) em sua revisão destaca que seria importante explicar a razão de alguns indivíduos desenvolverem giardíase clínica enquanto outros permanecem assintomáticos, o que também poderia estar relacionado a fatores do hospedeiro ou do genótipo, com foi sinalizado anteriormente.

A elevada eliminação de cistos resulta em risco significativo para a contaminação do ambiente (KOHLI *et al.*, 2008; SAHAGÚN *et al.*, 2008; LAISHRAM *et al.*, 2012a).

Os cistos de *Giardia* podem ser encontrados no esgoto como resultado da deposição de material fecal dos humanos e animais (NASSER *et al.*, 2012).

O esgoto é uma importante fonte de bactérias patogênicas, vírus e parasitas, o controle e tratamento desses agentes são muito importantes para limitar sua transmissão (NASSER *et al.*, 2012).

Embora as Estações de Tratamento de Esgoto - ETEs sejam consideradas como uma das mais importantes aplicações biotecnológicas desenvolvidas no século passado, já que podem efetivamente tratar grandes volumes dos esgotos produzidos por famílias e indústrias, para um nível que satisfaça os critérios estabelecidos pelos órgãos reguladores (TAMAKI *et al.*, 2012), muitas vezes devido a alta resistência aos tratamentos convencionais, os cistos podem atravessar os processos tornando-se fatores de risco de contaminação ambientais, seja através do reuso do esgoto tratado para fins agrícolas ou industriais, ou chegar até águas superficiais e de consumo, podendo levar à ocorrência de surtos (KARANIS *et al.*, 2007; BALDURSSON e KARANIS, 2011).

CASSON *et al.* (1991) observaram remoção significativa das concentrações de cistos de *Giardia* após o tratamento primário ou de sedimentação dos sólidos totais presentes no esgoto, no efluente bruto, e foram quase completamente removidos durante o processo de tratamento biológico ou secundário. ROBERTSON *et al.* (2000) descreveram que a combinação dos tratamentos primários e secundários promove maior

remoção de cistos de *Giardia* no tratamento de esgoto bruto. CHENG *et al.* (2009) demonstrou elevada efetividade na remoção de cistos de *Giardia* em quatro ETEs com tratamento secundário, e que embora a taxa de eliminação seja elevada, muitas vezes não atinge remoção de 100%, sendo necessário manter os controles de avaliação da presença desse protozoário nos diferentes corpos d'água.

2. 2 TAXONOMIA

Os organismos do gênero *Giardia* pertencem ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Diplomonadida e Família Hexamitidae, (LEVINE *et al.*, 1980). Os organismos da ordem Diplomonadidas foram considerados parte de uma das primeiras linhagens divergentes dos eucariontes (SOGIN *et al.*, 1989).

Embora tenham sido propostas alterações no posicionamento taxonômico da ordem Diplomonadidas, estas ainda não foram aceitas pela comunidade científica (CAVALIER-SMITH, 2003; SIMPSON e ROGER, 2004; ADL *et al.*, 2005; ANKARKLEV *et al.*, 2010). O Quadro 1 apresenta as principais espécies de *Giardia* reconhecidas com seus respectivos hospedeiros.

Quadro 1- Classificação atual e proposição feita por MONIS *et al.* (2009) para o gênero *Giardia* e os agrupamentos de *G. intestinalis* de acordo com seus hospedeiros.

Espécie	Genótipo	Hospedeiro	Classificação ⁽¹⁾
<i>G. intestinalis</i>	A	Homem, cão, gato, castor, cobaia, bovinos ^a	<i>Giardia intestinalis</i>
	B	Homem, cão, castor, rato, cavalo ^a	<i>Giardia enterica</i>
	C	Canídeos ^b	<i>Giardia canis</i>
	D		
	E	Bovinos, suínos, ovinos ^c	<i>Giardia bovis</i>
	F	Felinos ^d	<i>Giardia cati</i>
	G	Rato doméstico ^d	<i>Giardia simondi</i>
	H	Mamíferos aquáticos ^e	ND
<i>G. agilis</i>	----	Anfíbios ^f	----
<i>G. muris</i>	----	Roedores ^f	----
<i>G. ardeae</i>	----	Aves ^g	----
<i>G. psittaci</i>	----	Aves ^h	----
<i>G. microti</i>	----	Roedores ⁱ	----

Legenda: (1) Classificação proposta por MONIS *et al.*, (2009); ND: Não descrito. Referências: **a**-Homan *et al.*, 1992, Nash *et al.* 1995; Mayrhofer *et al.*, 1995; Monis *et al.*, 1996 ; **b**- Hopkins *et al.*, 1997; Monis *et al.*, 1998 ; **c**- Ey *et al.*, 1997; Monis *et al.*, 1999 ; **d**- Monis *et al.*, 1999; **e**- Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010; **f** - Filice, 1952 appud Adam, 2001; **g**- Erlandsen *et al.*, 1990 ; **h**- Erlandsen e Bemrick, 1987 ; **i** - Feely, 1988.

A heterogeneidade genética observada em *G. intestinalis* tem sido demonstrada por diversos estudos, em especial aqueles baseados na epidemiologia molecular, e em particular, o uso de PCR tem fornecido forte evidência de que esse grupo é um complexo de espécies. No Quadro 1 estão apresentados os oito agrupamentos descritos de *G. intestinalis* e seus hospedeiros. Apenas os agrupamentos A e B foram observados tanto no homem quanto em animais, sendo, portanto os agrupamentos de importância para a saúde humana (LALLE *et al.*, 2005a; TRAUB *et al.*, 2004; CACCIÒ e RYAN, 2008; MONIS *et al.*, 2009; COOPER, *et al.*, 2010).

O potencial zoonótico dos agrupamentos A e B tem sido discutido amplamente, mas parece que a frequência com que ocorrem é rara, mesmo assim deve ser um importante ponto a ser levado em consideração (THOMPSON, 2004; HUNTER e THOMPSON, 2005; van der GIESSEN *et al.*, 2006).

Outros genótipos de *G. intestinalis* foram descritos em diferentes estudos. SULAIMAN *et al.* (2004) descreveram os genótipos WA1 a WA5 e WB1 a WB10, após a análise de cistos de *Giardia* provenientes de esgoto. Outros estudos, também baseados em genotipagem de DNA, identificaram subtipos de isolados humanos e animais, como o estudo de LALLE *et al.* (2005b) que descreveram outros genótipos, tais como A3, A4, A5, ou B1, B2, B3 no locus que codifica a proteína β giardina. SULAIMAN *et al.* (2003), descreveram no locus *tpi* os genótipos BS1, BS2, BS3, ou CS1, CS2, CS3. Essa diferenciação gerou certo grau de confusão, particularmente quando diferentes genótipos foram observados por sequenciamento de diferentes marcadores genéticos, ou seja, não houve concordância entre os resultados para estes genes. O mesmo aconteceu com os resultados obtidos no estudo conduzido por ROBERTSON *et al.* (2006b) que apresentaram sequências com diferenças de até quatro SNPs², em relação às sequências previamente descritas dos agrupamentos de *Giardia*.

Devido às diferenças genéticas observadas entre os agrupamentos A e B, o qual se encontra no mesmo nível ou superior da utilizada para definição de espécies, MONIS *et al.* (2009) sugeriram que fossem consideradas como espécies diferentes e fosse

² É uma variação na sequência do DNA que afeta somente uma base na sequência do genoma.

realizada a revisão taxonômica deste gênero, para que fosse possível distinguir as diferenças evolutivas e biológicas dos isolados de *G. intestinalis*. Todavia, ainda se mantém a classificação baseada em agrupamentos (Quadro 1).

2. 4 EPIDEMIOLOGIA E OCORRÊNCIA NO AMBIENTE

A giardíase é cosmopolita e representa atualmente um importante problema de saúde pública. *Giardia* continua sendo o agente protozoário mais frequente de doença intestinal em todo o mundo, causando cerca de 280.000.000 casos de diarreia por ano (LANE e LLOYD, 2002).

Aproximadamente, 325 surtos relatados em nível mundial de doenças associadas com a transmissão pela água, foram registrados entre a primeira guerra mundial (1914 - 1918) até o ano 2003, causados por parasitas protozoários, *G. intestinalis* e *Cryptosporidium parvum* foram os responsáveis dentre os quais 40,6% (132/325) e 50,8% (165/325), respectivamente (KARANIS et al., 2007).

Um aspecto relevante sobre esse parasita se deu em 2004, com sua inclusão na “Iniciativa de Doenças Negligenciadas” da Organização Mundial da Saúde, que busca estratégias de controle para doenças que ocorrem principalmente em países em desenvolvimento (SAVIOLI et al., 2006). Segundo JAKUBOWSKI et al. (1991) a verdadeira prevalência da giardíase em uma comunidade poderia estar subestimado, porque as pesquisas são geralmente baseados em exames de fezes de populações selecionadas, cenário que se mantém até a atualidade.

Diversos estudos realizados em diferentes países demonstraram a presença de cistos de *Giardia* em amostras de diferentes tipos de água e esgoto. Os resultados observados nesses estudos podem fornecer informações importantes da disseminação desse microrganismo no ambiente e ainda demonstrar a disponibilidade desses agentes como fontes de infecção para os seres humanos (CACCIÒ et al., 2003; HACHICH et al., 2004; BALDURSSON e KARANIS, 2011).

Os primeiros trabalhos que relatam a presença de cistos de *Giardia* no ambiente aparecem ao final dos anos 1970 e começo dos anos 1980, e tratam de grandes surtos de

giardíase que aconteceram por veiculação hídrica, que foram relacionados à presença de animais silvestres como castores perto de reservatórios da água, e que levou a sua inclusão na lista de agentes patogênicos parasitários da OMS, e ainda fazem parte dessa lista (SHAW *et al.*, 1977; DYKES *et al.*, 1980; OMS, 1981).

A partir de 1990, foi intensificada a busca por *Giardia* em amostras ambientais com o fim de acrescentar o conhecimento e informação, da frequência dos cistos desse organismo circulante no ambiente.

SYKORA *et al.* (1991) observaram, nos USA, concentrações de 4 a 14.000 cistos/L de *Giardia* em amostras de esgoto bruto, 1 a 44 cistos/L em amostras de esgoto tratado e 70 a 30.000 de cistos/L em lodos provenientes de ETEs. Os autores ressaltaram que as altas variações de cistos poderiam ser devido a vários fatores tais como: as diferenças geográficas, o número de infectados assintomáticos e sintomáticos que liberam os cistos, os animais que poderiam representar também uma fonte importante desses protozoários em algumas localidades. A acumulação dos cistos nos lodos e esgoto tratado é de interesse, devido aos riscos da saúde associados com a disposição final de ambos.

GILMOUR *et al.* (1991) avaliaram no Reino Unido diferentes amostras de água e detectaram cistos de *Giardia* em 46,6% das amostras de água para consumo humano, 22,5% das água bruta, 85,2% das águas destinadas à recreação, e em 100% das amostras de esgoto tratado, com concentrações entre 0,14 e 359 cistos/L em todas as amostras. Os autores realçaram os poucos antecedentes na detecção de cistos viáveis em amostras de água ou efluentes de esgoto.

WALLIS *et al.* (1996) destacaram, no Canadá, a presença de cistos de *Giardia* em 21% das amostras de água bruta, 18,2% em amostras de água tratada, e em 72,6% das amostras de esgoto bruto. Concluíram que as altas concentrações de cistos no esgoto bruto (<1000 a 88.000 cistos/L) confirma que *Giardia* é um parasita endêmico no país. Esses dados combinados com os resultados positivos em amostras de água para consumo humano são sugestivos da infecção, no entanto, deve ser motivo de preocupação por parte das autoridades de saúde pública.

HO e TAM (1998) avaliaram em Hong Kong, na China, amostras dos rios Lam Tsuen e o Shing Mun, em diferentes pontos de coleta e obtiveram concentrações de cistos de *Giardia*, no rio Lam Tsuen entre 2 e 468 cistos/L, e no rio Shing Mun entre valores não detectáveis a valores maiores de 100 cistos/L. Os autores sugerem que a ocorrência desse organismo naquele ambiente seja devido as descargas de esgotos sem tratamento.

COUPE *et al.* (2006) na França, relataram a presença de cistos de *Giardia* em 66% das amostras de água superficial estudadas, com concentrações de 0,1 a 16,5 cistos/L. Os autores também reportaram que a genotipagem dos isolados de *Giardia* poderia ter acrescentado informações sobre a possível origem da contaminação, e o que monitoramento de *E. coli* e/ou enterococos não foi indicativo sobre a presença de *Giardia*, portanto, a busca de parasitas em água deve ser realizada independente da análise dos indicadores bacterianos de contaminação fecal.

KARANIS *et al.* (2006) observaram, em estudos conduzidos na Rússia e na Bulgária, a presença de cistos de *Giardia* em 5,2% de água de torneira, 12,7% em amostras de água de rio, 11,1% em amostras de água de poço, 12,5% em amostras de água engarrafada e 42,5% em amostras de esgoto bruto. Os autores concluíram que o conhecimento da distribuição de *Giardia* nas água de abastecimento pode contribuir para a proteção da saúde nas áreas investigadas e para o estabelecimento de estratégias mais eficientes de vigilância para a monitoração sistemática das taxas epidemiológicas.

CARMENA *et al.* (2007) realizaram um estudo no norte da Espanha onde 284 amostras de água de consumo humano e de recreação foram analisadas. Os autores obtiveram positividade para cistos de *Giardia* em 92,3% das amostras de água de rio, em 55,5% das amostras de reservatórios, em 26,9% e em 45,2% das amostras de água bruta captadas em estações de tratamento de água (ETA) convencionais e de pequeno porte, respectivamente, em 19,2% de água tratada a partir de ETAs de pequeno porte, e em 26,8% de água de abastecimento de municípios que recebiam somente tratamento por cloração. Foi concluído que os tratamentos de água, baseados em processos de filtração rápida ou apenas cloração, eram insatisfatórios para fornecer água adequada para consumo humano, já que representa um importante risco para a saúde humana, pelas

características dos cistos (elevada resistência e baixa dose infecciosa) que poderiam estar presentes.

CASTRO-HERMIDA *et al.* (2008b) relatam a presença de *G. intestinalis* na bacia hidrográfica do Rio Tambre, na Espanha. Encontraram concentrações elevadas em água bruta (1 a 12,8 cistos/L), e em água para consumo humano (0,5 a 4 cistos/L), provenientes de ETAs da região. Após sequenciamento para o locus da *β giardina*, foram identificados os agrupamentos AI, A-II e E. A presença dos agrupamentos patogênicos na água para consumo humano indica a ineficiência do tratamento nas ETAs, expondo a população a possíveis surtos de gastroenterite. O elevado nível de contaminação ambiental pode ser decorrente da falta de proteção dos mananciais de água superficial que estão inseridos em áreas onde predomina a pecuária, especialmente criação de gado, e onde existem inúmeras pastagens e áreas cultivadas, portanto, a contaminação poderia ser decorrente da presença de fezes dos animais. Os autores ressaltaram que a falta de regulamentos específicos no país, relativos aos limites toleráveis de *G. intestinalis* na água para consumo humano, dificultam a implementação de um sistema de vigilância adequado e o desenvolvimento de medidas de intervenção.

O mesmo grupo de pesquisa (CASTRO-HERMIDA *et al.* 2009) relatou a presença de cistos de *G. intestinalis* ainda na bacia hidrográfica do Rio Tambre, em 93,1% das amostras coletadas de água do rio, com concentrações entre 2 a 400 cistos/L, e em 16% de amostras clínicas avaliadas de bovinos, provenientes das fazendas existentes em torno daquela área. Foram identificados os agrupamentos de *G. intestinalis* AI, A-II e E, sugerindo a importância do monitoramento da presença do parasita nos animais e nos pontos de abastecimento público.

CASTRO-HERMIDA *et al.* (2010) detectaram a presença de cistos de *G. intestinalis* em amostras de diferentes corpos d'água procedentes de duas municipalidades, uma costeira e outra no interior na Espanha. Foram positivas em 42,3% de amostras de água bruta, 36,5% nas amostras de consumo humano, 98% das amostras de esgoto bruto e 96% das amostras de esgoto tratado. Elevadas concentrações de cistos foram observadas tanto nas amostras de água como também no esgoto, o que demonstrou a ampla distribuição dos cistos de *Giardia* no ambiente e na população, e a

ineficácia na redução ou inativação dos cistos através dos tratamentos das ETAs e ETEs. Os autores também ressaltaram que nas zonas costeiras o esgoto tratado era lançado diretamente para o mar, enquanto que no interior, as ETEs lançavam seus efluentes finais diretamente nos rios. O contraste nos resultados das concentrações poderia ser decorrente à maior atividade pecuária existente nas áreas do interior, e também pelo fato dos efluentes finais das ETEs nessas áreas serem lançados na mesma bacia hidrográfica que fornece água para as ETAs.

Em estudo conduzido por CASTRO-HERMIDA *et al.* (2011), demonstraram a presença de cistos de *Giardia* em amostras de fezes de animais domésticos e selvagens de áreas costeiras (15,9%) e em áreas do interior (26,7%) na Espanha. Foi também observada a presença de cistos de *Giardia* nas amostras dos afluentes de ETAs e ETEs de áreas costeiras, na porcentagem de 25% e 100%, respectivamente. A porcentagem de positividade para as amostras dos efluentes das ETAs e ETEs foram semelhantes a do afluente, demonstrando que o tratamento não foi eficaz na remoção desses patógenos. Nas áreas do interior foram positivas para cistos de *Giardia* 58,3% e 100% das amostras dos afluentes e 33,3% e 100%, das amostras dos efluentes, provenientes das ETAs e ETEs respectivamente. A genotipagem após sequenciamento para o locus da β *giardina*, permitiu identificar os agrupamentos AI, AII e E nas amostras clínicas e ambientais das áreas costeiras, e os agrupamentos AI, AII, B e E nas amostras do interior. Os autores concluíram que as elevadas concentrações detectadas nas áreas do interior se devem a alta frequência de infecção observada nos animais, e também a sua proximidade com as ETAs e ETEs, e reforçaram a necessidade de se estabelecer o monitoramento da presença de *G. intestinalis* nos animais domésticos como também nos cursos de água utilizados pelos agricultores (canais de água, água potável e sistemas de drenagem, e na água destinada ao consumo humano e para fins recreativos).

Em uma revisão conduzida por BALDURSSON e KARANIS (2011) os autores relataram 199 surtos em nível mundial, de doenças de transmissão hídrica entre os anos 2004 e 2010, o protozoário parasita *G. intestinalis* foi o responsável por 35,1% (70/199) daqueles eventos. As principais causas relacionadas foram o abastecimento de água sem tratamento, a contaminação das fontes de água, falhas no processo de tratamento, a

contaminação dos reservatórios ou contaminação pós-tratamento, que afetaram os sistemas de água para consumo humano.

Dependendo do grau da eficiência do tratamento de esgoto na remoção do parasita, os cistos podem passar pelo processo de tratamento, alcançar as águas superficiais e atingir o hospedeiro humano causando infecção (CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008). No entanto, nos países industrializados, a utilização de esgoto tratado para fins domésticos, industriais e agrícolas, é a forma mais importante de reutilização de esgoto, quando assegurada a qualidade sanitária do produto final (NASSER *et al.*, 2012).

LI *et al.* (2012) avaliaram amostras de esgoto bruto na China procedentes de 19 ETEs de quatro cidades, e observaram elevada circulação dos agrupamentos AII e B que foram identificados por meio de *nested* PCR seguido do sequenciamento do locus *tpi*. Os autores concluíram que a genotipagem e subtipagem dos parasitas entéricos no esgoto pode ser um complemento eficiente e econômico para avaliar as características da transmissão endêmica dos patógenos na vigilância convencional e como ferramentas epidemiológicas. Sugeriram a realização de estudos adicionais em amostras de esgoto bruto provenientes de outras regiões para validar a utilidade do sistema de vigilância molecular, que poderiam apresentar concordância com estudos casos-controle ou longitudinais em humanos.

BROGLIA *et al.* (2013), avaliaram amostras clínicas de viajantes alemães provenientes de regiões endêmicas do mundo. As amostras positivas por microscopia para a presença de *G. intestinalis* foram submetidas a genotipagem por multilocus através de *nested* PCR e sequenciamento utilizando os genes *gdh*, *tpi* e β *giardina*. Os autores observaram diferenças dos agrupamentos obtidos de acordo com o locus avaliado, no caso de β *giardina* houve maior frequência do agrupamento A, mas no caso dos loci *gdh* e *tpi* a maior frequência foi do agrupamento B. Também foram obtidas duas amostras compatíveis com o agrupamento D de hospedeiro animal (canídeos) no locus *gdh* dentre os pacientes com sintomatologia. Os autores concluíram a necessidade de estudos adicionais para esclarecer a especificidade do hospedeiro do parasita, dada à comprovação incomum de um agrupamento animal isolado no homem. Além disso, a

caracterização molecular de indivíduos de áreas endêmicas pode fornecer um cenário útil para comparar a variabilidade dos agrupamentos em diferentes regiões geográficas.

