Quantificação e caracterização genotípica de *Cryptosporidium* spp. isolados de água bruta superficial e esgoto bruto para a monitorização em mananciais de abastecimento público na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP)

Ronalda Silva de Araújo

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

Área de concentração: Serviços de Saúde Pública.

Orientação: Prof^a. Associada Maria Helena Matté.

**São Paulo
2015**

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 tese.

DEDICATÓRIA

*À minha pequena e dedicada família Ronaldo,
Victor Hugo, Cleo, Sushi, Raika, Pity e Dudu pela
minha ausência durante a realização deste
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

- ✓ Agradeço a Deus por me dar força, saúde e esperança em todos os momentos da minha vida;
- ✓ À minha orientadora, Dra Maria Helena Matté, que me deu a oportunidade de realizar esse trabalho, me acolheu novamente no laboratório de Prática de Saúde Pública da USP e que, além disso, sempre esteve à disposição para o que fosse preciso;
- ✓ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo que permitiu minha participação neste projeto;
- ✓ À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que junto com a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) por meio do edital PITE-FAPESP nº 2010/50797-4, proporcionou o suporte financeiro desta pesquisa;
- ✓ À Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), pelo apoio e colaboração no controle, coleta e distribuição das amostras de água e de esgoto e pela parceria de anos nos incentivando no desenvolvimento científico e acadêmico;
- ✓ À Life Technologies, em especial Cinthia e Tomoko, pelo conhecimento e suporte técnico que foram fundamentais na execução deste projeto;
- ✓ Ao Laboratório de Protozoologia do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP e à Professora Dra. Regina Maura Bueno Franco e Nilson Branco, que gentilmente forneceram os oocistos de *Toxoplasma gondii* e ovos de *Ascaris suum* para a validação da PCR em tempo real;
- ✓ À Professora Dra. Regina Maura Bueno Franco do Laboratório de Protozoologia da UNICAMP pela atenção e por aceitar integrar a banca de avaliação deste trabalho;
- ✓ Ao Professor Dr. Rodrigo Martins Soares do Laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP pelas orientações e por aceitar o convite para integrar a banca de avaliação deste estudo;

- ✓ À Professora Dra. Maria Inês Zanoli Sato por ser tão solícita e aceitar o convite para participar da banca de avaliação deste estudo;
- ✓ À Professora Maria Tereza Pepe Razzolini do Laboratório de Biologia Ambiental da USP pelo processamento das amostras pelo Método 1623.1, ensinamentos sobre o tema da pesquisa e por aceitar participar da banca de avaliação deste estudo;
- ✓ À Professora Maria Anete Lallo pela amizade, por ter me motivado na área da pesquisa durante a minha graduação e por ser solícita mediante o convite para integrar a banca de avaliação deste estudo;
- ✓ Ao meu marido Ronaldo, pela cumplicidade e dedicação a mim e ao nosso filho Victor Hugo durante os quatro anos desta trajetória e por cuidar da nossa família com carinho;
- ✓ Ao meu amigo Adriano Pereira pelos 15 anos de amizade, que mesmo à distância torce por mim e pela minha carreira em todos os momentos;
- ✓ À minha amiga Milena (marida), pelo carinho, apoio intelectual e pessoal, alegrias e tristezas durante toda minha jornada na Faculdade de Saúde Pública/USP.
- ✓ Às minhas amigas Livia Carminato Balsalobre Zillo e Martha Rojas, pois há 10 anos formamos o quarteto que mais deu certo nesta vida porque fomos escolhidas para trilhar este caminho juntas;
- ✓ Às minhas amigas e companheiras de laboratório Bruna Aguiar (Bru) e Mariana Charleaux (Mari), pela amizade e por serem meus braços (direito e esquerdo) na execução deste trabalho;
- ✓ Ao meu amigo Lincoln Zappellini da Silva pela nova amizade e por conceder as fotos dos pontos de coleta utilizadas neste trabalho;
- ✓ Ao meu pai, uma pessoa simples e sábia que me ensinou que a humildade é a melhor virtude do ser humano;
- ✓ À família Nogueira especialmente minhas cunhadas Rosângela e Elisângela pela amizade, apoio e carinho;
- ✓ Por fim... A todos os meus amigos, próximos ou distantes, pela amizade, afinidades e sorrisos, pois os amigos são uma família que podemos escolher.