Os últimos relatórios disponíveis de vigilância de giardíase do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (CDC *et al.*, 2010, 2012), nos EUA, relataram que entre os anos 2006 a 2010, o número de casos humanos da doença continua aumentando de forma constante, de 19.239 casos em 2006 a 19.927 casos em 2010. O maior número de relatos de casos são provenientes de crianças com idades entre 1 a 9 anos, em comparação com outros grupos etários.

2.4.1 Brasil

2.4.1.1 Epidemiologia no Brasil

Dados obtidos em estudos no Brasil demonstram que *Giardia* está disseminada em todas as regiões brasileiras e acometem adultos e crianças. GROSS *et al.* (1989) observaram prevalência de 17,9% de *G. intestinalis* em crianças de duas favelas de Belo Horizonte. BOIA *et al.* (1999) observaram prevalência de 17,4% de *G. intestinalis* entre 316 pessoas analisadas no município de Novo Airão, no estado de Amazonas. Em Assis, São Paulo, LUDWIG *et al.* (1999) avaliaram as amostras fecais de 18.366 indivíduos, e observaram prevalência de 8,7% de *G. intestinalis* na população do Município, entre os anos de 1990 a 1992, sendo a faixa etária de 3 a 12 anos a mais acometida.

ROCHA *et al.* (2000) analisaram as amostras de 2.901 escolares de Bambuí em Minas Gerais, e descreveram prevalência de 6,2% de *G. intestinalis*, na faixa etária entre 0 e 6 anos a prevalência foi significativamente maior que para as outras faixas etárias.

MASCARINI e DONALÍSIO (2006) avaliaram entre 2002 e 2003 cinco creches municipais de Botucatu, SP. Foram analisadas 379 crianças, em 2002, e 397, em 2003. Os autores obtiveram prevalência de *G. intestinalis* entre as crianças de 23,7% em 2002 e de 21,4% em 2003.

TEIXEIRA *et al.* (2007) verificaram que dentre 590 crianças de 29 assentamentos da cidade de Juiz de Fora, MG, a prevalência de *G. intestinalis* foi de 18%. Os autores utilizaram uma única amostra de fezes para diagnosticar *G. intestinalis* e salientaram que a amostragem única poderia resultar em um valor subestimado para a prevalência dos casos, devido a eliminação fecal intermitente de cistos. Os resultados demonstraram que a infecção *G. intestinalis* era 2,56 maior em crianças que não tinham um banheiro em casa, e que a elevada frequência desse parasita é consequência, principalmente, da contaminação e disponibilidade insuficiente de água, e higiene pessoal inadequada.

GOMES *et al.* (2010), avaliaram a presença de parasitas em 115 alunos da Escola Municipal Rural Águas do Miranda, distrito Águas do Miranda, Município de Bonito, em Mato Grosso do Sul, e observaram frequência de *G. intestinalis* de 14,8% dentre os escolares. Os autores sinalizaram a necessidade de comprovar a qualidade da água distribuída para a população, uma vez que esta é captada do rio Miranda (coleção hídrica de superfície) e alertaram para as condições em que a água era armazenada e utilizada para consumo. Concluíram que o índice de infecções por parasitos intestinais são importantes indicadores das condições de saneamento de uma determinada comunidade.

NEVES (2010) avaliou as características histórico-sociais da aldeia indígena Jaraguá-Ytu, SP, em relação a suas tradições, hábitos de higiene, condições de saneamento e aspectos culturais, correlacionando-as com a prevalência de parasitos intestinais. O estudo evidenciou presença de 30,2% *G. intestinalis* nos indígenas participantes, os quais viviam em condições de moradia e higiene deficientes, além de estarem sofrendo processo de aculturação, com forte influência por parte dos profissionais do posto de saúde do CECI (Centro de Educação e Cultura Indígena) e da proximidade com os distritos vizinhos. O autor realça que um novo estudo poderia ser realizado para avaliar os impactos do processo de aculturação e dos novos hábitos alimentares dos indígenas.

BORGES *et al.* (2011), destacaram que no levantamento de dados sobre a incidência de parasitos intestinais em pacientes atendidos pelo serviço público no

Hospital Municipal de Cumari, GO, entre 2002 e 2008, *G. intestinalis* foi o parasita de maior incidência com 33,6%, sendo a taxa etária mais afetada entre 0 a 10 anos.

SANTOS *et al.* (2012) avaliaram em uma creche na cidade de Araguari, MG, amostras de fezes das crianças e observaram a presença de *G. intestinalis* em 51.8% das amostras. Os autores utilizaram o locus de *gdh* para a genotipagem das amostras positivas e observaram que todas pertenciam ao agrupamento B de *G. intestinalis*.

No Brasil, a frequência de infecções por esse protozoário varia de acordo com a população e a região estudada, mas é concordante com outros trabalhos que apontam que esse organismo é mais frequente em crianças (PRADO *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2007; DE SOUZA *et al.*, 2007; VOLOTÃO *et al.*, 2007; KOHLI *et al.*, 2008). É importante ressaltar que, o índice de infecções por *G. intestinalis* embora expressivo, pode estar subestimado, devido à eliminação intermitente de cistos nas fezes.

2.4.1.2 Ocorrência no Ambiente no Brasil

Diversos estudos também demonstraram a presença de cistos de *Giardia* nos diferentes tipos de água no Brasil, nos quais buscaram fornecer subsídios para o conhecimento da disseminação do parasita no ambiente.

FRANCO *et al.*, (2001) descreveram na cidade de Campinas no estado de São Paulo, a recuperação por filtração em membrana e eluição por lavagem e raspagem da membrana (RM) e dissolução em acetona (ADM) de amostras de água superficial do rio Atibaia. Esse rio pertence à bacia hidrográfica do Rio Piracicaba, e sofre o contínuo impacto de descarga industrial, de efluentes de esgoto e contaminação de origem agrícola e é utilizado para captação de água para abastecimento para o 95% da população de Campinas. Os autores relataram concentrações de 7 a 95 cistos de *Giardia* em amostras de 0,5L, com maior taxa de recuperação com a RM .

Em outra pesquisa FRANCO e CANTUSIO NETO (2002) avaliaram a qualidade da água mineral comercializada na cidade de Campinas na busca por cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. Os autores não observaram a presença de *Giardia* nas

amostras, porém em duas amostras foi detectado oocistos de *Cryptosporidium*, e ressaltam que esse resultado representa importante problema para a saúde pública.

SANTOS *et al.* (2004) em um estudo para avaliar a presença de *Giardia* em amostras de lodo de esgoto, em sistema de lodos ativados, obtiveram resultados positivos nas 8 amostras estudadas. Os autores salientam a importância da avaliação prévia de lodo de esgoto antes de sua aplicação na agricultura.

HACHICH *et al.* (2004) avaliaram amostras de água superficial coletadas em diferentes bacias hidrográficas no estado de São Paulo, e observaram a presença de *Giardia* spp. em 27% das amostras. Os valores obtidos para contagens de cistos variaram entre não detectáveis a valores de 521 cistos/L. Os autores concluíram que as doenças diarreicas causadas por protozoários devem ser pesquisadas em regiões onde as águas de mananciais apresentem concentrações elevadas de *Giardia*, e além disso, esses corpos d'água devem estar protegidos contra os lançamentos de esgoto.

OLIVEIRA (2005) avaliou a interferência do desaguamento do Ribeirão Pinheiros sobre a qualidade das águas do Rio Atibaia em Campinas, comparando amostras à montante e a jusante do desaguamento do Ribeirão Pinheiros quanto à concentração de *Giardia*. O autor obteve presença de cistos de *Giardia* em 52% das amostras (concentração média de 25,12 cistos/L) coletadas à montante do Ribeirão Pinheiros, e em 76% das amostras (concentração média de 64,16 cistos/L) obtidas à jusante do Ribeirão Pinheiros, realçando ainda a importância do conhecimento da epidemiologia ambiental desse organismo, no Rio Atibaia que é o principal manancial que abastece a cidade de Campinas e outros municípios da região.

DIAS *et al.* (2008) relataram a presença de *Giardia* spp. *intestinalis* nas águas subterrâneas em 71 % das amostras estudadas e em 60% das amostras avaliadas de águas superficiais coletadas na bacia hidrográfica do Ribeirão São Bartolomeu, localizada no município de Viçosa, em Minas Gerais, com concentrações entre 1,42 a 11,28 cistos/L. Também foram avaliadas amostras de esgoto tratado de uma ETE da região e as concentrações obtidas estiveram entre 20.700 a 39.035 cistos/L. Amostras de esgoto bruto provenientes de suinoculturas localizadas na sub-bacia Córrego Engenho e na sub-bacia Córrego Antuérpia, obtiveram concentrações entre 86 a 1.320 cistos/L.

Além disso, os autores observaram a presença de *Giardia* spp. em 36,4% das amostras de fezes em bovinos, sendo que os animais mais novos apresentaram maior frequência. Os autores concluíram que os resultados obtidos confirmam a possibilidade de eliminação de cistos de *Giardia* por diferentes espécies animais. Os autores observaram que a contaminação dos mananciais superficiais pode representar perigo potencial à saúde humana, uma vez que esse ribeirão é parte do grupo de mananciais de abastecimento de água bruta para a população do município de Viçosa.

NISHI *et al.* (2009) avaliaram em Maringá, Paraná, amostras de água bruta e de água tratada, e observaram a presença de *Giardia* spp. em 6,66% e 13,33% em conjunto com *Cryptosporidium* sp. nas amostras de água bruta, porém as amostras de água tratada foram negativas para o parasito.

CANTUSIO NETO *et al.* (2010) avaliaram amostras de água superficial do Rio Atibaia em Campinas, SP, e demonstraram a presença de *Giardia* spp. em 87,5% das amostras, com concentrações de cistos que variaram entre 2,5 a 120 cistos/L. Os autores destacaram a importância do conhecimento prévio sobre a qualidade dos corpos d'água para conduzir o processo de tratamento de água, bem como a necessidade de proteger as fontes de água de superfície a partir de lançamentos de esgoto.

RAZZOLINI *et al.* (2011) avaliaram a qualidade de amostras de água de poços, em um assentamento Peri-urbano na região metropolitana de São Paulo, quanto a presença dos cistos de *Giardia*. Os resultados demonstraram a presença de cistos de *Giardia* em 62,5% das amostras, com concentrações que variaram entre menor que 0,1 e 36,1 cistos/L, que reflete a vulnerabilidade dos sistemas de abastecimento de água de poço naquela área. Nesse estudo foi realizada avaliação de risco que resultou em risco médio de 10^{-1} , nível não tolerável, o qual é considerado elevado para a população exposta.

Uma pesquisa realizada em São Paulo por FERNANDES *et al.* (2011), utilizando o gene *gdh* como alvo na reação de PCR, revelou a presença dos agrupamentos A e B de *G. intestinalis*, em amostras de água e esgoto. Os autores obtiveram 41,6% de amostras positivas para *Giardia*, sendo este o primeiro estudo feito no Brasil de genotipagem da

G. intestinalis a partir de amostras ambientais, ressaltando a necessidade de estudos adicionais para conhecer a real dispersão desse protozoário no ambiente.

BRANCO *et al.* (2012) avaliaram amostras de água de mananciais de áreas urbanas e rurais em Campos do Jordão, SP, e obtiveram concentrações para cistos de *G. intestinalis* que variaram entre 0,07 e 0,1 cistos/L

2.4.2 Peru

2.4.2.1 Epidemiologia no Peru

No Peru, vários estudos realizados em diferentes localidades tiveram como objetivo a detecção de *Giardia* em amostras clínicas, em sua grande maioria foram obtidos maior prevalência na população infantil. MIOTTI *et al.* (1986) relataram a presença de anticorpos séricos para *G. intestinalis* em 46% das amostras de sangue das crianças na cidade de Lima, inclusive em menores de 6 meses que apresentaram anticorpos para este parasita.

VIDAL *et al.* (1991) realizaram estudo com base em métodos de microscopia e ELISA, onde buscaram por cistos de *Giardia* em amostras de fezes de crianças de um “*pueblo joven*” ou favela, na cidade de Lima. Os autores obtiveram presença de *G. intestinalis* em 13% das amostras.

MARCOS *et al.* (2002) analisaram amostras de fezes de 188 crianças na faixa etária entre 1 e 16 anos, nas cidades de Huertas e Jucán, pertencentes à província de Jauja, Estado³ de Junin, e obtiveram prevalência de 100% de parasitas ou comensais e 64% de parasitas patógenos. A prevalência de *G. intestinalis* foi de 35,1%.

MACO *et al.*, (2002) avaliaram amostras de fezes de 91 pessoas em 6 comunidades rurais de Puno, e relataram taxas de parasitose superior aos 90%. A prevalência de *G. intestinalis* foi de 3,3%.

³ No Peru, Departamento é equivalente ao Estado no Brasil.

MARCOS *et al.* (2003) avaliaram amostras de fezes de duas populações na cidade de Sandia, Puno, uma rural e outra urbana, e obtiveram como resultados 25,71% e 13,51% de prevalências de *G. intestinalis*, respectivamente.

IANNACONE *et al.* (2006) relataram prevalência de *G. intestinalis* em 4,7% de crianças de escolas no bairro de Santiago de Surco, da cidade de Lima.

HOLLM-DELGADO *et al.* (2008) relataram o monitoramento de um grupo de crianças na cidade de Lima para evidenciar potenciais problemas de crescimento. Os autores observaram que a presença de cistos de *Giardia* não prejudicava a saúde da criança, mesmo com infecções repetidas. Além disso, as crianças infectadas por *Giardia* não apresentavam maior risco de desenvolver diarreia, de perder peso ou não ganhar altura quando comparadas com crianças não infectadas.

ULLOA-STANOJLOVIC (2009) relatou uma prevalência de 7,6% de *G. intestinalis* entre 131 amostras de fezes de cães pertencentes à crianças em idade escolar da zona norte da cidade de Lima. O autor relatou que os resultados dos inquéritos realizados com os pais, demonstraram a falta de higiene na interação entre as crianças e seus animais de estimação, o que pode representar um fator de risco para a transmissão zoonótica desse organismo.

MARTINEZ-BARRIOS *et al.* (2011) avaliaram amostras de fezes de 104 crianças em quatorze creches na cidade de Tiabaya, Estado de Arequipa, e observaram prevalência de *G. intestinalis* de 25,96%.

PABLO *et al.* (2012) avaliaram amostras de fezes de crianças e cães em três distritos da província de Puno, observando prevalência de *G. intestinalis* de 14,6% e 28,8% respectivamente.

Até o ano de 2014, foram realizados no Peru, estudos para a caracterização molecular de isolados de *G. intestinalis*, somente em amostras clínicas. Cabe ressaltar o estudo de SULAIMAN *et al.* (2003), que para testar a eficácia da caracterização do gene *tpi*, utilizaram amostras clínicas de diferentes localidades, dentre elas da cidade de Lima os quais revelaram pertencer tanto aos agrupamentos A como B, com predominância do agrupamento B.

PÉREZ *et al.* (2008) realizaram um estudo com 845 crianças na cidade de Trujillo, Estado La Libertad. Os autores obtiveram prevalência geral de enteroparasitoses de 66,3%, e prevalência de 23,8% para *G. intestinalis*, sendo este o parasita mais frequente em crianças com diarreia (28,1%) e naqueles sem diarreia (19,5%). As amostras de *G. intestinalis* foram caracterizadas por métodos moleculares – com base na sequência do gene *gdh* – que demonstrou a presença dos agrupamentos A e B de *G. intestinalis*, com predominância do agrupamento A.

COOPER *et al.* (2010) em estudo realizado em uma favela na cidade de Lima, utilizando amostras de fezes de 104 famílias e de seus cachorros, obtiveram elevada prevalência dos agrupamentos AII e B de *G. intestinalis* nas amostras de fezes humanas e dos agrupamentos C e/ou D nas amostras de fezes de cachorros. Os autores observaram que nas amostras dos animais de estimação ocorriam infecção mista dos agrupamentos B e D.

A grande maioria dos trabalhos realizados no Peru com amostras clínicas demonstram, assim como os estudos realizados no Brasil e outras partes do mundo, que a prevalência de *Giardia* varia de acordo com a região estudada, e apresenta elevada frequência de infecção em crianças, que aparentemente são o grupo mais exposto e vulnerável (MIOTTI *et al.*, 1986; MARCOS *et al.*, 2002, 2003; IANNAcone *et al.*, 2006; HOLLM-DELGADO *et al.*, 2008; PÉREZ *et al.*, 2008; MARTINEZ-BARRIOS *et al.*, 2011).

2.4.2.2 Ocorrência no Ambiente no Peru

No Peru, a presença de cistos de *Giardia* foi investigada em amostras de alimentos e diferentes tipos de água, porém apenas métodos convencionais, como a microscopia, foram utilizados para os estudos.

PÉREZ-CORDÓN *et al.* (2008), analisaram amostras de diferentes alimentos crus e frescos, principalmente legumes e frutos do mar, em diferentes localidades da cidade de Trujillo. Os autores obtiveram vários tipos de parasitas, entre eles *G.*

intestinalis com prevalência entre 5,3% em frutos do mar e 13,2% em legumes. Amostras de água de poço e de canais de irrigação também foram avaliadas e foi observada a presença de cistos de *Giardia* em quatro dos cinco pontos de coleta, em concentrações variando entre 0,15 e 0,60 cistos/L.

NAKAMURA (2011) avaliou diferentes amostras de dois canais de irrigação na cidade de Lima, e observou a presença de cistos de *Giardia* em 30% (6/20) do total de pontos de coleta, com concentração média de 230 cistos/L.

2.5 DIAGNOSTICO

O exame de microscopia direta foi e continua sendo o padrão para o diagnóstico de cistos e trofozoítos de *Giardia* em amostras clínicas (DE SOUZA *et al.*, 2004; NASSER *et al.*, 2012). Contudo, é de eficiência limitada, pois só permite a identificação da espécie pelo aspecto morfológico, podendo o exame ser negativo devido à intermitência da eliminação de cistos pelo hospedeiro, e ainda por depender basicamente da habilidade de diagnóstico do microscopista.

Vários métodos foram desenvolvidos para detectar a viabilidade do cisto ou identificar o genótipo, no entanto não existe nenhum que seja capaz de determinar ambas as características.

Para amostras de água o método mais conhecido é o 1623 da *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), método aplicável para a determinação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em matrizes aquosas (USEPA, 2012). Os três componentes gerais do método 1623 incluem a concentração de água por filtração, separação imunomagnética (IMS) dos oocistos e cistos no material concentrado, e identificação e quantificação dos cistos e oocistos por microscopia de imunofluorescência (FA), e caracterizados ainda pela coloração por 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), e microscopia de contraste por interferência diferencial (DIC). Embora seja o método padrão utilizado por pesquisadores e sistemas produtores de água, o método 1623 da

USEPA assim como outros métodos baseadas na identificação microscópica, é limitado, pois não proporcionam informações sobre a viabilidade e infectividade dos (oo) cistos, bem como a identificação das espécies e agrupamentos, informações essas de importância para o campo da saúde pública (ADAMSKA *et al.*, 2010; BAQUE *et al.*, 2011).

Esses métodos não são adequados, portanto para estudos de processos de desinfecção (radiação ultravioleta e outros) onde a medida de viabilidade é essencial. Também não são apropriados para análise de amostras com turbidez elevada como esgoto bruto e águas superficiais com concentração elevada de material particulado (BAQUE *et al.*, 2011). Além disso, o método é de alto custo e pouco acessível para os países em desenvolvimento (FRANCO *et al.*, 2012b).

Adaptações de métodos diagnósticos para concentração de protozoários, como gradientes de densidade alternativos para clarificação e isolamento dos cistos de outros detritos – em amostras de esgoto – fornecem isolamento não seletivo de partículas biológicas e podem resultar em preparações que contenham elevados níveis de contaminantes além de detritos residuais, ocultando os organismos-alvo, na fase de detecção do ensaio (MCCUIN e CLANCY, 2005).

BONATTI *et al.* (2007) compararam o método de centrifugação com o método de centrifugação seguido de purificação e clareamento, para detecção de cistos de *G. intestinalis* em amostras de lodo ativado provenientes de uma ETE na cidade de Campinas, SP. Os autores demonstraram que o método de centrifugação mostrou ser uma alternativa interessante por sua simplicidade, baixo nível de manipulação e aceitável eficiência de recuperação.

No Brasil a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde, requer a avaliação da presença dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas de mananciais destinadas ao consumo humano. As dificuldades no atendimento dessa exigência são a complexidade inerente aos métodos de detecção e a carência de recursos humanos qualificados para o trabalho (FRANCO *et al.*, 2012a).