EPÍGRAFE

“O acesso à água potável é uma necessidade humana e, portanto, base do direito humano. A água contaminada compromete tanto a saúde física como social de todas as pessoas. É uma afronta à dignidade humana.”

Kofi Annan
Ex-Secretário das Nações Unidas

RESUMO

Araújo RS. Quantificação e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. isolados em água bruta superficial e esgoto bruto para a monitorização em mananciais de abastecimento público na região Metropolitana de São Paulo (RMSP) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2015.

As doenças de veiculação hídrica, sobretudo aquelas causadas por protozoários intestinais, emergiram como um dos principais problemas de saúde pública. Diferentes aspectos são abordados sobre a biologia e a epidemiologia dos principais protozoários parasitas de transmissão hídrica. *Cryptosporidium* está descrito como um importante parasita associado a casos de surtos de veiculação hídrica e alimentos no mundo. A epidemiologia complexa desse protozoário e o fato de que a maioria das espécies e genótipos não pode ser diferenciada morfollogicamente, aumentam o interesse por metodologias sensíveis e rápidas na detecção de espécies responsáveis pela infecção em humanos. Neste estudo foram avaliadas 50 amostras de água bruta superficial, coletadas no Rio São Lourenço da Serra (P1A) e Represa de Guarapiranga (P2A) e 50 de esgoto bruto coletadas em São Lourenço da Serra (P1E) e no poço vertical de Taboão da Serra (P2E) entre os meses de janeiro e dezembro de 2013. O isolamento dos oocistos na água foi realizado pelo Método 1623.1 e as amostras de esgoto bruto por centrifugação, separação imunomagnética (IMS). A caracterização genotípica ocorreu por meio da nested PCR, clonagem e sequenciamento com base no gene *18S rRNA* comum a todas as espécies de *Cryptosporidium*. O ensaio de PCR em tempo real (qPCR) foi avaliado simultaneamente para detecção e quantificação de oocistos nas amostras. De acordo com os resultados obtidos pela nested PCR, *Cryptosporidium* foi detectado na água bruta superficial em 12% (3/25) no manancial P1A e 16% (4/25) no P2A. No esgoto bruto o parasito foi detectado em 20% (5/25) das amostras no ponto P1E e 24% (6/25) no poço vertical P2E. A qPCR detectou 52% (0,79 a 1,85 oocistos/L) de amostras positivas no manancial P1A e o parasito foi detectado em 64% (0,72 a 1,4 oocistos/L) no manancial P2A. No esgoto bruto 72% das amostras foram positivas tanto no ponto P1E (7 a 655 oocistos/L) como no P2E (5 a 519 oocistos/L). A caracterização molecular permitiu a identificação de *C. parvum* e *C. hominis* na água bruta superficial, e *C. hominis*, *C. parvum*, e *C. muris* no esgoto bruto. As espécies do gênero *Cryptosporidium* identificadas neste estudo apresentam expressiva relevância para o desenvolvimento da doença humana. Neste sentido, as metodologias de concentração e caracterização empregadas nas análises demonstraram no geral, o potencial para aplicação em estudos de vigilância ambiental e foram úteis na diferenciação de espécies patogênicas. A presença de *C. muris* associada às espécies antroponóticas identificadas auxiliou na investigação de prováveis fontes de contaminação no ambiente confirmando a necessidade da expansão de medidas efetivas para proteção destes mananciais.

Descritores: Saúde Pública; *Cryptosporidium*; Genotipagem; Água Bruta Superficial; Esgoto Bruto; PCR quantitativo.

ABSTRACT

Araújo RS. Quantification and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from raw surface water and raw sewage for the monitoring of public water supply sources in the metropolitan region of São Paulo [Thesis]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da USP; 2015.