A PCR é uma importante técnica molecular que tem mostrado resultados sensíveis na detecção de níveis baixos de cistos de *Giardia*. Esta técnica permite detectar

Giardia mesmo em hospedeiros infectados que produzem quantidades insuficientes e não detectáveis por outros métodos tradicionais como microscopia (MCGLADE *et al.*, 2003). Seu emprego na detecção de *Giardia* é importante, pois sua associação a outras técnicas como RFLP ou sequenciamento de DNA possibilita a caracterização molecular dos isolados de amostras clínicas e ambientais (THOMPSON, 2004).

Finalmente o método quantitativo de maior sensibilidade para a detecção de *G. intestinalis* é o PCR em tempo real (*qPCR*) que permite fazer monitoramentos das amostras de forma contínua, em tubos fechados, sem a necessidade de qualquer subsequente e descontínua análise, que requereria uma maior manipulação, como por exemplo a não necessidade de realização de eletroforese (ADAMSKA *et al.*, 2010).

2.6 BIOLOGIA MOLECULAR EM ESTUDOS DE *Giardia intestinalis*.

A biologia molecular tem proporcionado novas e importantes ferramentas para a caracterização e análise de *Giardia*, permitindo reconhecer as diferenças genéticas dentro deste gênero, elucidando seu posicionamento taxonômico e a compreensão da epidemiologia da doença humana. Essa ferramenta permite a detecção do parasita não só a partir de fezes de hospedeiros infectados, mas também seu reconhecimento em amostras ambientais, incluindo a água e esgoto (SINGH, 1997; CACCIÒ *et al.*, 2005; FENG e XIAO, 2011).

As técnicas moleculares têm demonstrado ser altamente sensíveis, específicas e de fácil interpretação (MAHBUBANI *et al.*, 1992; MCGLADE *et al.*, 2003).

Em comparação com outros protozoários patogênicos, as técnicas de genotipagem para *Giardia* não são particularmente avançadas. A grande maioria dos estudos baseiam-se na análise do fragmento 18S *rRNA*, devido a possibilidade de desenhar iniciadores complementares para as suas sequências, e na análise dos genes codificadores da β giardina, *gdh*, *efl α* , *tpi*, *GLORF-C4* (*C4*), e *IGS de rRNA* (*IGS*) (CACCIÒ e RYAN, 2008; ADAMSKA *et al.*, 2010). No entanto, alguns estudos

sugerem a aplicação de abordagens multilocus para a genotipagem para obtenção de resultados mais precisos, mas que resultam muito caros no laboratório de rotina. (CACCIÒ *et al.*, 2005; CACCIÒ *et al.*, 2008; PLUTZER *et al.*, 2010; SIRIPATTANAPIPONG *et al.*, 2011).

O gene *gdh* é útil para a genotipagem de isolados de *Giardia intestinalis*. Por análise da sequência deste *locus*, através da utilização de iniciadores específicos, os isolados podem ser classificados em seu agrupamento e também em seus genótipos AI, AII, BIII e BIV (MONIS *et al.*, 1996).

Nos últimos anos, estudos conduzidos por DURIGAN *et al.* (2009, 2010, 2011) em amostras clínicas de origem humana, animal e amostras ambientais procedentes de rio Atibaia resultaram no desenvolvimento e caracterização de marcadores moleculares de microssatélites para *G. intestinalis*. Os autores detectaram os agrupamentos A, B e D nas amostras, após sequenciamento dos fragmentos dos genes da *β giardina* e *gdh*.

PAULINO (2005) avaliou diferentes protocolos de extração de DNA de cistos de *Giardia* de origem humana e animal, os quais foram utilizados na pesquisa de cistos de *Giardia* em fezes humanas e em água, bem como na caracterização de agrupamentos por meio da técnica de RFLP. O processo físico de extração de DNA com emprego de ultra-som foi o mais eficiente para a extração do DNA de *Giardia*, superando outros processos físicos e químicos. A associação das técnicas de PCR e de RFLP contribuiu de modo significativo, para o diagnóstico mais preciso de *Giardia* em fezes de humanos e de outros animais parasitados.

RIMHANEN-FINNE *et al.* (2001) desenvolveram uma metodologia baseada na separação imunomagnética (IMS) e PCR para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de lodo de esgoto. Os autores avaliaram 44 amostras de lodo e conseguiram identificar a presença de *Giardia* em 20% das amostras, sendo identificado o genótipo B1 de *G. intestinalis*. Os autores concluíram que a metodologia poderia ser utilizada para monitorar a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em uma comunidade, bem como para determinar a contaminação do lodo utilizado como condicionador de solo.

SOUZA *et al.* (2007), no estado de São Paulo, utilizaram amostras de fezes humanas, de cães, gatos e gado para a pesquisa da presença de *Giardia*, utilizando o

gene *gdh* como alvo. Os autores observaram a presença dos agrupamentos AI, AII, B, C, D, E e F de *G. intestinalis* nas amostras estudadas.

VOLOTÃO *et al.* (2007) pesquisaram a presença de *Giardia* em amostras clínicas de fezes de crianças, adultos e de cães e gatos, utilizando métodos moleculares tendo como alvo o gene da β giardina. Os autores observaram frequência de *Giardia* em 66% das amostras de fezes de crianças, e em 1,7% entre os adultos. Um total de 62 amostras positivas foram genotipadas, resultando em 60 amostras identificadas como pertencentes ao genótipo AI e duas pertencentes ao genótipo AII de *G. intestinalis*. A pesquisa em amostras de fezes de animais (29) resultou em 08 amostras positivas para a presença de *G. intestinalis* genótipo AI.

MARK-CAREW *et al.* (2013) em um estudo com amostras de fezes de cães, utilizaram a técnica de PCR com iniciadores específicos para região do gene *ssu-rRNA* de *G. intestinalis*. Os autores obtiveram resultados positivos para os agrupamentos C, D e E de *G. intestinalis*.

SOTIRIADOU *et al.* (2013) avaliaram na Alemanha, amostras de fezes de 81 cães e 19 gatos para a presença de *G. intestinalis* utilizando PCR e o gene *gdh* como alvo. As amostras positivas foram confirmadas e genotipadas por sequenciamento. Os resultados demonstraram a presença de *G. intestinalis* agrupamento A em 6% (5/81) das amostras de fezes provenientes de cachorros e 11% (2/19) das fezes de gatos.

MARTINS *et al.* (2010) avaliaram a variabilidade genotípica de isolados de *G. intestinalis* provenientes de humanos infectados, residentes em cidades da Baixada Santista, no litoral de São Paulo. A caracterização molecular de 43 isolados foi realizada através do sequenciamento parcial dos genes codificadores da *gdh* e da β giardina. Como resultado do estudo foi observado que o agrupamento B de *G. intestinalis* foi o mais frequente na região litorânea, ocorrendo em 53,5% das amostras, enquanto o agrupamento A de *G. intestinalis* foi obtido em 34,8% das amostras.

SOARES *et al.* (2011) avaliaram no Brasil a variabilidade do gene *gdh* e do fragmento *18S rRNA* em amostras de fezes de animais exóticos. Os autores compararam os resultados com sequências homologas, obtidas a partir de amostras de humanos e animais domésticos, com os cistos de *G. intestinalis* obtidos de macacos (*Alouatta*

fusca), chinchilas (*Chinchilla lanigera*), avestruzes (*Struthio camelus*) e jaguar (*Panthera onça*). Os resultados demonstraram a presença do genótipo AI em uma amostra proveniente de jaguar, e as demais foram caracterizadas como pertencentes ao agrupamento B.

ROBERTSON *et al.* (2006a), após a ocorrência de um surto de giardíase na Noruega, avaliaram um tanque séptico que consideravam como sendo a fonte de contaminação. Os autores observaram a presença do agrupamento B de *G. intestinalis* nos indivíduos afetados, enquanto as amostras provenientes do tanque séptico apresentaram o agrupamento A, descartando, portanto o tanque como suspeito da contaminação.

GOMEZ-PUERTA *et al.* (2014) avaliaram 352 amostras de fezes de alpacas de três diferentes áreas do altiplano no Peru, as quais foram amplificadas por *nested* PCR e genotipadas utilizando o locus *tpi*. Foi detectada em 13% das amostras *G. intestinalis*, e foram identificados os agrupamentos AI, AII e E.

Apesar de todo desenvolvimento metodológico, são ainda fatores limitantes para a detecção molecular de protozoários parasitas como a *Giardia*, principalmente em amostras ambientais (1) as dificuldades de remoção de diferentes interferentes ou inibidores presentes nas diferentes matrizes, (2) a obtenção de DNA de qualidade e em quantidade aceitável, (3) a baixa reprodutibilidade, além do (4) elevado custo. Estes fatores dificultam a realização de estudos que tenham como alvo a *G. intestinalis* em amostras ambientais, e consequentemente levando à escassez de informação sobre a disseminação desses organismos.

A seguir, o Quadro 2 apresenta um resumo dos trabalhos de detecção de cistos de *Giardia* em esgoto bruto, segundo as concentrações de cistos obtidas e técnicas utilizadas no período de 1991 a 2013. Através desse quadro podem ser observados que as pesquisas apresentam diversas metodologias, inclusive técnica de genotipagem, demonstrando a necessidade de estudos complementares que permitam padronizar um método prático, econômico e reprodutível, o qual possa ser empregado em amostras de esgoto bruto na rotina laboratorial.

Quadro 2. Pesquisas para detecção de cistos *Giardia* sp. em amostras de esgoto bruto, segundo procedência, tipo de detecção e caracterização molecular.

Procedência		N° de cistos/L	Técnica	N° de amostras positivas (%)	Genotipagem		Referência
País	Local				Marcador	Agrupamento (Número de amostras positivas)	
USA	11 ETE	6 a 14.000	Microscopia	11/11 (100)	Nr		JAKUBOWSKI <i>et al.</i> , 1991
França	ETE	9,5 x 10 ³ a 1,4 x 10 ⁴	Contagem ^e	533/539 (99)	Nr		GASSMANN e SCHWARTZBROD, 1991
USA	ETE	1,3 x 10 ⁴	IFA ^d	11/11 (100)	Nr		MAYER e PALMER, 1996
Canadá	72 Municípios	<1.000 a 88.000	IFA	119/164 (73)	Nr		WALLIS <i>et al.</i> , 1996
Inglaterra	7 ETE	10 a 13.600	IFA	63/81 (78)	Nr		BUKHARI <i>et al.</i> , 1997
Japão	ETE	0,04 a 0,48	IFA	12/13 (92)	Nr		HASHIMOTO <i>et al.</i> , 2001
Canadá	16 ETE	160 a 3.980	IFA	81/166 (49)	Nr		HEITMAN <i>et al.</i> , 2002
Itália	4 ETEs	2,1x10 ³ a 4,2x10 ⁴	IFA	16/16 (100)	<i>β giardina</i> ^a	A(8), A+B(8)	CACCIÒ <i>et al.</i> , 2003
Canadá	ETE	2.380 a 9.900	IFA	6/6 (100)	<i>β giardina</i>	A e B (6)	GUY <i>et al.</i> , 2003
		2.653 a 13.408	qPCR	6/6 (100)			
USA	ETE	520 a 8.920	IFA	52/52 (100)	<i>tpi</i> ^b	A (111), B(20)c	SULAIMAN <i>et al.</i> , 2004
França	ETE	3.3 x 10 ² a 4.3 x 10 ³	IFA	6/6 (100)	Nr		BERTRAND <i>et al.</i> , 2004
		2.5 x 10 ² a 2.3 x 10 ³	qPCR				
Brasil (SP)	ETE	1 x 10 ⁵	IFA	48/53	Nr		CANTUSIO NETO <i>et al.</i> , 2006
Itália	ETE	1.83 x 10 ³	IFA	4/4 (100)	<i>SSU rRNA</i> ^b	A(3), B(1)	LONIGRO <i>et al.</i> , 2006
Noruega	40 ETE	100 a 28.000	IFA	37/40(93)	<i>SSU rRNA</i>	A(23)	ROBERTSON <i>et al.</i> , 2006b
					<i>Gdh</i>	AI+AI(3), AII(3),BIII(1)	
					<i>β giardina</i>	AII(5), AIII(14),BIII(2)	
Suécia	4 ETE	300 a 3.900	IFA	19/19(100)	Nr		OTTOSON <i>et al.</i> , 2006
Bulgária	ETE	278 a 1.208	IFA	3/7(43)	Nr		KARANIS <i>et al.</i> , 2006
Malásia	2 ETE	18 a 8.480	IFA	24/24 (100)	Nr		LIM <i>et al.</i> , 2007
França	2ETE e Abatedouro	530 a 11.000	qPCR	36/36 (100)	<i>Tpi</i>	A(8), A+B(15), B(1), B+E(7), E(4)	BERTRAND e SCHWARTZBROD, 2007.
		920 a 9.700					
Tailândia	ETE	598 a 937	qPCR	2/2 (100)	<i>β giardina e SSU rRNA</i>	A+B(2)	ANCENO <i>et al.</i> , 2007
Espanha	12 ETE	89 a 8.305	IFA	12/12 (100)	<i>β giardina</i>	AI(2), AII(3), AI+E(5), AII+E(2)	CASTRO-HERMIDA <i>et al.</i> , 2008a
Hungria	6 ETE	320 a 5.760	IFA	6/6 (100)	<i>Gdh</i>	AII(2), AII+BIII(2), AII+BIV(1)	PLUTZER <i>et al.</i> 2008
					<i>SSU rRNA</i>	A(5), A+B(1)	
Noruega	4 ETE	300 a 8.900	IFA	16/16 (100)	<i>β giardina</i>	AIII + B(1), AII(1)	ROBERTSON <i>et al.</i> , 2008
					<i>Gdh</i>	AII(3), B(5)	
					<i>Tpi</i>	A(7), B(2)	
Brasil (SP)	3 ETE /Lago	Nr		4/5 (80)	<i>Gdh</i>	AII(3), B(1)	FERNANDES, 2009
Tunísia	17 ETE	538 a 1.200	Bailenger [§]	174/174 (100)	Nr		BEN AYER <i>et al.</i> , 2009
Irlanda	4 ETE	0 a 320	IFA	4/4 (100)	Nr		CHENG <i>et al.</i> , 2009
China	2 ETE	Nr		23/48 (48)	<i>tpi</i> ^b	AII(18), B(6), AII+B(1)	LIU <i>et al.</i> , 2011
Brasil (SP)	ETE	7,38 x 10 ⁴ a 1,34 x 10 ⁵	IFA	48/53(91)	Nr		SANTOS <i>et al.</i> , 2011
Espanha	3 ETE	3.8×10 ² a 1.4×10 ³	IFA	14/14 (100)	Nr		ALONSO <i>et al.</i> , 2011
China	19 ETE	Nr		319/386 (83)	<i>Tpi</i>	AII(243), B(5), AII+B(54)*	LI <i>et al.</i> , 2012
Alemanha	8 ETE	0 a 2436	IFA	78/95 (82)	Nr		GALLAS-LINDERMANN <i>et al.</i> , 2013
Brasil (SP)	4 ETE	30 a 1,9 x 10 ⁴	IFA	24/24 (100)	Nr		HACHICH <i>et al.</i> , 2013

Legenda: ^a-PCR-RFLP e sequenciamento; ^b-PCR *nested* sequenciamento; Nr - não realizada; ^c- diferentes genótipos encontrados; ^d- Ensaio de imunofluorescência; ^e- contagem tipo Thoma; [§] Técnica Bailenger modificado.

2.7 COBERTURA NO TRATAMENTO E COLETA DE ESGOTO

2.7.1 Brasil

No Brasil segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2010), 71,8% dos municípios do país não tinham uma política municipal de saneamento básico, e somente 28,2% dos municípios brasileiros tratam todo o esgoto coletado, o que impacta negativamente na qualidade dos recursos hídricos.

Segundo LEONETI *et al.* (2011) o saneamento básico no Brasil está caracterizado pela desigualdade regional causada pelos fatores socioeconômicos, como nas populações nas regiões Norte e Nordeste em comparação com as outras regiões.

No último “Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos” do ano 2011, elaborado pela Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental (SNSA), foi avaliado o abastecimento de água em 97,3% municípios e o esgotamento sanitário em 86,6%, municípios, da população urbana de Brasil (SNSA, 2013).

Segundo dados da SNSA foi demonstrado que a cobertura de esgotamento sanitário da população urbana no país teve índice médio de 55,5%, entanto que o tratamento dos esgotos gerados chegou ao volume médio nacional de 37,5%, destacando-se a região Centro-Oeste com 44,0%, seguida pela região Sudeste com 41,2%, região Sul com 34,6%, região Nordeste com 30,1% enquanto que na região Norte apenas 12,7% (SNSA, 2013).

O estado de São Paulo possui uma cobertura coletora de esgotos de 89,8% na zona urbana, e no total de 86,3%, no entanto, o tratamento de esgoto abrange apenas 48,1% do esgoto coletado (SNSA, 2013).

Segundo informação da SABESP (<http://site.sabesp.com.br/>, acesso: em 29 de Novembro de 2013), 27,9 milhões de pessoas são atendidas, o que corresponde a 70% da população urbana do Estado de São Paulo.

No ano de 2011, a rede coletora de esgotos da Sabesp cobria 87,1% da população urbana e 83,9% da população total enquanto que a cobertura do tratamento esgoto foi de 72,4% de esgoto coletado, e 48,3% de esgoto gerado (SNSA, 2013).

2.7.2 Peru

Segundo o *Instituto Nacional de Estadística e Informática* (INEI) (2012) a porcentagem de tratamento de esgoto no Peru é bastante reduzido, o que representa um importante problema para a saúde pública neste país. Portanto, o esforço por alcançar 100% de cobertura de água para consumo humano e de esgotamento sanitário, deverá ser acompanhado por um planejamento territorial das grandes cidades, que deve ser tomado como referência para a própria abordagem de cada Empresa Prestadora de Serviços de Saneamento (EPS) (KRMELJ e CONTRERAS, 2013).

A epidemia de cólera de 1991 foi causada principalmente pelas graves deficiências no saneamento básico no país. No período de 1991 a 1994 foram relatados 625.259 de casos de coléra no Peru, representando 60% do número total de casos de cólera na América Latina (SEAS e GOTUZZO, 1996; MAGUIÑA *et al.*, 2010). O problema forçou o governo Peruano a aumentar o investimento em saneamento nas zonas rurais, que até então era ínfimo (OBLITAS, 2011). O crescimento descontrolado das populações nas grandes cidades dificulta a obtenção de melhores níveis de cobertura.

Segundo o último relatório da *Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento* (SUNASS), a cobertura de água para consumo humano em nível nacional é de 88,5% nas regiões urbanas, e a cobertura de esgotamento sanitário é de 80,2% (SUNASS, 2012).

No entanto, conforme dados do último relatório da SUNASS, no que se refere a cobertura do tratamento de esgoto no país, nos diferentes departamentos ou Estados, atinge 32,7%, demonstrando a gravidade do assunto. Essa porcentagem está muito longe de atingir cobertura completa e existe também pouco interesse do Estado no problema,

já que muitas das EPS, não tratam o esgoto expondo desnecessariamente a população aos consequentes problemas sanitários (SUNASS, 2012).

Nos casos específicos da cidade de Lima e do Município⁴ constitucional do Callao, os dados demonstram que o tratamento de esgoto, até o ano de 2011, pela maior empresa do setor em todo o país, Sedapal, foi de apenas 20,7% (SUNASS, 2012).

Até o final do ano de 2012, Sedapal, tinha 19 estações de tratamento de esgoto entre Lima e Callao, as quais ainda não lhe permitiram chegar a uma ampla cobertura. Porém, a construção de duas novas ETEs, ETE "Taboada", localizada em Callao, com operações iniciadas em março de 2013, a qual possui uma capacidade média máxima de tratamento de 20 m³/s de esgoto, e quando estiver em pleno funcionamento permitirá que a cobertura de tratamento atinja o 75%. E em 2015, com a conclusão e início das operações da ETE, "La Chira", no sul de Lima, a previsão é de que a cobertura de tratamento de esgoto irá atingir 100% na cidade (MOSCOSO, 2011; KRMELJ e CONTRERAS, 2013).

2.8 AÇÕES REGULATÓRIAS

Nos esgotos brutos foram detectadas altas concentrações de cistos de *Giardia* (GASSMANN e SCHWARTZBROD, 1991; CACCIÒ et al., 2003; ROBERTSON et al., 2006b; LIU et al., 2011; HACHICH et al., 2013). Estes esgotos lançados "in natura", inadequadamente tratados ou não tratados podem contaminar as águas de abastecimento público, comprometendo a saúde da população.