Waterborne diseases, especially those caused by intestinal protozoa, have emerged as a major public health problem. Different aspects are addressed on the biology and epidemiology of most waterborne protozoan parasites. *Cryptosporidium* is described as an important parasite associated with cases of waterborne and food outbreaks in the world. The complex epidemiology of this protozoan, as well as the fact that most species and genotypes cannot be differentiated morphologically, increase the interest for sensitive and rapid methods for the detection of species responsible for infection in humans. In this study, 50 samples of raw surface water were collected from São Lourenço River (P1A) and Guarapiranga Dam (P2A), and 50 samples of raw sewage were collected from São Lourenço da Serra (P1E) and from Taboão da Serra's vertical well (P2E), between January and December of 2013. The isolation of oocysts in water was carried out by the USEPA Method 1623.1 and raw sewage samples were processed by centrifugation, immunomagnetic separation (IMS). Genotypic characterization occurred by nested PCR, cloning and sequencing based on *18S rRNA* gene, which is common to all *Cryptosporidium* species. Real time PCR assays (qPCR) were carried out both for detection and quantification of oocysts simultaneously in the samples. According to the results obtained by nested PCR, *Cryptosporidium* was detected in raw surface water in 12% (3/25) of samples at P1A and in 16% (4/25) at P2A. In raw sewage the parasite was detected in 20% (5/25) of samples at P1E and 24% (6/25) in P2E vertical well. qPCR detected 52% (0.79 to 1.85 oocysts/L) of positive samples at P1A, while the parasite was detected in 64% (0.72 to 1.4 oocysts/L) of samples at P2A water supply. Regarding raw sewage, 72% of samples were positive both at P1E (7 to 655 oocysts/L) and P2E (5 to 519 oocysts/L). Molecular characterization allowed the identification of *C. parvum* and *C. hominis* in raw surface water, and *C. hominis*, *C. parvum* and *C. muris* in raw sewage. *Cryptosporidium* species identified herein belong to a group of organisms of significant relevance in waterborne diseases. Therefore, concentration and characterization methodologies applied in our analyses showed to be useful for environmental surveillance studies, as well as they were useful in the differentiation of human pathogens. The presence of *C. muris* associated to anthroponotic species helped in the investigation of likely contamination sources in the environment, confirming the need of expansion in effective measures to protect these water supplies.

Descriptors: Public Health; *Cryptosporidium*; Genotyping; Raw surface water; Raw sewage; quantitative PCR.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Considerações gerais.....	20
1.2 Aspectos relevantes no setor de saneamento no Brasil.....	28
1.2.1 Plano de Segurança da Água.....	32
1.3 O gênero <i>Cryptosporidium</i> e sua ocorrência no meio ambiente.....	34
1.4 Métodos de identificação de <i>Cryptosporidium</i>	42
2. OBJETIVOS.....	48
2.1 Objetivo geral.....	48
2.2 Objetivos específicos.....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 Área do estudo e periodicidade das coletas.....	49
3.2 Procedimento para concentração das amostras.....	52
3.2.1 Água bruta superficial.....	52
3.2.2 Esgoto bruto.....	54
3.3 Caracterização genotípica de <i>Cryptosporidium</i>	54
3.3.1 Extração de DNA total.....	54
3.3.2 Controles internos para confirmação das espécies isoladas.....	55
3.3.3 Clonagem.....	55
3.3.4 Reação em cadeia pela polimerase dupla (nested PCR).....	56
3.3.5 Bioinformática.....	58
3.4 Análise quantitativa (qPCR).....	59
3.4.1 Iniciadores e sonda TaqMan® (Applied Biosystems).....	59
3.4.2. Curva Padrão.....	60

3.4.3 Condições de amplificação da qPCR.....	61
3.4.4 Análises estatísticas.....	64
4. RESULTADOS.....	65
4.1 Detecção de <i>Cryptosporidium</i> nas amostras de água bruta pela nested PCR.....	65
4.2 Detecção de <i>Cryptosporidium</i> nas amostras de esgoto bruto pela nested PCR.....	67
4.3 Ensaio de validação da qPCR.....	75
4.3.1 Análise de sensibilidade dos iniciadores e sonda.....	75
4.3.2 Análise de especificidade dos iniciadores e sonda.....	77
4.3.3 Avaliação da reprodutibilidade da curva-padrão para quantificação.....	80
4.4. Resultados de detecção e quantificação de <i>C. hominis</i> / <i>C. parvum</i> nas amostras ambientais amplificadas pela qPCR.....	83
5. DISCUSSÃO.....	89
5.1 Considerações finais.....	105
6. CONCLUSÃO.....	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
8. ANEXOS.....	124
Detecção de cistos de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. pela técnica filtração/IMS/FA (Método 1623.1/EPA 2012), utilizando sistema Filta-Max®.....	A1
Detecção de cistos de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. por meio da técnica Concentração/IMS/FA (McCuin & Clancy, 2005) para Esgoto bruto (efluente primário).....	A2
Apresentação da capa do currículo Lattes.....	A3

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Aspectos históricos relevantes no setor de saneamento no Brasil.....	30
Quadro 2. Etapas para o desenvolvimento de um Plano de Segurança da Água.....	34
Quadro 3. Características e localização dos pontos de coleta utilizados no estudo.....	50
Quadro 4. Iniciadores e sonda do gene <i>18S rRNA</i> desenvolvidos neste estudo.....	59
Quadro 5. Condições de amplificação do DNA de <i>Cryptosporidium</i> pela qPCR.....	62
Quadro 6. Resultados da amplificação e caracterização genotípica pela nested PCR e sequenciamento das amostras de água bruta superficial e esgoto bruto.....	74
Quadro 7. Valores com as médias de Cts por número de cópias obtidas pela qPCR no ensaio de validação.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da reprodutibilidade da curva padrão utilizada nas amostras de água bruta para detecção de <i>Cryptosporidium</i> pela qPCR, apresentando os valores de Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação.....	80
Tabela 2. Avaliação da reprodutibilidade da curva padrão utilizadas nas amostras de esgoto bruto para detecção de <i>Cryptosporidium</i> pela qPCR, apresentando os valores de Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação.....	81
Tabela 3. Resultados de detecção e quantificação pela qPCR e o número de ciclos necessários para atingir o <i>threshold</i> durante a amplificação nas amostras de água bruta superficial.....	84
Tabela 4. Resultados de detecção e quantificação pela qPCR e o número de ciclos necessários para atingir o <i>threshold</i> durante a amplificação nas amostras de esgoto bruto.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rio São Lourenço da Serra (P1A)(A); Ponto de captação do esgoto bruto (P1E) gerado na cidade de São Lourenço da Serra (B). Fonte: Laboratório de Análises Biológicas do Departamento de Saúde Ambiental/USP.....	51
Figura 2. Reservatório do Guarapiranga (P2A) próximo ao ponto de captação (A); Poço vertical utilizado na coleta do esgoto bruto (P2E) de Taboão da Serra (B). Fonte: Laboratório de Análises Biológicas do Departamento de Saúde Ambiental/USP.....	51
Figura 3. Fluxograma do processamento das amostras de água bruta superficial e esgoto bruto para obtenção dos sedimentos utilizados na extração do DNA e amplificação das amostras por nested PCR e qPCR.....	53
Figura 4. Total de amostras (n=50) com percentual positivo para cada ponto de coleta obtidos pela nested PCR do gene <i>18S rRNA</i> do parasito <i>Cryptosporidium</i> na água bruta superficial.....	65
Figura 5. . Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos amplificados nas reações de nested PCR para o fragmento de 826pb. M (marcador de peso molecular 100bp), Ca (controle positivo amostra ambiental); As amostras 2 a 11 estão dispostas em ordem nas diluições: 1:10, 1:100 e 1:1000; nC+ (controle positivo da nested); dC+ (controle positivo direto da segunda amplificação); C- (controle negativo); Br (branco).....	66
Figura 6. Total de amostras (n=50) com percentual positivo em cada ponto de coleta obtidos pela nested PCR do gene <i>18S rRNA</i> do parasito <i>Cryptosporidium</i> no esgoto bruto.....	67
Figura 7. Alinhamento entre as sequências obtidas a partir dos fragmentos amplificados de 826pb do gene <i>18S rRNA</i> pela nested PCR de amostras ambientais e as sequências representantes das diferentes espécies e genótipos de <i>Cryptosporidium</i> disponíveis no banco de dados GenBank.....	69
Figura 8. Relações evolutivas dos táxons baseadas no método de Neighbor-Joining utilizando sequências do gene <i>18S rRNA</i> de diferentes espécies de <i>Cryptosporidium</i> disponíveis no banco de dados GenBank e os valores de bootstrap após 2000 réplicas. As demais amostras representadas pelas letras A e E são amostras positivas de água e esgoto oriundas deste estudo. As Amostras 15E (A) e 15E (B) referem-se a sequências clonadas de espécies mistas.....	73
Figura 9. Representação gráfica linear utilizada nas análises de sensibilidade da qPCR. O eixo X está representado pela quantidade de ciclos na reação e o eixo Y os valores da magnitude do sinal gerado (ΔR_n) nas condições da qPCR.....	76