A evolução histórica das legislações brasileiras em relação à água para consumo humano é apresentada no Quadro 3, o qual destaca a inclusão do monitoramento dos diversos indicadores microbiológicos, em especial, o monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., inicialmente como recomendação e atualmente como exigência. Na portaria atual do Ministério da Saúde nº 2.914 de 2011

⁴ No Peru, Província é equivalente ao Município no Brasil.

exige este monitoramento somente quando for identificada uma média geométrica anual maior ou igual a 1.000 *E. coli*/100mL nos pontos de captação de água de mananciais superficiais.

No Brasil, gradualmente, as práticas de reuso direto de esgoto tratado proveniente de ETEs para fins urbanos tornaram-se práticas de racionalização dos demais recursos hídricos no Estado de São Paulo. Por conseguinte, foi instituído um grupo de trabalho inter-secretarias: Secretaria de Estado da Saúde (SES), Secretaria de Estado do Meio Ambiente (SMA) e Secretaria de Estado de Saneamento e Recursos Hídricos (SSRH), para a elaboração de uma resolução conjunta, com o objetivo de regulamentar os aspectos ambientais e de saúde pública. A minuta desta normativa entrou em consulta pública em 2013 e atualmente se encontra em revisão (CETESB, 2013).

Dentre os padrões de qualidade estabelecidos na minuta, destaca-se a inclusão do parâmetro microbiológico que propõe um valor máximo permitido de <0,05 cistos/L de *Giardia*, com a importância de garantir seu monitoramento no meio ambiente, devido aos riscos decorrentes que representa sua presença para a saúde pública (CETESB, 2013).

Quadro 3. Evolução histórica da Legislação para água para consumo humano no Brasil.

Ano	Agência	Tipo	Indicadores Microbiológicos					Referência
			Coliformes totais (em 100mL) ^{a,b}	Coliformes termotolerantes ou <i>E. coli</i> (em 100mL) ^b	Contagem de bactérias heterotróficas	Cianobactérias	<i>Giardia</i> spp.	
1946	SP	DL nº 15.642	Aus	-	-	-	-	SP, 1946
1958	SP	DE nº 33.047	Aus	-	-	-	-	SP, 1958
1977	MS	Portaria BSB nº 56	Presença de 4 ou mais/100mL em amostra padrão	-	-	-	-	MS, 1977
1990	MS	Portaria nº 36	Aus ^c	Aus	≤500 UFC	-	-	MS, 1990
2000	MS	Portaria MS nº 1.469	Aus ^c	Aus	≤500 UFC	≤20.000 células/ml	Recomenda-se sua inclusão na pesquisa	MS, 2000
2004	MS	Portaria MS nº 518	Aus ^c	Aus	≤500 UFC	≤20.000 células/ml	Recomenda-se sua inclusão na pesquisa	MS, 2004
2011	MS	Portaria 2.914	Aus ^c	Aus	≤500 UFC	≤20.000 células/ml	GM ≥ 1.000 <i>E. coli</i> /100mL deve-se realizar monitoramento de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp.	MS, 2011

Legenda: MS – Ministério da Saúde; SP – Governo do Estado de São Paulo; UFC— Unidades Formadoras de Colônias; GM – média geométrica anual; DL– Decreto-Lei; DE – Decreto Estadual; Aus – Ausência;

^a Indicador de eficiência de tratamento.

^b Indicador de contaminação fecal.

^c Ausência em 100 mL quando a amostra for coletada na saída do tratamento. No sistema de distribuição (reservatórios e rede) o 95% das amostras deverão apresentar ausência de coliformes totais em 100 mL das amostras examinadas no mês. Nos 5% das amostras restantes, serão tolerados até 3 coliformes totais em 100mL, desde que isso não ocorra em duas amostras consecutivas, coletadas sucessivamente no mesmo ponto.

No caso do Peru, o decreto supremo do Ministério de Meio Ambiente (MINAM) n°003 de 2010 determina os limites máximos dos parâmetros físicos, químicos e biológicos permitidos para os efluentes das ETES domésticos e municipais. Ainda não foram definidos os parâmetros microbiológicos de reutilização dos esgotos tratados (MOSCOSO, 2011).

Apesar de não existir legislação específica para a reutilização dos esgotos domésticos tratados, estima-se que 4.000 ha de terras agrícolas sejam irrigadas com esgoto bruto nas áreas litorâneas e peri-urbanas. Tal estimativa poderia chegar a 11.200 ha se fosse utilizado a totalidade dos esgotos gerados pelas cidades do litoral peruano (PERREZ CORDON et al, 2008).

Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que um dos principais riscos para a saúde humana é a presença de parasitas humanos nos esgotos tratados, especialmente de protozoários parasitas. No entanto, as normas peruanas ainda não tratam o assunto com a necessária atenção (MOSCOSO, 2011).

Por outro lado, no atual regulamento específico para água de consumo humano, decreto supremo do Ministério da Saúde n°031 (MINSA, 2010), exige a ausência de cistos e oocistos de protozoários patogênicos quando for detectada presença de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *E. coli*, coliformes totais e termotolerantes em 100mL de água de consumo humano.

3. JUSTIFICATIVA

A presença de *Giardia* em amostras ambientais, como em esgoto, ainda é pouco documentada na América Latina em geral. A grande maioria dos estudos que relataram a ocorrência desse protozoário em amostras ambientais foi documentada na América do Norte e na Europa (KARANIS *et al.*, 2007; BALDURSSON e KARANIS, 2011), em países desenvolvidos onde as vigilâncias epidemiológica e ambiental, e sistemas de notificação para doenças infecciosas estão bem estabelecidos.

Segundo a OMS (2011) as intervenções para a melhoria na qualidade da água de consumo proporcionam benefícios significativos para a saúde. No entanto, sem conhecer a distribuição real de cistos deste protozoário parasita em água, é difícil determinar o risco que estes representam para a população humana.

Devido à elevada resistência desses protozoários aos processos convencionais de tratamento, *E. coli* ou os coliformes termotolerantes não podem ser considerados como indicadores da presença de protozoários patogênicos na água e no esgoto (OMS, 2011); motivo pelo qual são necessários estudos que proponham técnicas para detecção precisa da presença de *Giardia* patogênica ao homem, que possam ser aplicadas no monitoramento de sistemas de tratamento de água ou esgoto, e que forneçam subsídios para implementação das legislações acerca deste assunto, com a finalidade de garantir a qualidade do produto final, preservando os mananciais de contaminação com esses parasitas e principalmente a proteção da saúde da população.

Embora seja preconizada a utilização da metodologia 1623 da USEPA, por várias companhias de água e esgoto, essa metodologia conforme mencionado anteriormente é limitada, pois não permite determinar as espécies de *Giardia* ou seus agrupamentos, bem como a viabilidade desses (ADAMSKA *et al.*, 2010; BAQUE *et al.*, 2011).

A determinação de agrupamentos de importância clínica para o homem no ambiente é importante para o entendimento da epidemiologia desses protozoários e consequentemente para políticas em saúde pública. A introdução de técnicas moleculares como a PCR, que permitam diferenciar os diferentes agrupamentos de

Giardia intestinalis, ou detectar aqueles de importância para a saúde humana na rotina de laboratório requer a elaboração de procedimentos simples e econômicos para que possam ser implantados em todo território nacional, no Brasil e no Peru.

A carência de estudos que objetivem a detecção do agrupamentos de importância para a saúde humana de *Giardia intestinalis* em amostras de esgoto bruto é a principal justificativa para a realização deste estudo.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Detectar por meio da técnica de PCR a presença de *Giardia intestinalis* e os agrupamentos A e B de importância para a saúde humana em amostras de esgoto bruto obtidos do Estado de São Paulo, Brasil e da cidade de Lima, Peru.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o fragmento correspondente ao gene *gdh*, específico para *Giardia intestinalis* a partir de amostras de esgoto provenientes de pontos de entrada (portos, aeroportos e estações rodoviárias) do Estado de São Paulo, SP – Brasil, e da cidade de Lima, no Peru.
- Detectar a presença dos agrupamentos A e B nas diferentes amostras, por meio de PCR com iniciadores específicos para os dois agrupamentos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESCRIÇÃO DOS PONTOS E MÉTODO DE AMOSTRAGEM

5.1.1 São Paulo

O estado de São Paulo (Fig. 3) está situado na Região Sudeste da República Federativa do Brasil, e tem por limites os estados de Minas Gerais a norte e nordeste, Paraná a sul, Rio de Janeiro a leste e Mato Grosso do Sul a oeste, além do Oceano Atlântico a sudeste.

Figura 3- Mapa administrativo do estado de São Paulo, Brasil. Pontos de coleta indicados em vermelho. Fonte: <http://www.visualmapas.com.br>

A amostragem foi realizada em seis pontos de coleta de esgoto bruto de quatro municípios, do estado de São Paulo: São Paulo, Guarulhos, Campinas e Santos. Esses municípios foram selecionados por serem locais que recebem esgoto representativo da população em trânsito e são importantes pontos de entrada de pessoas no país e no Estado, como portos, aeroportos e estações rodoviárias. Estes locais de coleta fazem parte do programa de vigilância ambiental de *Vibrio cholerae* no Estado de São Paulo sob supervisão da CETESB (Quadro 4).

Foram realizadas três coletas, durante os meses de Julho e Agosto de 2012, nos seis pontos referidos, resultando em 18 amostras no total.

Quadro 4. Pontos de coleta e identificação das amostras de esgoto bruto no estado de São Paulo. Julho – Agosto, 2012.

Local	Data coleta		
	10/07/12	23/07/12	07/08/12
Aeroporto de Viracopos, Campinas, SP.	1M	11M	19M
Emissário Rebouças, Santos, SP.	3M	10M	18M
Terminal Rodoviário Barra Funda, SP.	4M	12M	20M
Aeroporto de Congonhas, SP.	5M	13M	21M
Aeroporto de Cumbica, Guarulhos, SP.	6M	14M	23M
Terminal Rodoviário Tietê, SP.	7M	15M	22M

Legenda: M — mecha, SP — São Paulo.

5.1.2.1 Preparo e concentração das amostras de esgoto

A amostragem foi realizada por meio da técnica de Moore modificada, também conhecida por mecha de gaze (MOORE *et al.*, 1952; BARRET *et al.*, 1980) utilizada no programa de monitoramento de *V. cholerae* e Poliovirus da CETESB (Fig. 4). O método consiste em submergir a mecha no esgoto bruto, por um período de 3 e 7 dias, permitindo a concentração dos micro-organismos na mecha (CETESB, 1992).

Após esse período as amostras são acondicionadas em saco plástico contendo o meio Carry-Blair, para seu transporte até o laboratório, as quais foram armazenadas em geladeira a 4°C.

Figura 4 – (A) Esquema de mecha degaze empregada na técnica de Moore; (B) Mecha de gaze e meio de Carry-Blair.

Fonte: CETESB, 2011.

Ainda no laboratório da CETESB, as amostras foram homogeneizadas e volumes de 50mL foram coletados, diretamente do material proveniente de cada mecha, em tubos para centrifugação de tipo “Falcon”, e transportadas para o Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP. Após o qual foram armazenados em freezer - 20°C para posterior extração do DNA genômico.

5.1.2 Lima

Lima é a capital da República do Peru e está localizada no deserto costeiro central do país, no sopé da vertente ocidental dos Andes centrais, às margens do Oceano Pacífico (Fig. 5). Embora inicialmente fosse fundada no vale do rio Rimac, agora se estende ao longo de grandes áreas desérticas e atinge os vales do Chillon ao norte e

Lurín ao sul. Sua Praça de Armas está localizada a uma altitude de 161 metros acima do nível do mar (msnm), enquanto que o distrito de Lurigancho-Chosica alcança 950 msnm (INEI, 2000).

Lima contorna o litoral, delimita ao norte com a província de Huaral, ao sul com a província de Cañete, e para o leste, divisa com a província de Huarochirí (INEI, 2000).

Figura 5 - Mapa da cidade de Lima Metropolitana, Peru. Pontos de coleta indicados em vermelho. Fonte: <http://elsol.idiomasperu.com/maps>

No período de janeiro a março de 2013, dentro da estação de verão, foram coletadas amostras de esgoto bruto pertencentes a dois pontos de entrada na Planta de Tratamento de Águas Residuais (PTAR) de Carapongo – SEDAPAL (Fig 6). Essa ETE situa-se na zona leste da cidade, no bairro de Ate, situado a 535 msnm, no km 17,5 da

estrada “Central” ou “PE-22”, a qual comunica a cidade de Lima com a serra central sul do país, especificamente com o Estado de Junín (INEI, 2000).

O esgoto era proveniente de dois bairros, uma de área urbana, Chosica, pertencente ao bairro de Lurigancho-Chosica, com alta quantidade de dejetos industriais e domésticos (Fig. 8) e outro semi-urbano, comunidade de Huaycán, pertencente ao bairro de Ate, com muitas áreas de difícil acesso, com falta de serviços públicos em diversas regiões em especial aqueles situados perto ou em morros, com elevada quantidade dejetos do tipo doméstico (Fig.7).

Figura 6 - Vista da ETE (ou PTAR) de Carapongo – SEDAPAL, Lima.

A

Fonte: <http://julieta-lunera.blogspot.com.br/>

B

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 7- A- Vista da comunidade de Huaycán (Ate); **B-** ponto de coleta na ETE.

A

Fonte: territorialblog.wordpress.com

B

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 8 – A- Vista do bairro de Chosica; **B-** ponto de coleta na ETE.

A amostragem foi realizada com a ajuda da equipe técnica do laboratório de qualidade da ETE de Carapongo (Anexo 1), os pontos e as datas de coleta bem como a identificação estão descritos no Quadro 5.

Quadro 5. Pontos de coleta de esgoto bruto e identificação das amostras na cidade de Lima (Peru). Janeiro – Março, 2013.

Local	Data coleta				
	03/01/13	10/01/13	07/02/13	12/02/13	01/03/13
Huaycán, Ate (Bairro A)	1P	3 P	5 P	7 P	9 P
Chosica (Bairro B)	2 P	4 P	6 P	8 P	10 P

Legenda: P – Peru, Bairro A – semi-urbano, Bairro B – urbano.

5.1.2.1 Preparo e concentração das amostras de esgoto

Para o esgoto bruto do Bairro A foram coletados 150 mL distribuídos em três tubos de tipo “Falcon” de 50mL; e para o Bairro B, foram coletados 100 mL distribuídos em dois tubos de tipo “Falcon” de 50mL. No dia da coleta, as amostras foram encaminhadas a temperatura ambiente, para o Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Veterinária da UPCH, na cidade de Lima, para serem posteriormente agrupadas e centrifugadas a 1500g por 15 minutos sem a adição de processos de clarificação (ROBERTSON *et al.* 2000), os sobrenadantes foram descartados e o sedimento com um pequeno volume do sobrenadante foram transferidas para tubos de tipo “Falcon” de 15mL.

As amostras foram mantidas em geladeira em temperaturas entre 6 e 8 °C até o momento de seu transporte, a temperatura ambiente em bagagem de mão por via aérea, para sua posterior extração do DNA genômico no Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP.

As amostras provenientes de Lima após a chegada ao laboratório de Saúde Pública foram ressuspendidas os sobrenadantes e sedimento, e foram novamente concentradas pelo método de centrifugação a 1500g por 15 minutos sem a adição de processos de clarificação (ROBERTSON *et al.* 2000), os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos transferidos com um pequeno volume do sobrenadantes para microtubos do tipo eppendorf de 2mL que foram mantidos em freezer -20°C até o momento da extração do DNA genômico.

5. 2 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE ESGOTO

Foi realizada com o emprego do *kit* comercial, *QIAamp DNA Stool Mini Kit*[®] (Qiagen, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Inicialmente a suspensão de cistos foi aquecida em solução de lise por 10 minutos a 95°C com a finalidade de promover a ruptura das membranas celulares e incrementar a detecção desses parasitas (LELES *et al.*, 2009). Ao final do processo o material genético foi recuperado em tampão TEII pH 8 [10 mM tris Hcl pH 7.5;0.1 mM EDTA pH 8.0] e armazenados em refrigerador a 4°C.

5.3 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE – PCR

5.3.1 Reações para detecção de *G. intestinalis*

A reação para detecção de *G. intestinalis* nas amostras foi realizada em sistema *Nested* PCR, ou PCR dupla, para superar o inconveniente do número reduzido de organismos nas amostras.

Na primeira fase, foram utilizados iniciadores para detecção do gene *gdh* seguindo o protocolo descrito por CACCIÒ *et al.* (2008) com modificações (Quadro 6).

As reações foram efetuadas em termociclador *Mastercycle Gradient* (Eppendorf®) utilizando os iniciadores Gdh1 e Gdh2, para a primeira reação, nas seguintes condições: água ultrapura (Milli-Q®) em quantidade suficiente para volume final de 25µL de reação, 5µL do DNA, 5 µL de tampão de reação 5X, 2mM de MgCl, 200uM de solução de DNTPs, 0,3µM de cada um dos iniciadores, e 1,25U de GoTaq polimerase (Promega – Madison, WI USA). Em cada tubo contendo amostra foi adicionado 1µL de solução de PVP 1% p/v para prevenção da ação de inibidores que poderiam estar ainda presentes nas amostras. Para a segunda reação (*nested*), os iniciadores Gdh3 e Gdh4 foram utilizados nas mesmas condições anteriores excetuando a adição de solução de PVP 1%.

As condições de ciclos térmicos foram mantidas de acordo para a primeira reação, porém o número de ciclos foi elevado para 60, ficando assim composto: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 60 ciclos composto de: desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 50°C por 30 segundos; e extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. As condições de ciclo para a segunda amplificação foi modificada de forma que a temperatura de anelamento foi de 51°C e o número de ciclos também foi elevado para 60.

Para as amostras utilizadas nesse estudo a segunda reação, *nested*, foi realizada em 5 réplicas, também com a finalidade de superar o possível reduzido número de cistos na amostra.

Após a reação de PCR os tubos contendo as 5 réplicas de cada amostra, foram agrupados e purificados utilizando kit *Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE® Healthcare, Buckinghamshire, UK). O material genético resultante da purificação foi recuperado em 30 uL de água livre de DNA e RNA e mantido em Freezer -20°C até o momento do uso.

Para a reação de amplificação do gene *gdh* por *nested* PCR é esperada a produção de fragmento de 530 pb após a segunda reação.

Quadro 6. Lista de iniciadores utilizados no presente para a amplificação de fragmento do gene *gdh* de *Giardia*.

Genótipo	Tipo	Sequência, 5'-3'	Tamanho fragmento	Referência
<i>Giardia intestinalis</i>	Gdh1 F	TCCGTRTYCAGTACAACTC	754pb	CACCIÒ <i>et al.</i> , 2008
	Gdh2 R	ACCTCGTTCTGRGTGGCGCA		
	Gdh3 F	ATGACYGAGCTYCAGAGGCACGT	530pb	
	Gdh4 R	GTGGCGCARGGCATGATGCA		
<i>Giardia intestinalis</i>	GDHgen F	CARAGGCACGTYGGSGCY	122 pb	Este estudo
	GDHgen R	SAGGAACGAGTTYACVGGVGT		
Agrupamento A	GiaA F	CGGGCTATGGCGCTGTC	170pb	
	GiaA R	TTGTTCGACAATGGTCCCGT		
Agrupamento B	GiaBBF	GATATTGGCGTCGGCGG	143pb	
	GiaBBR	AGCTCCATACCCTGTGGCCT		

Legenda: F, forward; R, reverse.

5.3.2 Confirmação da presença de *G. intestinalis* e detecção dos agrupamentos A e B de *G. intestinalis*.

Com o objetivo de detectar a presença dos agrupamentos de interesse de *G. intestinalis*, sem a necessidade de sequenciamento do fragmento de 530 pb oriundo da *nested* PCR descrito por CACCIÒ *et al.* (2008), foram desenhados iniciadores específicos para *G. intestinalis* e dentre esses os agrupamentos A e B de interesse para a saúde humana, para serem utilizados em reações de reamplificação a partir do produto purificado (Quadro 6). Este processo foi denominado aqui de *rePCR* (BONNET *et al.*, 1998; BÖCKELMANN *et al.*, 1999; LORKOWSKI e CULLEN, 2003).

As reações para a confirmação da presença da espécie *G. intestinalis* e a detecção dos agrupamentos A e B nas amostras de esgoto foram realizadas utilizando três pares de iniciadores internos específicos, GDHgen F e GDHgen R para confirmação da espécie *G. intestinalis*: GiaAF, GiaAR; e os iniciadores GiaBBF e GiaBBR para os agrupamentos A e B respectivamente (Quadro 6). Para a realização da PCR foi empregado o termociclador *Mastercycle Gradiente* (Eppendorf®).

5.3.2.1 Condições e ciclos da Reação para confirmação da presença de *G. intestinalis*

Foram utilizados 3 µL do produto purificado da segunda reação descrita por CACCIÒ *et al.* (2008), água ultrapura (Milli-Q®) em quantidade suficiente para volume final de 25µL de reação, 5 µL de tampão de reação 5X, 2mM de MgCl, 200uM de solução de DNTPs, 0,3µM de cada um dos iniciadores e 1,25U de GoTaq polimerase (Promega – Madison, WI USA).

Ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 60 ciclos composto de: desnaturação a 95°C por 45 segundos; anelamento a 50°C por 30 segundos; e extensão a 72°C por 10 segundos e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 segundos. O fragmento esperado para a reação era de 122 pb.

5.3.2.2 Condições e ciclos de Reação para confirmação da presença de agrupamentos A e B de *G. intestinalis*

Tanto para os iniciadores para o agrupamento A quanto para o agrupamento B foram utilizados 3 µL do produto purificado da segunda reação descrita por CACCIÒ *et al.*, (2008) em reações separadas contendo: água ultrapura (Milli-Q®) em quantidade suficiente para volume final de 25µL de reação, 5 µL de tampão de reação 5X, 2,5mM de MgCl, 200uM de solução de DNTPs, 0,2µM de cada um dos iniciadores e 1,25U de GoTaq polimerase (Promega – Madison, WI USA).

Ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 45 ciclos composto de: desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento a 66°C por 10 segundos; e extensão a 72°C por 10 segundos e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 segundos. Os fragmentos esperados para as reações eram de 170 pb para o fragmento correspondente ao agrupamento A e 143 pb para o agrupamento B.

A figura 9 apresenta o fluxograma da sequencia das PCRs realizadas até a confirmação da presença de *G. intestinalis*, e dos agrupamentos A ou B.

Figura 9 - Fluxograma da sequência das PCRs realizadas até a confirmação da presença de *G. intestinalis*, agrupamentos A ou B.

5.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A presença dos fragmentos com os tamanhos esperados para cada reação de PCR foi visualizado por meio de eletroforese em gel de Agarose 3% (Amersham Biosciences) corado com Brometo de etídio (5µg/mL) em Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. Foram aplicados no gel de Agarose 10 µL da mistura do *amplicom* adicionado de tampão carregador de amostra [glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v)] na proporção 4:1. Um microlitro de marcador de peso molecular (GeneRuler 50 bp DNA “*ladder*”, Fermentas, USA) foi utilizado nas linha externas do gel, flanqueando as amostras. A eletroforese foi realizada sob intensidade de corrente de 6V/cm por 2 horas.

O gel foi visualizado sob fonte de luz ultravioleta em sistema de captura de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e do Software Labworks (UVP), e fotografado para análise posterior.

5.5 CONTROLE POSITIVOS E NEGATIVOS

Para controle de reação foram utilizados fragmentos do gene alvo (*gdh*) inseridos em vetor plasmidial, previamente sequenciados e identificados: *G. intestinalis* agrupamento A (GQ503134), *G. intestinalis* agrupamento B (GQ503115) (FERNANDES *et al.*, 2009), e ainda *pool* de amostras positivas, incluindo uma amostra clínica humana como controle positivo, identificada como *G. intestinalis* agrupamento B. Como controles negativos foram utilizados uma amostra de água superficial previamente identificada como negativa para a presença de *G. intestinalis*, e ainda um tubo sem presença de DNA que foi utilizado como “Branco” assim como está descrito no Quadro 7.

Quadro 7- Amostras controles utilizadas nesse estudo para detecção de *Giardia intestinalis* e agrupamentos A e B.

Tipo	Identificação	Número Coleção de Cultura (Acesso GenBank)	PCR		
			<i>Giardia intestinalis</i>	Genótipo A	Genótipo B
Controles Positivos	<i>G. intestinalis</i> Agrupamento A	FSP93/10 (GQ503134)	+	+	-
	<i>G. intestinalis</i> Agrupamento B	FSP89/12 (GQ503115)	+	-	+
	Amostra Clínica <i>G. intestinalis</i> Agrupamento B	-	+	-	+
Controles Negativos	Amostra água superficial 2A*	-	-	-	-
		-	-	-	-

Legenda: + Positivo; - Negativo; *Amostra previamente analisada e negativa para *Giardia* por PCR e por 1623 USEPA.

6. RESULTADOS

6.1 DETECÇÃO DE *Giardia* POR PCR

A pesquisa de *G. intestinalis*, utilizando a técnica de reamplificação por PCR (*rePCR*) nas amostras estudadas evidenciou que dentre as 28 amostras de esgoto bruto avaliadas, 18 provenientes de seis pontos de coleta do estado de São Paulo e 10 amostras de esgoto bruto coletadas em dois pontos em uma ETE na cidade de Lima (Peru), 17 (60,7%) foram consideradas positivas para a presença de *G. intestinalis*.

A figura 10, apresenta o fluxograma das diferentes opções de utilização dos iniciadores GDHgen F e R para *G. intestinalis* quando empregado na amplificação do DNA extraído diretamente da amostra, e quando realizado a partir do produto obtido da primeira reação da PCR descrita por CACCIÒ *et al.* (2008). Quando o produto resultante da *nested* PCR, realizada segundo CACCIÒ *et al.* (2008) foi purificado e submetido à reamplificação (*rePCR*), foi observada a presença do fragmento de 122pb, específica para *G. intestinalis* confirmando assim a presença desse protozoário parasita nas amostras.

A utilização da técnica de reamplificação do fragmento purificado de 530 pb proveniente da *nested* PCR, permitiu a detecção de *G. intestinalis* o que não foi possível fazer com os iniciadores GDHgen F e GDHgen R diretamente da amostra de DNA, ou mesmo a partir do fragmento de 754pb resultante da primeira reação.

A mesma observação foi feita para a detecção de agrupamentos A e B de *G. intestinalis* nas amostras de esgoto. A amplificação do fragmento esperado para os dois agrupamentos só foi possível após a purificação e reamplificação do produto da segunda reação (*nested* PCR) (dados não apresentados). Das 28 amostras de esgoto estudadas 12 (42,9%) das amostras continham aos agrupamentos A e/ou B de *G. intestinalis*, enquanto que 5 (17,9%) apresenta outros agrupamentos diferentes de A e/ou B de *G. intestinalis*.

Nos Quadros 8 e 9 estão apresentados os resultados obtidos para a pesquisa de *G. intestinalis* nas diferentes amostras de esgoto bruto provenientes de cinco Municípios no Estado de São Paulo, Brasil, e de dois bairros na cidade de Lima no Peru; e para os controles positivos e negativos utilizados no presente estudo.

Figura 10 – Fluxograma demonstrando a sequência das PCRs realizadas até a confirmação da presença de *G. intestinalis*, agrupamentos A ou B.

No caso do estado de São Paulo, 11 das 18 amostras coletadas de esgoto bruto foram positivas para *Giardia intestinalis* que representou 61,1%.

Na cidade de Lima, em Peru, 6 das 10 amostras coletadas foram positivas para *G. intestinalis* representando 60 % do total.

Quadro 8 - Resultados obtidos para detecção de *Giardia intestinalis* e dos agrupamentos A e B para amostras de esgoto provenientes de dois bairros da cidade de Lima, Peru. Janeiro – Março, 2013.

Tipo	Local	Amostra	Data da coleta	Pontos de Amostragem	PCR		
					<i>Giardia intestinalis</i>	Genótipo A	Genótipo B
Esgoto Bruto	Lima, Peru 2012	1 P	03/01/2013	Bairro A ^a	-	-	-
		2 P		Bairro B ^b	-	-	-
		3 P	10/01/2013	Bairro A	+	-	-
		4 P		Bairro B	+	-	-
		5 P	07/2/2013	Bairro A	+	+	-
		6 P		Bairro B	-	-	-
		7 P	12/02/2013	Bairro A	-	-	-
		8 P		Bairro B	+	+	+
		9 P	01/03/2013	Bairro A	+ ^c	+	-
		10 P		Bairro B	+	+	+

Legenda: + Positivo; - Negativo; ^a Bairro semi-urbano; ^b Bairro urbano; ^c Amostra confirmada por sequenciamento.

Quadro 9- Resultados obtidos para detecção de *Giardia intestinalis* e dos agrupamentos A e B para amostras de esgoto bruto (Mecha de Moore), Estado de São Paulo, Brasil. Julho – Agosto, 2012.

Técnica	Local	Tipo	Amostra	Data da coleta	Pontos de Amostragem	PCR		
						<i>Giardia intestinalis</i>	Genótipo A	Genótipo B
Mecha de Moore	São Paulo, Brasil	EB	1M	10/07/2012	Aeroporto de Viracopos, Campinas.	+	-	-
		EB	3M		Emissário Rebouças, Santos.	+	-	+
		EB	4M		Terminal Rodoviário Barra Funda - SP	-	-	-
		EB	5M		Aeroporto de Congonhas -SP	-	-	-
		EB	6M		Aeroporto de Cumbica, Guarulhos.	+	-	-
		EB	7M		Terminal Rodoviário Tietê - SP	-	-	-
		EB	11M	23/07/2012	Aeroporto de Viracopos, Campinas.	+	-	+
		EB	10M		Emissário Rebouças, Santos.	-	-	-
		EB	12M		Terminal Rodoviário Barra Funda - SP	+	+	-
		EB	13M		Aeroporto de Congonhas -SP	-	-	-
		EB	14M		Aeroporto de Cumbica, Guarulhos.	+	-	-
		EB	15M		Terminal Rodoviário Tietê - SP	-	-	-
		EB	19M	07/08/2012	Aeroporto de Viracopos, Campinas.	+	+	-
		EB	18M		Emissário Rebouças, Santos.	+	+	-
		EB	20M		Terminal Rodoviário Barra Funda - SP	-	-	-
		EB	21M		Aeroporto de Congonhas -SP	+	+	+
		EB	22M		Terminal Rodoviário Tietê - SP	+	+	-
		EB	23M		Aeroporto de Cumbica, Guarulhos.	+	-	+

Legenda: + Positivo; - Negativo; EB: Esgoto Bruto.

6.2 DETECÇÃO DOS AGRUPAMENTOS A e B de *G. intestinalis*

O agrupamento mais observado segundo os resultados das reações específicas de PCR, foi o agrupamento A, em um total de 5 amostras das 17 positivas para *G. intestinalis* (29,4%), o agrupamento B foi detectado apenas em 3 das 17 amostras positivas (17,7%), enquanto que ambos agrupamentos foram detectados em 3 amostras (17,7%).

Os resultados obtidos para as amostras de esgotos provenientes de dois bairros da cidade de Lima, Peru, demonstraram que 6 (60%) amostras apresentavam *G. intestinalis* sendo que os agrupamentos A e/ou B estavam presentes em 4 (40%) delas (Quadro 8 e Figura 12).

Duas amostras, uma de cada um dos bairros, apresentou *G. intestinalis*, no entanto os agrupamentos A ou B não foram detectados, indicando que possivelmente outros agrupamentos (C a H) estariam presentes.

As amostras de esgoto bruto provenientes de pontos de coleta de cidades do Estado de São Paulo apresentaram positividade para os agrupamentos A e/ou B de *G. intestinalis* em 44,4% (8/18); (Quadro 9 e Figura 12).

Na figura 11 são apresentados três imagens de gel de agarose, que mostram a sequência de leitura dos resultados para a presença de *G. intestinalis* nas amostras, e dos agrupamentos A e B de *G. intestinalis* através da técnica de re-amplificação por PCR do gene *gdh* a partir da *nested* PCR descrita por CACCIÒ *et al.* (2008).

As amostras negativas indicam apenas que não foi detectado *G. intestinalis*, porém a presença do fragmento de 530 pb da segunda reação da *nested* PCR pode indicar que outras espécies de *Giardia* possa estar presente tais como: *G. psittaci*, *G. muris*, ou *G. ardeae*

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose a 3% contendo os fragmentos obtidos da Re-amplificação do gene *gdh* a partir da *nested* PCR descrita por CACCIÒ *et al.* (2008) de *G. intestinalis* 122 pb (A), agrupamento A de *G. intestinalis* 170 pb (B) e agrupamento B de *G. intestinalis* 143pb (C), com iniciadores específicos. M – marcador de peso molecular 50pb; Br – branco, Amostras 1 e 6 amostras contendo os agrupamentos A e B de *G. intestinalis*; Amostras 2,4 e 7 – amostras positivas para *G. intestinalis* porém sem os agrupamentos A e B; Amostras 3, 8 e 9 – amostras negativas para a presença de *G. intestinalis*; Amostras 5 e 10 – amostras positivas para o agrupamento A; Amostra 11 – amostra positiva para o agrupamento B de *G. intestinalis*.

Figura 12. Frequências de amostras de *G. intestinalis* positivas segundo os agrupamentos A e B detectados segundo local de coleta

7. DISCUSSÃO

Foram encontrados relatos da presença de *Giardia* em amostras de esgoto bruto em vários trabalhos ao redor do mundo, inclusive no Brasil (Quadro 2). No caso do Peru, não foram obtidas, na literatura consultada, estudos que descrevessem a presença deste organismo nesse tipo de amostra. Apenas estão descritas investigações que objetivaram a pesquisa de *Giardia* em amostras clínicas (SULAIMAN *et al.*, 2003; PÉREZ *et al.*, 2008; COOPER *et al.* 2010), sendo o presente estudo o primeiro relato de detecção molecular de *Giardia* em esgoto bruto naquele país.

A elevada incidência de cistos de *Giardia* em diferentes corpos d'água no Brasil (FRANCO *et al.*, 2001; FRANCO e CANTUSIO NETO, 2002; HACHICH *et al.*, 2004; DIAS *et al.* 2008; NISHI *et al.* 2009; CANTUSIO NETO *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2011; BRANCO *et al.* 2012) é preocupante, pois reflete a circulação deste organismo no ambiente, repercutindo diretamente na saúde da população, como pode ser observado nos diferentes estudos disponíveis em amostras clínicas, os quais destacam que o grupo mais exposto, são as crianças (MIOTTI *et al.*, 1986; VIDAL *et al.*, 1991; MARCOS *et al.*, 2002, 2003; MASCARINI e DONALÍSIO, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2007; VOLOTÃO *et al.*, 2007; PÉREZ *et al.*, 2008; KOHLI *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2010; NEVES, 2010; BORGES *et al.*; 2011; SANTOS *et al.*, 2012; RAZZOLINI *et al.*, 2011).

Os dados obtidos no presente estudo confirmam a importância da pesquisa da presença de *Giardia intestinalis* no ambiente, inclusive no esgoto bruto, uma vez que do total das vinte e oito amostras, 17 (60,7 %) foram positivas para a presença desse parasita, através da técnica de reamplificação por PCR (*rePCR*).

Além disso, foi evidenciada a circulação dos agrupamentos A e B de *G. intestinalis* em amostras de esgoto proveniente da cidade de Lima no Peru, o que corrobora os resultados obtidos em estudos realizados em diferentes países e no Brasil (Quadro 2), da presença de agrupamentos de *G. intestinalis* – de interesse para a saúde humana – no esgoto (CACCIÒ *et al.*, 2003; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008a;

PLUTZER *et al.* 2008; ROBERTSON *et al.*, 2008; FERNANDES, 2009; LI *et al.*, 2012).

Considerando todas as amostras avaliadas no presente estudo, tanto em Lima (Peru) como no estado de São Paulo (Brasil), foi possível observar que o agrupamento A – agrupamento de *G. intestinalis* responsável por casos sintomáticos de giardíase em humanos – estava em maior frequência que o agrupamento B, responsável por casos assintomáticos (Figura 12).

Os resultados corroboram os achados da literatura que evidenciaram a importância do conhecimento da distribuição, principalmente do agrupamento A em amostras de esgoto que de alguma forma podem alcançar corpos d'água com potencial de utilização na agricultura, abastecimento público ou recreação (CACCIÒ *et al.*, 2003; SULAIMAN *et al.*, 2004; BERTRAND e SCHWARTZBROD, 2007; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008a; PLUTZER *et al.*, 2008, FERNANDES *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012).

Estudos disponíveis na literatura demonstram maior circulação do agrupamento A, entre a população avaliada. A pesquisa de SOUZA *et al.*, (2007) detectou prevalência de 78,4 % (29/37) dentre as amostras de fezes humanas analisadas, no estado de São Paulo; e COOPER *et al.* (2010) relataram prevalência de 37,1 % (66/178) de *G. intestinalis* nas amostras clínicas analisadas na cidade de Lima no Peru e relatam que o agrupamento A foi observado em maior frequência que o agrupamento B.

Diversos estudos demonstram que o monitoramento de esgoto bruto, fornece dados representativos do perfil epidemiológico da população da presença de infecção endêmica, onde pode ser possível considerar portadores assintomáticos e casos de erros no diagnóstico, sendo a ocorrência dos patógenos no ambiente essencial para antecipar a ocorrência de possíveis surtos de doenças de veiculação hídrica (JAKUBOWSKI *et al.*, 1991; WALLIS *et al.*, 1996, ANCENO *et al.*, 2007; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008a).

De acordo com alguns autores, o número de parasitas no afluente de uma ETE depende do tamanho da comunidade atendida, bem como da taxa de infecção da população, portanto, quanto maior for a população servida, maior será chance de existir

indivíduos infectados (BUKHARI *et al.*, 1997; ROBERTSON *et al.*, 2006b; LIM *et al.*, 2007; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008a).

A detecção de *G. intestinalis*, em especial dos agrupamentos A e B no esgoto tratado ressalta a necessidade de atenção no tratamento de esgotos (CASSON *et al.*, 1990; ROBERTSON *et al.*, 2000; CANTUSIO NETO *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2009; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008b; BEN AYED *et al.*, 2009), pois os efluentes das ETEs são reutilizados com frequência para fins urbanos, agrícolas ou industriais, ou ainda lançados em águas superficiais, ou seja reutilizado de forma indireta (CUTOLO e ROCHA *et al.*, 2002; CUTOLO *et al.*, 2009).

No meio urbano, a reutilização do esgoto tratado é empregado principalmente, na irrigação de parques, entre outros espaços públicos, porém sua importância reside no âmbito rural, onde a maior porcentagem é utilizada na irrigação de campos agrícolas, sendo, portanto necessária, a eliminação de patógenos, tais como os cistos de *Giardia*, para desta forma reduzir o risco de contaminação de alimentos cultivados e também de animais de criação (PAZ *et al.*, 2000; CUTOLO, 2009; NAKAMURA, 2011). Existe também outro cenário difundido em algumas partes do mundo, onde acontece irrigação de cultivos com esgoto não tratado, devido à crença no valor nutritivo que traz para a agricultura, (ENSINK *et al.*, 2006).

No estado de São Paulo, como resultado do reuso do esgoto tratado, houve uma iniciativa conjunta de normatização proposta pelas Secretarias de Estado da Saúde, Secretaria do Meio Ambiente e Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos, que passou por consulta pública em 2013, a qual pretendia regulamentar e estabelecer os padrões microbiológicos e parasitológicos do reuso de esgoto tratado para fins urbanos, o que representaria um avanço nessa área, porém a regulamentação ainda não foi promulgada (CETESB, 2013). No Peru, entretanto, ainda não existe legislação específica para a reutilização dos esgotos domésticos tratados, mas se estima que no litoral do país e nas áreas peri-urbanas um total de 4.000 hectares de terras agrícolas sejam irrigadas com esgoto bruto (PERREZ CORDON *et al.*, 2008).

Segundo MOSCOSO (2011) a companhia de águas e esgotos de Lima, Sedapal, o tratamento de esgoto é somente voltado para um “saneamento” aparente, isto é,

descartar adequadamente os efluentes em um corpo receptor como o rio ou o mar, sem levar em consideração, no entanto, a grande quantidade do esgoto que é destinada à irrigação agrícola e de áreas verdes, como também o risco de contaminação pelos cistos presentes naquele meio e que podem ser a causa de morbidades na população.

A presença dos cistos de *Giardia* pertencentes aos agrupamentos patogênicos ao homem, como demonstrado no presente estudo, destaca a importância e os riscos da utilização dos sub-produtos gerados nas ETEs, pelos processos de tratamento – principalmente lodo de esgoto – uma vez que esses podem apresentar elevada carga parasitária, sendo necessário a realização de estudos adicionais para a caracterização molecular de *Giardia* nesse tipo de amostras, uma vez que tais informações são escassas na literatura (RIMHANEN-FINNE *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2004; GRACZYK *et al.*, 2008).

Para lidar com os fatores inibidores e a carga baixa e dispersa dos cistos de *Giardia* nas amostras ambientais, alguns estudos relataram a utilização de grandes quantidades de esgoto de até 50 litros por amostragem, e diferentes tipos de métodos de concentração, porém a estratégia não solucionou os problemas. O aumento do volume coletado aumentava a disponibilidade do parasita, porém aumentava proporcionalmente dos agentes inibidores (CACCIÒ *et al.*, 2003; CARVALHO ALMEIDA, 2004; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008a; ARAÚJO, 2008; FERNANDES, 2009).

No presente trabalho, na cidade de Lima, foi coletado um volume de amostras de esgoto bruto, entre 100 a 150 mL, enquanto que no estado de São Paulo foram coletados volumes de 50 mL do conteúdo homogeneizado da mecha de gaze. Diferentemente da maioria dos estudos, foram coletados volumes pequenos, assim como nos estudos conduzidos por SULAIMAN *et al.*, 2004 e FERNANDES *et al.*, 2011.

A concentração das amostras foi feita por centrifugo-sedimentação no caso das amostras provenientes da cidade de Lima. Todavia, para as amostras coletadas no Estado de São Paulo foi utilizada a técnica de Moore modificada ou mecha de gaze, a qual é tradicionalmente empregada para o monitoramento de *V. cholerae* no esgoto (MOORE *et al.*, 1952; BARRET *et al.*, 1980). Esta técnica já funciona como um meio de concentração de microrganismos, devido ao tempo prolongado que permanece no esgoto

– 5 a 7 dias – favorecendo o contato e adesão dos diversos organismos encontrados no ambiente. Considerando as características dos cistos de *Giardia*, esses também estariam aderidos à mecha de gaze.

Os dados apresentados no presente trabalho comparados com os disponíveis na literatura (Quadro 2), demonstraram que em muitos estudos que avaliaram amostras de esgoto bruto para a presença de *Giardia*, um elevado número de amostras positivas foi observado.

Uma interpretação para tais resultados é o fato de que a maioria dos trabalhos empregou a técnica de captura imunomagnética para concentração e detecção por imunofluorescência (IFA) de cistos de *Giardia*. A vantagem da aplicação dessa metodologia é a purificação dos cistos durante o processo de captura imunomagnética, e ainda a possibilidade de contagem do número de cistos de *Giardia* presentes em uma amostra, porém a principal desvantagem, é que não é possível discriminar as diferentes espécies de *Giardia*, ou os agrupamentos de interesse para a clínica, e ainda, segundo MAHBUBANI *et al.* (1992) a técnica pode favorecer reações cruzadas que contribuem para o aparecimento de resultados falso-positivos.

O crescente número de estudos que empregaram a técnica de PCR na detecção de cistos de *Giardia* no esgoto (Quadro 2), permite que se conheça a distribuição deste parasita e respectivos agrupamentos nesse ambiente e considerados fontes de contaminação para águas superficiais. Embora a PCR convencional apenas possibilite detectar a presença ou a ausência desse protozoário, a caracterização molecular pode fornecer informações vitais às autoridades de saúde pública sobre a distribuição de *G. intestinalis* e os agrupamentos responsáveis por agravos à saúde humana (THOMPSON, 2004; SMITH *et al.*, 2006; ANCENO *et al.*, 2007).

Dentre os trabalhos revisados, observou-se a aplicação de diferentes tipos de PCR, tais como a convencional, a *semi-nested*, a *nested* e a PCR em tempo real, o que ressalta que não há um consenso sobre a PCR padrão para estudos de caracterização molecular de *Giardia* em amostras ambientais, como também ressaltou NANTAVISAI *et al.* (2007) que fez a mesma observação para amostras clínicas.

A grande maioria de estudos que empregaram métodos moleculares para caracterização de *G. intestinalis*, no Brasil, foi realizada em amostras clínicas (PAULINO, 2005; VOLOTÃO et al., 2007; SOUZA et al., 2007, MARTINS, 2010; SOARES et al., 2011). Apenas um estudo utilizou amostras de esgoto bruto, onde foi feita a detecção de *G. intestinalis* por PCR e posterior clonagem e sequenciamento (FERNANDES, 2009).

No entanto, não existe um protocolo padrão de PCR que seja utilizado, devido a dificuldade de trabalhar com amostras de esgoto bruto, como também à falta de consenso na utilização dos marcadores de gene para genotipagem (SMITH et al., 2006; PLUTZER et al., 2008) (Quadro 2).

No caso da pesquisa de *Giardia* por PCR, a partir de amostras de esgoto bruto no presente estudo, a estratégia utilizada foi de associar a técnica de *nested* PCR, utilizando iniciadores mais externos descritos por CACCIÒ et al., (2008) e realizar uma purificação desse produto e posteriormente realizar nova reação de PCR, também conhecida como reamplificação por PCR (rePCR), com iniciadores mais específicos, direcionados a alvos internos aos genes amplificados durante a *nested* PCR, para a espécie *G. intestinalis*, e para os agrupamentos A e B. A relevância em direcionar a busca por *G. intestinalis*, e especificar a ocorrência dos agrupamentos A e B, se fundamenta em estudos epidemiológicos, que até o momento, tem observado predominantemente esses agrupamentos como causadores de doença em humanos (PAINTLIA et al., 1998; ADAM, 2001; HOMAN e MANK, 2001; READ et al., 2002; HAQUE et al., 2005; SAHAGÚN et al.; 2008; CACCIÒ e RYAN, 2008; LAISHRAM et al., 2012b).

Os resultados do presente estudo corroboram a observação de que os agrupamentos A e B de *G. intestinalis* são frequentes em amostras de esgoto no Brasil, este é o primeiro estudo a fazer esta caracterização sem a necessidade de clonagem ou sequenciamento do produto obtido da PCR. Esta metodologia proposta seria acessível aos países em desenvolvimento, devido a seu menor custo e facilidade na rotina de laboratório.

A utilização de iniciadores e condições de reação, utilizados em amostras clínicas, com bons resultados, muitas vezes quando são empregados nas mesmas

condições em amostras ambientais não apresentam o mesmo resultado. Esse fato pode ocorrer principalmente devido a existência de substâncias interferentes da PCR e também a associação desse fator ao reduzido número de cópias do gene alvo na amostra. Para superar essas dificuldades muitas vezes torna-se necessário realizar modificações na metodologia para reduzir o efeito desses interferentes e aumentar o número de cópias.

A forte inibição da PCR por vários fatores normalmente presentes nas amostras de esgoto, como compostos fenólicos, presentes por fontes naturais, abundantes substâncias que liberam ácidos húmicos, ligninas e taninos, e por meios artificiais, representados pela degradação de pesticidas e herbicidas, derivados de plásticos, além da alta carga bacteriana e outros patógenos, pode representar uma desvantagem para a identificação molecular de cargas parasitárias reduzidas, em amostras de esgoto bruto e altamente poluídas (MAYER e PALMER, 1996; BRUZZONITI *et al.*, 2000; PLUTZER *et al.*, 2008; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2009).

A presença de resultados falso-negativos é outra das limitações da PCR, ocorrendo principalmente pela ação dos inibidores, situação que tem sido relatada por vários autores, que demonstram a presença de amostras positivas para os cistos de *Giardia*, utilizando IFA, e negativas após realização de PCR (COUPE *et al.*, 2006; PLUTZER *et al.*, 2008), embora NANTAVISAI *et al.* (2007) não observaram diferença significativa entre as sensibilidade e especificidade entre as técnicas de PCR e IFA.

A utilização de substâncias quelantes, tanto durante o processo de extração quanto no momento de preparo da reação de PCR – como BSA, Chelex e PVP – foram descritas na literatura por diversos autores que demonstram a diminuição do efeito dos inibidores das amostras na reação de PCR (ROCHELLE *et al.*, 1997; GUY *et al.*, 2003; ARAÚJO, 2008; FERNANDES, 2009). Uma alternativa seria o emprego da técnica de separação imunomagnética (IMS), que tem sido utilizada em estudos que levaram ao sucesso na amplificação do DNA em amostras provenientes de esgoto (SULAIMAN *et al.*, 2004; ROBERTSON *et al.*, 2008; PLUTZER *et al.*, 2008; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008a; NASSER *et al.*, 2012), mas seu alto custo, limita seu emprego, especialmente em países em desenvolvimento (ANCENO *et al.*, 2007).

A aplicação da técnica de PCR para a pesquisa de *Giardia* nas amostras de esgoto utilizadas no presente estudo discriminou a presença de *G. intestinalis*, e ainda demonstrou a presença de agrupamentos A e B que são os agrupamentos que podem contaminar o homem. É interessante ressaltar que as amostras “negativas” podem ainda conter outras espécies de *Giardia* que não foram foco deste estudo. Porém, é importante reconhecer a necessidade de ampliação de estudos que visem à pesquisa dessas espécies, para conhecer sua dispersão no esgoto bruto e em outras amostras ambientais, que poderiam fornecer importantes informações para elucidar a origem dos cistos.

A seleção do gene *gdh* para identificação de *G. intestinalis* e seus agrupamentos A e B nas amostras (Quadros 8 e 9), no presente estudo, se deu pela ampla utilização deste alvo em estudos com diferentes tipos de amostras clínicas de vários hospedeiros mamíferos, e também em amostras ambientais, incluindo a diferenciação entre agrupamentos do parasita (MONIS *et al.*, 1996,1999, 2003; READ *et al.*, 2004, SOUZA *et al.*, 2007; PLUTZER *et al.*, 2008). Embora nem todas as espécies de *Giardia* tenham sequências completas desse gene, depositadas nos bancos de dados públicos, dificultando o desenho de iniciadores que detectem outras espécies desse protozoário, a grande maioria dos estudos de detecção de *Giardia*, os quais empregam iniciadores específicos dentro do gene *gdh*, têm como alvo apenas *G. intestinalis*, não considerando a presença de outras espécies (HOMAN e MANK, 2001; ROBERTSON *et al.*, 2006b; SOUZA *et al.*, 2007; CACCIÒ *et al.*, 2008; PÉREZ *et al.*, 2008; PLUTZER *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2011; BROGLIA *et al.*, 2013).

A aplicação da estratégia metodológica, se deu sem a necessidade de sequenciamento do fragmento amplificado, como é descrito na publicação de CACCIÒ *et al.* (2008). Considerando que o fragmento de 530 pb resultante da reação de amplificação poderia conter sequências de mais de um dos agrupamentos, ou ainda que por ser genérico para o gênero *Giardia*, os iniciadores empregados para a *nested* PCR, poderiam amplificar simultaneamente sequências de outras espécies de *Giardia* como *G. psittaci*, *G. muris* ou outras não disponíveis nos bancos de dados, e poderiam ser gerados eletroferogramas mistos, resultando na presença de dois picos simultâneos numa mesma

posição. Neste caso não levariam ao resultado final de identificação, sendo necessária a aplicação de técnicas de clonagem para separação dos fragmentos.

Segundo SOARES *et al.* (2002) a compreensão das relações entre saneamento, saúde pública e meio ambiente constitui a etapa inicial no desenvolvimento de um modelo de planejamento de sistemas de abastecimento de água e de esgotamento sanitário, que proporcionará benefícios gerais para a saúde da população, acompanhando duas vias: mediante efeitos diretos e indiretos, resultantes, do nível de desenvolvimento da localidade atendida.

A evolução dos diversos documentos legais revistos em ambos os países, no Brasil e no Peru, mostram uma maior complexidade e visam melhorar o saneamento básico, abastecimento público, manutenção das águas para consumo humano e diferentes corpos d'água, gerenciamento dos esgotos e reaproveitamento dos esgotos tratados. Essas normativas têm como objetivo proteger e reduzir a degradação ambiental dos mananciais, principais recursos hídricos para o abastecimento público das áreas urbanas e rurais, que devido à elevada demanda fica sujeito à tendência significativa de redução na disponibilidade hídrica que é agravada pela elevada poluição doméstica e industrial.

O despejo de esgoto doméstico, inadequadamente tratado ou não tratado, nos mananciais utilizados para abastecimento público representa uma ameaça à saúde humana e animal. Uma vez contaminada, a água atua como um eficiente veículo de patógenos em razão de sua elevada capacidade de dispersão, do uso abrangente e consumo obrigatório (FRANCO *et al.* 2012a). Diferentes estudos foram realizados não somente para avaliar a presença, mas também realizar a genotipagem de *G. intestinalis* em amostras de esgoto em diversas partes do mundo. Estes demonstraram resultados muito variáveis, nas concentrações e agrupamentos circulantes, inclusive em diferentes amostragens provenientes de um mesmo país. Essa elevada variabilidade – associada aos resultados provenientes da pesquisa e genotipagem de *Giardia* em amostras clínicas – sugere a necessidade de estudos complementares, em matrizes ambientais como água superficial e esgoto. Os resultados complementares podem revelar a disseminação dos agrupamentos de *G. intestinalis* de interesse clínico, e sugerir formas de aprimoramento

das atuais técnicas de tratamento de água para consumo humano e tratamento de esgoto, que podem, por sua vez, levar à redução da contaminação e o conhecimento da sua viabilidade no ambiente (CACCIO *et al.*, 2003; BERTRAND e SCHWARTZBROD, 2007; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008; ALONSO *et al.*, 2010; NASSER *et al.*, 2012).

O presente estudo contribui com a ampliação da informação sobre a presença de cistos de *Giardia* em amostras de esgoto bruto, identificado com auxílio de método molecular – PCR, para que se possa conhecer a distribuição dos cistos encontrados no ambiente, e identificar a circulação dos agrupamentos que são patogênicos para o homem. Os dados obtidos são de importância para a saúde pública, e poderá alertar as autoridades sobre os cuidados no tratamento dessas matrizes e sobre os riscos do reuso do esgoto tratado, possibilitando medidas de prevenção e controle da giardíase tanto no Brasil quanto no Peru.

8. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos indicam que em dois bairros da cidade de Lima no Peru, circulam no esgoto bruto, os agrupamentos A e B de *Giardia intestinalis*
- Em municípios do estado de São Paulo, de alto trânsito de pessoas de Brasil e do mundo, circulam os agrupamentos A e B da *G. intestinalis* no esgoto bruto.
- Existe uma implicação para a saúde humana, pois a presença dos agrupamentos humanos de *Giardia intestinalis* no esgoto bruto apresenta dois importantes fatores de riscos. Sendo o primeiro a reutilização do esgoto não adequadamente tratado na irrigação de áreas urbanas e através da agricultura; e o segundo a contaminação de recursos hídricos importantes como mananciais e, portanto, da água de abastecimento público.

9. RECOMENDAÇÕES

Reforçar a revisão dos instrumentos normativos, relacionados ao reuso de esgoto tratado, levando em consideração o risco que representa a presença de *Giardia* nesse produto e seu lançamento em mananciais, tanto no Brasil quanto no Peru.

Validação da Metodologia de Reamplificação por PCR (*rePCR*) do gene *gdh* através da *nested* PCR, descrito por CACCIO *et al.*, 2008.

Propor o emprego na rotina laboratorial de diagnóstico da metodologia apresentada para pesquisa da presença dos agrupamentos humanos de *Giardia intestinalis*, com a finalidade de avaliar a eficiência dos processos de tratamento de esgoto.

Estimular, em especial no Peru, a realização de estudos para detecção, quantificação e genotipagem de *Giardia intestinalis* em esgoto bruto e tratado, bem como em outras amostras ambientais, a fim de fornecer informações que venham subsidiar as tomadas de decisões por parte das autoridades sanitárias para garantia da saúde da população.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(3): 447-475.

Adamska M, Leońska-Duniec A, Maciejewska A, Sawczuk M, Skotarczak B. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia intestinalis* measured by PCR and TaqMan real time PCR. Parasite. 2010; 17(4):299-305.

Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. J Eukaryot Microbiol. 2005; 52(5):399-451.

Alonso JL, Amorós I, Cuesta G. LNA probes in a real-time TaqMan PCR assay for genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewaters. J Appl Microbiol. 2010; 108 (5): 1594–1601.

Alonso JL, Amorós I, Cañigral I. Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;89(4):1203-1211.

Anceno AJ, Katayama H, Houpt ER, Chavalitshe-winkoon-Petmitr P, Chuluun B, Shipin OV. IMS-free DNA extraction for the PCR-based quantification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in surface and waste water. Int J Environ Health Res. 2007; 17(4):297-310.

Andrews RH, Adams M, Boreham PF, Mayrhofer G, Meloni BP. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int J Parasitol.* 1989; 19(2):183-90.

Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(6):413-22.

Appelbee AJ, Thompson RC, Olson ME. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - current status and future needs. *Trends Parasitol.* 2005; 21(8):370-6.

Araújo RS. Genotipagem de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras de águas superficiais e recreacionais como fonte de informação da dispersão de espécies no ambiente. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.

Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res.* 2011; 45(20):6603-14.

Baque RH, Gilliam AO, Robles LD, Jakubowski W, Slifko TR. A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters. *Water Res.* 2011; 45(10):3175-84.

Barrett TJ, Blake PA, Morris GK, Puhf ND, Bradford HB, Wells JG. Use of Moore swabs for isolating *Vibrio cholerae* from sewage. *J Clin Microbiol.* 1980;11(4):385-388.

Ben Ayed L, Schijven J, Alouini Z, Jemli M, Sabbahi S. Presence of parasitic protozoa and helminth in sewage and efficiency of sewage treatment in Tunisia. *Parasitol Res.* 2009;105(2):393-406.

Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*. 2002; 359(9306):564-571.

Bertrand I, Gantzer C, Chesnot T, Schwartzbrod J. Improved specificity for *Giardia lamblia* cyst quantification in wastewater by development of a real-time PCR method. *J Microbiol Methods*. 2004; 57(1):41-53.

Bertrand I, Schwartzbrod J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and faecal contamination origin. *Water Res*. 2007; 41(16):3675-3682.

Böckelmann R, Bonnekoh B, Gollnick H. Optimized visualization and PCR reamplification of differentially displayed cDNA bands detected by silver staining in polyacrylamide gels as established in the model of dithranol-treated keratinocytes. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 1999; 12(1-2):54-63.

Boia MN, da Motta LP, Salazar MD, Mutis MP, Coutinho RB, Coura JR. Estudo das parasitoses intestinais e da infecção chagásica no Município de Novo Airão, Estado do Amazonas, Brasil. *Cad Saude Publica*. 1999; 15(3):497-504.

Bonatti TR, Franco RMB, Cantusio Neto R. Comparison of two methodologies for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge samples from a sewage treatment plant in the city of Campinas, São Paulo State, Brazil. *J Water Health*. 2007; 5(4):609-14.

Bonnet S, Prévot G, Bourgouin C. Efficient reamplification of differential display products by transient ligation and thermal asymmetric PCR. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(4):1130-1131.

Borges WF, Marciano FM, Oliveira HB. Parasitos intestinais: elevada prevalência de *Giardia lamblia* em pacientes atendidos pelo serviço de saúde pública da região Sudeste de Goiás, Brasil. Rev Patol Trop. 2011; 40 (2): 149-157.

Branco N, Leal DAG, Franco RMB. A parasitological survey of natural water springs and inhabitants of a tourist city in southeastern Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012; 12(5):410-7

Brasil. Decreto nº 79.367, de 9 de março de 1977. Dispõe sobre normas e o padrão de potabilidade de água e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 mar. 1977, Seção 1, Parte 1, p. 2741.

.

Broglia A, Weitzel T, Harms G, Cacció SM, Nöckler K. Molecular typing of *Giardia duodenalis* isolates from German travellers. Parasitol Res. 2013;112(10):3449-56.

Bruzzoniti MC, Sarzanini C, Mentasti E. Preconcentration of contaminants in water analysis. J Chromatogr A. 2000; 902(1):289-309.

Bukhari Z, Smith HV, Sykes N, Humphreys SW, Paton CA, Girdwood RWA, Fricker CR. Occurrence of *Cryptosporidium* sp. oocysts and *Giardia* sp. cysts in sewage effluents and effluents from treatment plants in England. Wat. Sci. Tech.1997; 35(11-12): 385-390.

Cacciò SM, De Giacomo M, Aulicino FA, Pozio E. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(6):3393-8.

Cacciò SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends Parasitol. 2005; 21(9):430-7.

Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol.* 2008; 160 (2):75-80.

Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol.* 2008; 38(13):1523-1531.

Cantusio Neto R, Santos LU, Franco RM. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. *Water Sci Technol.* 2006; 54(3):89-94.

Cantusio Neto R, dos Santos LU, Sato MI, Franco RM. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, southeast Brazil. *Water Sci Technol.* 2010; 62(1):217-222.

Carmena D, Aguinagalde X, Zigorraga C, Fernández-Crespo JC, Ocio JA. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *J Appl Microbiol.* 2007; 102(3):619-29.

Carvalho Almeida T.T. Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração do DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase). [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2004

Casson LW, Sorber CA, Sykora JL, Gavaghan PD, Shapiro MA, Jakubowski W. *Giardia* in wastewater-effect of treatment. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation.* 1990; 62(5): 670-675.

Castro-Hermida JA, García-Presedo I, Almeida A, González-Warleta M, Correia Da Costa JM, Mezo M. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. Water Res. 2008; 42(13):3528-38. 2008a

Castro-Hermida JA, García-Presedo I, Almeida A, González-Warleta M, Correia Da Costa JM, Mezo M. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. Sci Total Environ. 2008; 405(1-3):45-53. 2008b

Castro-Hermida JA, García-Presedo I, Almeida A, González-Warleta M, Da Costa JM, Mezo M. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. Water Res. 2009; 43(17):4133-42.

Castro-Hermida JA, García-Presedo I, González-Warleta M, Mezo M. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. Water Res. 2010; 44(20):5887-5896.

Castro-Hermida JA, García-Presedo I, Almeida A, González-Warleta M, Correia Da Costa JM, Mezo M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). Sci Total Environ. 2011; 409(13):2451-2459.

Cavalier-Smith T. The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Louksozoa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53(Pt 6):1741-58.

Cheng HW, Lucy FE, Graczyk TK, Broaders MA, Tamang L, Connolly M. Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments. Parasitol Res. 2009; 105(3):689-96.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Yoder JS, Harral C, Beach MJ. Giardiasis surveillance - United States, 2006-2008. MMWR Surveill Summ. 2010; 59(6):15-25.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Yoder JS, Gargano JW, Wallace RM, Beach MJ. Giardiasis surveillance--United States, 2009-2010. MMWR Surveill Summ. 2012; 61(5):13-23.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Isolamento e identificação de *vibrio cholerae* em água e esgoto. São Paulo: CETESB; Fevereiro 1992. Norma Técnica L5.507. 55p

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. 2011. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA. 327p

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Minuta de resolução conjunta SES/SMA/SERHS disciplinamento o Reuso Direto Não Potável de Água Proveniente de Estações de Tratamento de Esgoto Sanitário para Fins Urbanos. Consulta pública. 2013. São Paulo: CETESB. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/tecnologia-ambiental/camaras/consulta-04-2013-procedimentos.pdf> [Acessado em 18 dezembro 2013].

Cooper MA, Sterling CR, Gilman RH, Cama V, Ortega Y, Adam RD. Molecular analysis of household transmission of *Giardia lamblia* in a region of high endemicity in Peru. J Infect Dis. 2010; 202(11):1713-21.

Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. Int J Parasitol. 2011; 41(9):925-33.

Coupe S, Delabre K, Pouillot R, Houdart S, Santillana-Hayat M, Derouin F. Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in surface water, including recreational areas: a one-year prospective study. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006; 47:351-359.

Cox FE. History of human parasitology. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(4):595-612.

Cutolo AS, Rocha AA. Reflexões sobre o uso de águas residuárias na cidade de São Paulo. Saúde e Sociedade. 2002; 11(2): 89-105.

Cutolo AS. Reuso de águas residuárias e saúde pública. 2009. São Paulo: Annablume; FAPESP. 94p

Da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, Moura IN, Slemenda SB, Tuttle JL, Pieniazek NJ. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. Mol Diagn. 1999; 4(1):57-64.

Davies RB, Hibler CP. Animal reservoirs and cross-species transmission of *Giardia*. In: Jakubowski W, Hoff JC. Waterborne transmission of giardiasis. Cincinnati: EPA; 1979. p.104-126.

De Souza W, Lanfredi-Rangel A, Campanati L. Contribution of microscopy to a better knowledge of the biology of *Giardia lamblia*. Microsc Microanal. 2004; 10(5):513-27.

De Souza EA, da Silva-Nunes M, Malafronte Rdos S, Muniz PT, Cardoso MA, Ferreira MU. Prevalence and spatial distribution of intestinal parasitic infections in a rural Amazonian settlement, Acre State, Brazil. Cad Saude Publica. 2007;23(2):427-34.

Danciger M, Lopez M. Numbers of *Giardia* in the feces of infected children. Am J Trop Med Hyg. 1975; 24(2):237-42.

Dias GMF, Bevilacqua PD, Bastos RKX, Oliveira AA, Campos GMM. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. Arq Bras Med Vet Zootec, 2008; 60(6):1291-1300.

Durigan M, Zucchi MI, Franco RMB, Souza AP. Desenvolvimento e caracterização de marcadores moleculares do tipo microsatélites para *Giardia duodenalis*. In: LV Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo. 2010. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética, 30 agosto a 02 de setembro de 2009.

Durigan M, Zucchi MI, Franco RMB, Souza AP. Caracterização genética de cistos de *Giardia duodenalis* presentes em amostras clínicas e ambientais através do gene Glutamato Desidrogenase. In: LVI Congresso Brasileiro de Genética, Guarujá, São Paulo. 2010. Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética, 14 a 17 de setembro de 2010.

Durigan M, Zucchi MI, Franco RMB, Souza AP. Assessing the genetic diversity of *Giardia duodenalis* by using networks, phylogenetic methods and population genetics analyses. In: LVII Congresso Brasileiro de Genética, Guarujá, São Paulo. 2011. Resumos do 57º Congresso Brasileiro de Genética, 30 agosto a 02 de setembro de 2011.

Dykes AC, Juranek DD, Lorenz RA, Sinclair S, Jakubowski W, Davies R. Municipal waterborne giardiasis: an epidemiologic investigation. Beavers implicated as a possible reservoir. Ann Intern Med. 1980; 92(2 Pt 1):165-70.

Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. Int J Parasitol. 2003; 33(1):3-28.

Ensink JH, van der Hoek W, Amerasinghe FP. *Giardia duodenalis* infection and wastewater irrigation in Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100(6):538-542.

Erlandsen SL, Bemrick WJ. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J Parasitol.* 1987; 73(3): 623-9.

Erlandsen SL¹, Sherlock LA, Januschka M, Schupp DG, Schaefer FW 3rd, Jakubowski W, Bemrick WJ. Cross-species transmission of *Giardia* spp.: inoculation of beavers and muskrats with cysts of human, beaver, mouse, and muskrat origin. *Appl Environ Microbiol.* 1988; 54(11):2777-2785.

Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR, van Keulen H, Jarroll EL. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *J Parasitol.* 1990; 76(5):717-24.

Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(1):35-54.

Fantham HB, Porter A. The pathogenicity of *Giardia (lamblia) intestinalis* to men and experimental animals. *Br Med J.* 1916; 2(2900):139-141.

Feely DE. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. *J Protozool.* 1988; 35:52–54.

Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24(1):110-140.

Fernandes LN. Caracterização molecular de isolados de *Giardia* de amostras de água e esgoto provenientes do Estado de São Paulo. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

Fernandes LN, de Souza PP, de Araújo RS, Razzolini MT, Soares RM, Sato MI, Hachich EM, Cutolo SA, Matté GR, Matté MH. Detection of assemblages A and B of *Giardia duodenalis* in water and sewage from São Paulo state, Brazil. J Water Health. 2011; 9(2):361-367.

Ford BJ. The Discovery of *Giardia*. Microscope. 2005; 53(4): 147- 153.

Franco RM, Rocha-Eberhardt R, Cantusio Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2001; 43(2):109-111.

Franco RM, Cantusio Neto R. Occurrence of cryptosporidial oocysts and giardia cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(2):205-7.

Franco RMB, Branco N, Leal DAG. Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. Rev Patol Trop. 2012a; 41 (2): 119-135.

Franco RMB, Hachich EM, Sato MIZ, Naveira RML, Silva EC, Campos MMC, Cantúsio Neto R, Cerqueira DA, Branco N, Leal DAG. Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. Epidemiol. Serv. Saúde. 2012b; 21(2):233-242.

Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, Palm D, Andersson JO, Andersson B, Svärd SG. Draft Genome Sequencing of *Giardia intestinalis* Assemblage B Isolate GS: Is Human Giardiasis Caused by Two Different Species? PLoS Pathog. 2009; 5(8): e1000560. doi:10.1371/journal.ppat.1000560

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. *Epidemiol Infect.* 2013; 141(1):9-21.

Gassmann L, Schwartzbrod J. Wastewater and *Giardia* cysts. *Wat. Sci. Tech.* 1991; 24(2):183-186.

Gilmour RA, Smith HV, Smith PG, Morris GP, Girdwood RWA. The Occurrence and Viability of *Giardia* spp. cysts in UK Waters. *Wat. Sci. Tech.* 1991; 24(2):179-182.

Graczyk TK, Kacprzak M, Neczaj E, Tamang L, Graczyk H, Lucy FE, Girouard AS. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of sanitization treatments on pathogen inactivation. *Environ Res.* 2008;106(1):27-33.

Gross R, Schell B, Molina MC, Leão MA, Strack U. The impact of improvement of water supply and sanitation facilities on diarrhea and intestinal parasites: a Brazilian experience with children in two low-income urban communities. *Rev Saude Publica.* 1989; 23(3):214-20.

Gomes PDMF, Nunes VLB, Knechtel DS, Brilhante AF. Enteroparasitos em escolares do distrito Águas do Miranda, Município de Bonito, Mato Grosso do Sul. *Ver Patol Trop.* 2010; 39 (4): 299-307.

Gomez-Puerta LA, Lopez-Urbina MT, Alarcon V, Cama V, Gonzalez AE, Xiao L. Occurrence of *Giardia duodenalis* assemblages in alpacas in the Andean region. *Parasitol Int.* 2014;63(1):31-34.

Guy RA, Payment P, Krull UJ, Horgen PA. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(9):5178-85.

Hachich EM, Sato MI, Galvani AT, Menegon JR, Mucci JL. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. *Water Sci Technol.* 2004; 50(1):239-245.

Hachich EM, Galvani AT, Padula JA, Stoppe NC, Garcia SC, Bonanno VM, Barbosa MR, Sato MI. Pathogenic parasites and enteroviruses in wastewater: support for a regulation on water reuse. *Water Sci Technol.* 2013;67(7):1512-1518.

Hashimoto A, Hirata T, Kunikane S. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in a conventional water purification plant. *Water Sci Technol.* 2001; 43(12):89-92.

Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis.* 2005; 192(12):2171-3.

Hehl AB, Regos A, Schraner E, Schneider A. Bax function in the absence of mitochondria in the primitive protozoan *Giardia lamblia*. *PLoS One.* 2007; 2(5):e488.

Heitman TL, Frederick LM, Viste JR, Guselle NJ, Morgan UM, Thompson RC, Olson ME. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Can J Microbiol.* 2002;48(6):530-541.

Ho BSW, Tam TY. *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage- contaminated river waters. *Wat Res.* 1998; 32(9): 2860-2864

Hollm-Delgado MG, Gilman RH, Bern C, Cabrera L, Sterling CR, Black RE, Checkley W. Lack of an adverse effect of *Giardia intestinalis* infection on the health of Peruvian children. Am J Epidemiol. 2008; 168(6):647-55.

Homan WL, van Enkevort FH, Limper L, van Eys GJ, Schoone GJ, Kasprzak W, Majewska AC, van Knapen F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. Parasitol Res. 1992; 78(4):316-23.

Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. Int J Parasitol. 2001; 31(8):822-6.

Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. J Parasitol. 1997; 83(1):44-51.

Hunter PR, Thompson RCA. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. Int J Parasitol 2005; 35(11-12): 1181–1190.

Iannacone J, Benites MJ, Chirinos L. Prevalencia de infección por parásitos intestinales en escolares de primaria de Santiago de Surco, Lima, Perú. Parasitol Latinoam. 2006; 61: 54–62.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Ministério das Cidades; 2010. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro e Estatística; 2010. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/...> [Acesso em 20 março. 2013].

INEI. Departamento de Lima: características de la infraestructura social y económica distrital, 1999. Lima: 2000. 359p. Disponível em: http://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib0510/Libro.pdf [Acesso em 31 janeiro 2014].

INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). Perú: Anuário de Estadísticas Ambientales. 2012. Disponível em <http://www.inei.gob.pe/> [Acesso em 20 março 2013].

Inge PM, Edson CM, Farthing MJ. Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. Gut. 1988; 29(6):795-801.

Jakubowski W, Sykora JL, Sorber CA, Casson LW, Gavaghan PD. Determining giardiasis prevalence by examination of sewage. Wat. Sci. Tech. 1991; 24(2):173–178.

Jiménez-García LF, Zavala G, Chávez-Munguía B, Ramos-Godínez Mdel P, López-Velázquez G, Segura-Valdez Mde L, Montañez C, Hehl AB, Argüello-García R, Ortega-Pierres G. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. Int J Parasitol. 2008; 38(11):1297-304.

Karanis P, Sotiriadou I, Kartashev V, Kourenti C, Tsvetkova N, Stojanova K. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. Environ Res. 2006; 102(3):260-71.

Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J Water Health. 2007; 5(1):1-38.

Katellaris PH, Naeem A, Farthing MJ. Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultured human intestinal cell line. Gut. 1995;37(4):512-8.

Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, Lima AA, Guerrant RL. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102(7):718-25.

Krmelj L, Contreras E. Sedapal: servicio de agua potable y alcantarillado de Lima: Informe de Clasificación. Equilibrium Clasificadora de Riesgo S.A.. Lima: 2013, 24 pág. Disponível em: <http://www.equilibrium.com.pe/Sedapal.pdf> [Acesso: em 11 de Novembro de 2013].

Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Cacciò SM, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol.* 2005; 91(1):203-205.2005a

Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol.* 2005; 35(2):207-13. 2005b

Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol.* 2002; 28 (2):123-47.

Laishram S, Kang G, Ajjampur SS. Giardiasis: a review on assemblage distribution and epidemiology in India. *Indian J Gastroenterol.* 2012; 31(1):3-12.2012a

Laishram S, Kannan A, Rajendran P, Kang G, Ajjampur SS. Mixed *Giardia duodenalis* assemblage infections in children and adults in South India. *Epidemiol Infect.* 2012; 140(11):2023-2027.2012b

Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol.* 2010; 40(9):1063-74.

Leles D, Araújo A, Vicente AC, Iñiguez AM. Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp. genotype in Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;163(1-2):167-170.

Leoneti AB, Prado EL do, Oliveira SVWB de. Saneamento básico no Brasil: considerações sobre investimentos e sustentabilidade para o século XXI. *Rev Adm Pública.* 2011; 45(2): 331-348.

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR 3rd, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.* 1980; 27(1):37-58.

Li D, Craik SA, Smith DW, Belosevic M. Infectivity of *Giardia lamblia* cysts obtained from wastewater treated with ultraviolet light. *Water Res.* 2009; 43(12):3037-46.

Li N, Xiao L, Wang L, Zhao S, Zhao X, Duan L, Guo M, Liu L, Feng Y. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bienersi* by genotyping and subtyping parasites in wastewater. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(9):e1809.

Lill R, Kispal G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25(8):352-6.

Lim YAL, Wan Hafiz WI, Nissapatorn V. Reduction treatment of *Cryptosporidium* processes and *Giardia* by sewage. *Trop Biomed.* 2007; 24(1): 95–104.

Liu A, Ji H, Wang E, Liu J, Xiao L, Shen Y, Li Y, Zhang W, Ling H. Molecular identification and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis* in raw urban wastewater in Harbin, China. *Parasitol Res.* 2011;109(3):913-8.

Lonigro A, Pollice A, Spinelli R, Berrilli F, Di Cave D, D'Orazi C, Cavallo P, Brandonisio O. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in membrane-filtered municipal wastewater used for irrigation. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(12):7916-8.

Lorkowski S, Cullen PM. Analysing gene expression, a handbook of methods: possibilities and pitfalls. Alemanha: Wiley-VCH. Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/352760149X> [Acesso em 14 fevereiro 2014].

Ludwig KM, Frei F, Filho FA, Ribeiro-Paes JT. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999; 32(5):547-555.

Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzyme encoded at 27 loci in comparison with *Giardia muris*. *Parasitology.* 1995; 111 (1):11-17.

McCuin RM, Clancy JL. Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. *J Microbiol Methods.* 2005;63 (1):73-88.

Maco V, Marcos LA, Terashima A, Samalvides F, Gotuzzo E. Distribución de la Enteroparasitosis en el Altiplano Peruano: estudio en 6 comunidades rurales del departamento de Puno, Perú. *Rev Gastroenterol Peru.* 2002; 22: 304–309.

Maguiña C, Seas C, Galán E, Santana J. Historia del cólera en el Perú en 1991. Acta Med Per. 2010; 27(3):212–217.

Marcos LA, Maco V, Terashima A, Samalvides F, Gotuzzo E. Prevalencia de parasitosis intestinal en niños del valle del Mantaro, Jauja, Perú. Rev Med Hered. 2002; 13(3):85-90.

Marcos LA, Maco V, Terashima A, Samalvides F, Miranda E, Gotuzzo E. Parasitosis intestinal en poblaciones urbana y rural en Sandia, Departamento de Puno, Perú. Parasitol Latinoam. 2003; 58: 35 – 40.

Mark-Carew MP, Adesiyun AA, Basu A, Georges KA, Pierre T, Tilitz S, Wade SE, Mohammed HO. Characterization of *Giardia duodenalis* infections in dogs in Trinidad and Tobago. Vet Parasitol. 2013; 196(1-2):199-202.

Martins J. Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada Santista, estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (*gdh*) e beta-giardina (*βg*). [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.

Martinez-Barrios E, Cerpa-Gonzales L, Liu-Cam M. Prevalencia de Giardiasis en guarderías infantiles de Tiabaya - Arequipa, Perú, 2006. Neotrop. Helminthol. 2011; 5(2): 257-264.

Mascarini LM, Donalísio MR. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39(6):577-579.

Mayer CL, Palmer CJ. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62(6) 2081–2085.

Mahbubani MH, Bej AK, Perlin MH, Schaefer FW 3rd, Jakubowski W, Atlas RM. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. J Clin Microbiol. 1992; 30(1):74-78.

Medema GJ, Schijven JF. Modelling the sewage discharge and dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. Wat. Res. 2001; 35 (18): 4307-4316.

McGlade TR, Robertson ID, Elliot AD, Thompson RC. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. Vet Parasitol. 2003; 110(3-4):197-205.

Meng TC, Aley SB, Svard SG, Smith MW, Huang B, Kim J, Gillin FD. Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol. 1996; 79(1):103-108.

Ministério del Ambiente (MINAM). Decreto Supremo n° 003-2010 MINAM, de 16 de Março de 2010. Aprueba niveles máximos permisibles para los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas o municipales. Diario Oficial El Peruano, Lima, 17 mar. 2010, págs. 415675-415676.

Ministério da Saúde (MS). Portaria Bsb n° 56, de 14 de março de 1977. Normaliza o padrão de potabilidade da água a ser observado em todo território nacional. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 mar. 1977, Seção 1, Parte 1, p. 22-25.

Ministério da Saúde (MS). Portaria n° 36, de 19 de janeiro de 1990. Aprova normas e o padrão de potabilidade da água para consumo humano em todo o território nacional. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 jan. 1990, Seção 1, p. 1651-1654.

Ministério da Saúde (MS). Portaria MS nº 1.469, de 29 dezembro de 2000. 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 da União, Brasília, DF, 22 fev. 2001. Seção 1.

Ministério da Saúde (MS). Portaria MS nº 518, de 25 de março de 2004. 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 da União, Brasília, DF, 26 mar. 2004, Seção 1, p. 266 – 270.

Ministério da Saúde (MS). Portaria 2914 de 12 de dezembro de 2011. Norma geral de qualidade da água para consumo humano. Diário Oficial da União, Brasília, DF, nº 239, 14 dez. 2011, Seção 1, p. 39-46.

Ministério de Salud (MINSA). Decreto Supremo N° 031-2010-SA. Reglamento de la calidad del agua para consumo humano. Perú. Diario Oficial El Peruano 26 de Setiembre del 2010.

Miotti PG, Gilman RH, Santosham M, Ryder RW, Yolken RH. Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. J Clin Microbiol. 1986; 24(6):972-5.

Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. Parasitology. 1996; 112 (1):1-12.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac-Renton JL, Ey PL. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. Parasitology. 1998; 116 (Pt 1):7-19.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. Mol Biol Evol. 1999; 16(9):1135-44.

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. Infect Genet Evol. 2003; 3(1):29-38.

Monis PT, Cacciò SM, Thompson RCA. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol. 2009; 25(2): 93-100.

Moore B, Perry EL, Chard ST. A survey by the sewage swab method of latent enteric infection in an urban area. J Hyg (Lond). 1952;50(2):137-156.

Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science. 2007; 317(5846):1921-6.

Moscoso JCC. Estudio de opciones de tratamiento y reuso de aguas residuales en Lima Metropolitana. Ministerio Federal de Educación e Investigación. Lima: 2011. 90 pags. Disponível em http://www.lima-water.de/documents/jmoscoso_informe.pdf [Acesso: 13 de Novembro de 2013].

Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. Lancet. 1997; 349(9061):1269-76.

Nakamura CPR. Implementación de reservorios como uma propuesta de tecnologia apropiada para mejorar la calidad sanitária del água para riego en Nievería. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Engenharia ambiental e dos recursos naturais] – Faculdade de Engenharia ambiental e dos recursos naturais, Universidad Nacional del Callao, Callao; 2011.

Nantavisai K, Mungthin M, Tan-ariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. J Clin Microbiol. 2007;45(2):581-583.

Nash TE, McCutchan T, Keister D, Dame JB, Conrad JD, Gillin FD. Restriction-
endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. J Infect Dis. 1985; 152(1):64-73.

Nash TE, Herrington DA, Losonsky GA, Levine MM. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. J Infect Dis. 1987; 156(6):974-84.

Nasser AM, Vaizel-Ohayon D, Aharoni A, Revhun M. A review – prevalence and fate of *Giardia* cysts in wastewater treatment plants. J Appl Microbiol. 2012; 113(3):477-84.

Naumova EN, Jagai JS, Matyas B, DeMaria A, MacNeill IB, Griffiths JK. Seasonality in six enterically transmitted diseases and ambient temperature. Epidemiol Infect. 2007; 135(2):281-292.

Neves ER. Estudo das características culturais e sócio-econômicas da aldeia indígena Jaraguá-Ytu, São Paulo, Brasil, correlacionando-as com a prevalência de parasitos intestinais. 2010 [Dissertação de Mestrado em Ciências. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo].

Nishi L, Baesso ML, Santana RG, Fregadolli P, Falavigna DL, Falavigna-Guilherme AL. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system. *Zoonoses Public Health*. 2009; 56(5):221-8.

Nóe N, Ulloa-Stanojlovic F, Peña P, Santos D, Fernández C, Anchante H, Terashima A, Chávez A, Falcón N. Parasitosis zoonóticas en mascotas caninas y felinas de niños de educación primaria del cono norte de Lima, Perú. 2011. *Una Salud. Rev Sapuvet Salud Pública*. 2011; 2(1):15-24.

Núñez FA. Estudio de factores asociados con la reinfección por *Giardia lamblia* en niños de círculos infantiles. [Tese de Doutorado]. La Habana, Cuba: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”; 2004.

Oblitas LR. Servicios de agua potable y saneamiento en el Perú: beneficios potenciales y determinantes de éxito. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). Santiago de Chile: 2010. 73 pag. Disponível em <http://www.cepal.org/publicaciones/xml/4/41764/lcw355e.pdf> [Acesso: em 26 de Novembro de 2013].

Oliveira PV. Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos e *Cryptosporidium* spp. no rio Atibaia, bacia do rio Piracicaba, Campinas, São Paulo. [Dissertação de Mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Technical Report Series 666. Intestinal protozoan and helminthic infections. Geneva: WHO; 1981. 154 p.

Organização Mundial de Saúde (OMS). The World Health Report. Geneva: WHO; 2002. 230 p.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Guidelines for drinking-water quality. 4th ed. Geneva: WHO; 2011. 564 p.

Ortega YR, Bonavia D. *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in ancient peruvians. J.Parasitol. 2003; 89(3): 635–636.

Pablo OJ, Chávez AV, Suárez F, Pinedo RV, Falcón N. *Giardia* spp. en caninos y niños de comunidades campesinas de tres distritos de Puno, Peru. Rev Inv Vet Perú 2012; 23(4): 462-468

Paintlia AS, Descoteaux S, Spencer B, Chakraborti A, Ganguly NK, Mahajan RC, Samuelson J. *Giardia lamblia* groups A and B among young adults in India. Clin Infect Dis. 1998; 26(1):190-1.

Palm D, Weiland M, McArthur AG, Winiecka-Krusnell J, Cipriano MJ, Birkeland SR, Pacocha SE, Davids B, Gillin F, Linder E, Svärd S. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. Mol Biochem Parasitol. 2005;141(2):199-207.

Partovi F, Khalili G, Kariminia A, Mahmoudzadeh-Niknam H. Effect of *Giardia lamblia* infection on the cognitive function of school children. Iranian J Publ Health. 2007; 36(1):73-78.

Paulino RC. Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP. [Tese de Doutorado] Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.

Paz VPS, Teodoro REF, Mendoça FC. Recursos hídricos, agricultura irrigada e meio ambiente. Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient. 2000; 4(3): 465-473.

Pérez-Cordón G, Rosales MJ, Valdez RA, Vargas-Vásquez F, Cordova O. Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2008; 25(1): 144-148.

Pérez GC, Cordova OPS, Vargas FV, Velasco JRS, Sempere LB, Sánchez MM, Rosales MJ. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitol Res*. 2008; 103(2):459-65.

Pickering LK, Woodward WE, DuPont HL, Sullivan P. Occurrence of *Giardia lamblia* in children in day care centers. *J Pediatr*. 1984; 104(4):522-6.

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 *SSU* rRNA and *GDH* genes. *Int J Hyg Environ Health*. 2008;211(5-6):524-533.

Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health*. 2010; 213(5):321-33.

Prado MS, Strina A, Barreto ML, Oliveira-Assis AM, Paz LM, Cairncross S. Risk factors for infection with *Giardia duodenalis* in pre-school children in the city of Salvador, Brazil. *Epidemiol Infect*. 2003;131(2):899-906.

Razzolini MT, Weir MH, Matte MH, Matte GR, Fernandes LN, Rose JB. Risk of *Giardia* infection for drinking water and bathing in a peri-urban area in Sao Paulo, Brazil. *Int J Environ Health Res*. 2011; 21(3):222-34.

Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol*. 2002; 32(2):229-231.

Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol.* 2004; 4(2):125-130.

Regoes A, Zourmpanou D, León-Avila G, van der Giezen M, Tovar J, Hehl AB. Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *J Biol Chem.* 2005; 280(34):30557-63.

Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg.* 1954; 59(2):209-20.

Rimhanen-Finne R, Ronkainen P, Hanninen M-L. Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage sludge by IC-PCR. *J Appl Microbiol.* 2001;91:1030-1035.

Robertson LJ, Paton CA, Campbell AT, Smith PG, Jackson MH, Gilmour RA, Black SE, Stevenson DA, Smith HV. *Giardia* cyts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Wat. Res.* 2000; 34 (8): 2310-2322

Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(8):5297-303.2006a

Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK, Strand E, Alvsvåg JO, Langeland N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(3):2212-2217.2006b

Robertson LJ, Forberg T, Gjerde BK. *Giardia* cysts in sewage influent in Bergen, Norway 15-23 months after an extensive waterborne outbreak of giardiasis. J Appl Microbiol. 2008;104(4):1147-1152.

Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, Mørch K, Langeland N. Giardiasis--why do the symptoms sometimes never stop?. Trends Parasitol. 2010; 26(2):75-82.

Rocha RS, Silva JG, Peixoto SV, Caldeira RL, Firmo JO, Carvalho O dos S, Katz N. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais, em escolares do município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33 (5):431-6.

Rochelle PA, De Leon R, Stewart MH, Wolfe RL. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. Appl Environ Microbiol. 1997; 63(1):106-114.

Roger AJ, Svärd SG, Tovar J, Clark CG, Smith MW, Gillin FD, Sogin ML. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95 (1):229-34.

Sabesp (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo). Site Sabesp, institucional. Disponível em:
<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=505> [Acesso: em 29 de Novembro de 2013].

Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, Capilla S, Arias A, Gómez-Lus R. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008; 27(1):81-3.

Santín M, Cortés Vecino JA, Fayer R. A large scale molecular study of *Giardia duodenalis* in horses from Colombia. Vet Parasitol. 2013; 196(1-2): 31-6.

Santos LU, Bonatti TR, Cantusio Neto R, Franco RM. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004; 46(6):309-13.

Santos LU, Cantusio Neto R, Franco RMB, Guimarães, JR. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. Eng. Sanit. Ambient. 2011; 16(2): 115-120 2011.

Santos CK, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, Mundim MJ, Cury MC. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012; 106 (8):473-9.

São Paulo (Estado). Decreto-Lei nº 15.642, de 9 de fevereiro de 1946. Aprova o regulamento do policiamento da alimentação pública. Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, 10 dez., 1946.

São Paulo (Estado). Decreto Estadual nº 33.047 de 4 de julho de 1958. Padroniza as condições das águas de alimentação. Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, 05 jul., 1958.

Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the Neglected Disease Initiative. Trends Parasitol. 2006; 22(5):203-208.

Seas C, Gotuzzo E. Cholera: Overview of Epidemiologic, Therapeutic, and Preventive Issues Learned from Recent Epidemics. Int J Infect Dis . 1996; 1 (1): 37–46.

Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental (SNSA). Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2011. Brasília: MCIDADES, 2013. 432 págs.

Simpson AG, Roger AJ. The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Curr Biol.* 2004; 14(17): R693-6.

Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int J Parasitol.* 1997; 27(10):1135-45.

Siripattanapipong S, Leelayoova S, Mungthin M, Thompson RC, Boontanom P, Saksirisampant W, Tan-Ariya P. Determination of discriminatory power of genetic markers used for genotyping *Giardia duodenalis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2011; 42(4):764-71.

Shaw PK, Brodsky RE, Lyman DO, Wood BT, Hibler CP, Healy GR, Macleod KI, Stahl W, Schultz MG. A communitywide outbreak of giardiasis with evidence of transmission by a municipal water supply. *Ann Intern Med.* 1977; 87(4):426-32.

Smith HV, Cacciò SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RC. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol.* 2006; 22(4):160-167.

Soares SRA, Bernardes RS, Cordeiro Netto OM. Relações entre saneamento, saúde pública e meio ambiente: elementos para formulação de um modelo de planejamento em saneamento. *Cad Saúde Pública.* 2002; 18(6): 1713-1724.

Soares RM, de Souza SL, Silveira LH, Funada MR, Richtzenhain LJ, Gennari SM. Genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* from exotic and wild animals kept in captivity in Brazil. *Vet Parasitol.* 2011; 180(3-4): 344-8.

Sogin ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peattie DA. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science*. 1989; 243(4887):75-7.

Sotiriadou I, Pantchev N, Gassmann D, Karanis P. Molecular identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from dogs and cats. *Parasite*. 2013; 20:8.

Sousa MC, Gonçalves CA, Bairos VA, Poiaraes-Da-Silva J. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001; 8(2):258-65.

Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, Gregori F, Soares RM. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. *Vet Parasitol*. 2007; 149(3-4):258-64.

Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(11):1444-52.

Sulaiman IM, Jiang J, Singh A, Xiao L. Distribution of *Giardia duodenalis* genotypes and subgenotypes in raw urban wastewater in Milwaukee, Wisconsin. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70(6):3776-80.

SUNASS (Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento). Cobertura de agua potable 2012. Indicadores de las EPS: Gerencia de Supervisión y Fiscalización SUNASS. Lima: 2012. Disponível em:
<http://intranet.sunass.gob.pe:81/indicadores/index.php/recursos/descargas/func-startdown/208/> [Acesso: em 21 de Novembro de 2013].

SUNASS (Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento). Cobertura de Alcantarillado 2012. Indicadores de las EPS: Gerencia de Supervisión y Fiscalización SUNASS. Lima: 2012. Disponible em:

<http://intranet.sunass.gob.pe:81/indicadores/index.php/cobertura-alcantarillado> [Acesso: em 21 de Novembro de 2013].

SUNASS (Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento). Tratamiento de Aguas Residuales 2012. Indicadores de las EPS: Gerencia de Supervisión y Fiscalización SUNASS. Lima: 2012. Disponible em:

<http://intranet.sunass.gob.pe:81/indicadores/index.php/recursos/func-startdown/219/> [Acesso: em 26 de Novembro de 2013].

Sykora JL, Sorber CA, Jakubowski W, Casson LW, Gavaghan PD, Shapiro MA, Schott MJ. Distribution of *Giardia* cysts in wastewater. Wat. Sci. Tech. 1991; 24(2):187-192.

Tamaki H, Zhang R, Angly FE, Nakamura S, Hong PY, Yasunaga T, Kamagata Y, Liu WT. Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. Environ Microbiol. 2012; 14(2):441-52.

Teixeira JC, Heller L, Barreto ML. *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. Cad. Saúde Pública. 2007; 23(6):1489-1493.

Thompson RC. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. Int J Parasitol. 2000; 30(12-13):1259-67.

Thompson RC, Hopkins RM, Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. Parasitol Today. 2000; 16(5):210-3.

Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. Vet Parasitol. 2004; 126:15-35.

Thompson RC, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. Adv Parasitol. 2004; 58:69-137.

Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernández M, Müller M, Lucocq JM. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. Nature. 2003; 426(6963):172-6.

Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. Parasitology. 2004; 128(3):253-62.

Ulloa-Stanojlovic FM. Infecciones por *Giardia sp.* en mascotas caninas de niños de educación primaria en tres instituciones educativas estatales del cono norte de Lima. Tesis [Graduação em Medicina veterinária e zootecnia] – Facultad de Veterinária y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia; Lima, Lima 2009.

USEPA. USEPA Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by Filtration/IMF/FA. Office of Water, Washington D.C.: EPA 816-R-12-001; 2012.

van der Giessen JW, de Vries A, Roos M, Wielinga P, Kortbeek LM, Mank TG. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. Int J Parasitol. 2006; 36(7):849-58.

van Keulen H, Feely DE, Macechko PT, Jarroll EL, Erlandsen SL. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. J Parasitol. 1998; 84(2):294-300.

Vidal MF, Gilman RH, Ungar BL, Verástegui MR, Benel AC, Marquis G, Penny M, Lanata C, Miranda E. Detection of *Giardia lamblia* antigen in children living in a Peruvian periurban shantytown (Pueblo Joven). J Clin Microbiol. 1991; 29(3):636-7.

Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. Acta Trop. 2007; 102(1):10-9.

Wallis PM, Erlandsen SL, Isaac-Renton JL, Olson ME, Robertson WJ, van Keulen H. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolated from drinking water in Canada. Appl Environ Microbiol. 1996; 62(8): 2789-97.

Wright J, Gundry SW. Household characteristics associated with home water treatment: an analysis of the Egyptian demographic and health survey. J Water Health. 2009; 7 (1): 21-29.

ANEXOS

Anexo 1 Declaração de anuência para pesquisa (Peru)

SERVICIO DE AGUA POTABLE Y ALCANTARILLADO DE LIMA

"Decenio de las Personas con Discapacidad en el Perú"
"Año de la Integración Nacional y del Reconocimiento de Nuestra Diversidad"

Carta N° 036 -2012-GRTDF

Lima, 10 de octubre del 2012,

Profa Asociada
Maria Helena Matté
Laboratorio de Saúde Pública
Departamento de Prática de Saúde Pública – HSP
Faculdade de Saúde Pública – USP
Avenida Doutor Arnaldo 715, Cerqueira Cesar
São Paulo, SP
Brasil

Asunto : Solicitud de autorización para colecta y uso de muestras para Estudio de Maestría en Agua residuales.

Referencia : Carta s/n del 17 de Setiembre del 2012-10-09

Con relación a su solicitud, en la cual requieren de muestras de agua residual bruta para el estudio "*Genotipaje de Giardia spp*", le indicamos que es factible brindar el apoyo solicitado; las coordinaciones serán realizadas con la Bióloga Sofia Basilio, quien acompañara al Sr. Francisco Miroslav Uloa Stanojlovic durante la toma de muestras.

Por otro lado, es conveniente precisar que la información sobre las evaluaciones de calidad de aguas residuales de las plantas de tratamiento de aguas residuales es de carácter confidencial, razón por la cual no debe ser publicada. Así mismo nuestra institución necesita contar con la información y resultados de las evaluaciones.

Sin otro particular, hago propicia la oportunidad para expresarle los sentimientos de mi especial consideración y estima.

Atentamente,

Sara Sarmiento Tirado
Gerente de Recolección
Tratamiento y Disposición Final (e)

Cc: GG/EOMPTAR/ Archivo

OFICINA PRINCIPAL - LA ATARJEIA: Autopista Ramiro Prialé 210 El Agustino - Central Telefónica: 317-3000 - AQUAFONO: 317-8000

CENTROS DE SERVICIOS Y AGENCIAS: ATE VITARTE: Av. Nicolás Aylón 2309 - Telf.: 326-6082 / BREÑA: Av. Tingo María 600 - Telf.: 425-5051
CALLAO: Av. Guardia Chalaca 1131 - Telf.: 429-0950 / CIENEGUILLA: Av. San Martín Zona C, Mz. D. Lt 2 Urb. Tambo Viejo - Telf.: 479-8705 / COMAS: Av. Víctor Andrés Belaúnde Oeste cdra. 5 Urb. El Retablo - Telf.: 536-1190 / LA MOLINA: Av. Javier Prado Este 5910-5912 Urb. La Fontana - Telf.: 436-2527 / PUNTA NEGRA: Antigua Panamericana Sur Mz. Y Lt. 01 y 02 Urb. La Merced Zona D - Telf. 231-5029 / SAN JUAN DE LURIGANCHO: Av. Próceres de la Independencia 3105 Urb. Canto Grande Telf.: 388-2478 / SAN MIGUEL: Av. Universitaria 1027 Telf.: 452-3232 / SURQUILLO: Av. Angamos Este 1450 - Telf.: 241-4018 / VENTANILLA: Calle 1 Mz F-15 Lt 19 Urb. La Bandera - Telf.: 553-7227 / VILLA EL SALVADOR: Av. Separadora Industrial 300 Sector 1 - Telf.: 291-2125 / ZARATE: Av. Gran Chimú 1017 Telf.: 376-1166 / Clientes Especiales: Jr. Huaraz 386 Esq. Venezuela Cdra. 8 Breña - Telf.: 424-8800

CURRÍCULO LATTES ALUNO

De acordo com a Portaria CPG/03/08 de 05/06/08, (primeira página) - do aluno **Francisco Miroslav Ulloa Stanojlovic**.

Possui graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia pela Universidade Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru (2002- 2008). Durante a graduação teve estágios na University of Flórida (Gainesville, EUA), como também em diversos setores da área de medicina veterinária (produção animal, medicina e clínica) no Peru e no Brasil. Trabalhou em duas fases do projeto "Abordagens inovadoras para o diagnóstico e controle da doença de Chagas" com o National Institute of Health (NIH, EUA) no Peru. Tem experiência em: Saúde Pública, Epidemiologia molecular, Doenças emergentes, zoonoses e parasitologia. Atualmente é aluno de mestrado pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e bolsista do CNPq. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Francisco Miroslav Ulloa Stanojlovic
Nome em citações bibliográficas	ULLOA-STANOJLOVIC F.M.;Ulloa F.;Ulloa-Stanojlovic F.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Avenida Doutor Arnaldo, 715 , Laboratório de Saúde Pública Cerqueira César 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (5511) 30617753 URL da Homepage: http://www.fsp.usp.br/site/
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2012	Mestrado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador: Maria Helena Matté. Co-orientador: Ronalda Silva de Araújo. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
2009 - 2010	Especialização em Estadística en Investigación. Universidad Peruana Cayetano Heredia, UPCH, Peru. Título: .. Orientador: Cesar Tipacti.
2008 - 2008	Especialização em Gestión de la Inocuidad en Alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina, UNALM, Peru. Título: .. Orientador: Jenny Valdez Arana.
2002 - 2009	Graduação. Universidad Peruana Cayetano Heredia, UPCH, Peru. Título: Infecciones por Giardia sp. en mascotas caninas de niños de educación primaria en tres instituciones educativas estatales del cono norte de Lima. Orientador: Nestor Gerardo Falcón Pérez.

CURRÍCULO LATTES ORIENTADORA

De acordo com a Portaria CPG/03/08 de 05/06/08, (primeira página) - da orientadora Prof^a. Dra. **Maria Helena Matté**

Maria Helena Matte (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Maria Helena Matte
Nome em citações bibliográficas	MATTE, M. H.;Matte, M. H.;Matté, M.H.;Matté, M. H.;MATTE, MARIA HELENA

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Prática de Saúde Pública. Avenida Doutor Arnaldo, 715 Cerqueira Cesar 01246904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30667769 Fax: (11) 8833501 URL da Homepage: http://
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2004	Livre-docência. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Aplicação de métodos moleculares no estudo de organismos do gênero Aeromonas, Ano de obtenção: 2004. Palavras-chave: Saúde Pública; Vigilância Sanitária; Microbiologia; Biologia molecular; Aeromonas. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública / Especialidade: Vigilância Sanitária. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Biologia e Fisiologia dos Microorganismos. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Molecular e de Microorganismos. Setores de atividade: Cuidado À Saúde das Populações Humanas.
1996 - 1998	Pós-Doutorado. University System of Maryland, USM, Estados Unidos. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Molecular e de Microorganismos.
1995 - 1996	Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Ribotipagem de Aeromonas hydrophila A. caviae, A. sobria e A. jandaei potencialmente patogênicas, isoladas de amostras de água do reservatório de Guarapiranga, São Paulo, Ano de obtenção: 1996. Orientador: Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini. Palavras-chave: Aeromonas; Guarapiranga; Biologia molecular. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Molecular e de Microorganismos. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Aplicada. Setores de atividade: Saúde Humana.