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 3% mostrando bandas específicas de 150pb da curva padrão e controle positivo utilizado na qPCR....	76
Figura 11. Gráfico da curva padrão representando a curva de regressão linear utilizada na qPCR. No eixo X são apresentados os valores de quantificação e no eixo Y os valores de CTs. Na legenda a cor vermelha representa as amostras positivas da curva, a cor azul o controle positivo clínico e a cor verde DNA extraído de amostra de água bruta.....	77
Figura 12. Representação da curva padrão e amplificação positiva para <i>C. hominis</i> . de acordo com a legenda as amostras referentes às linhas A e B estão relacionadas com a curva-padrão e a linha F com o controle positivo clínico, as demais linhas representam os resultados de amplificação negativos referentes aos outros patógenos.....	78
Figura 13. Representação das curvas de amplificação positiva no qPCR para <i>C. parvum</i> e <i>C. hominis</i> . O ruído abaixo do limiar (<i>Threshold</i>) representa amostras negativas de outras espécies que não resultaram em amplificação. O eixo X está representado pela quantidade de ciclos na reação e o eixo Y os valores da magnitude do sinal gerado (ΔRn) nas condições da qPCR.....	79
Figura 14. Gráfico multicomponente representando o ensaio qPCR com a curva padrão e amplificação positiva para <i>C. hominis</i> e negativa para <i>C. muris</i> . O eixo X apresenta o número de ciclos da reação e o eixo Y os valores atribuídos a intensidade do sinal fluorescente. Na legenda em azul representando as amostras amplificadas com a sonda ligada ao corante <i>reporter</i> FAM e vermelho para o ROX.....	79
Figura 15. Representação gráfica do ensaio qPCR com amplificação positiva do IPC (<i>internal positive control</i>). As demais linhas representam os ruídos da reação de amplificação.....	82
Figura 16. Resultados obtidos para amostras de água bruta (P1A e P2A) e esgoto bruto (P1E e P2E), positivos e negativos para a presença de <i>Cryptosporidium</i> quando avaliadas por meio da reação de qPCR.....	86
Figura 17. Número de oocistos/L de acordo com os meses de coleta detectados na qPCR a partir do DNA de <i>Cryptosporidium</i> extraído diretamente nas amostras de água bruta superficial no ponto P1A.....	87
Figura 18. Número de oocistos/L de acordo com os meses de coleta detectados na qPCR a partir do DNA de <i>Cryptosporidium</i> extraído diretamente nas amostras de água bruta superficial no ponto P2A.....	87
Figura 19. Número de cópias/L do fragmento <i>18S rRNA</i> a partir do DNA de <i>Cryptosporidium</i> extraído diretamente das amostras de esgoto bruto no ponto P1E.....	88
Figura 20. Número de cópias/L do fragmento <i>18S rRNA</i> a partir do DNA de <i>Cryptosporidium</i> extraído diretamente das amostras de esgoto bruto no ponto P2E.....	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Embora a água seja o componente mais abundante na natureza, ocupando $\frac{3}{4}$ da superfície da terra, a questão da disponibilidade e da qualidade da água utilizada para consumo tornou-se um assunto relevante para as autoridades sanitárias e comunidade científica. O interesse pela temática justifica-se pelo fato de que todos os seres vivos são dependentes deste recurso para sobreviver (SOUZA et al., 2010).

Todavia, a utilização de água potável no desenvolvimento das atividades humanas aumentou ao longo dos anos e, em contrapartida, a quantidade de água disponível para consumo que possa satisfazer tais finalidades não acompanhou esse crescimento. A crescente demanda de recursos hídricos somada à falta de planejamento nos centros urbanos, uso inadequado da água e lançamento de esgoto doméstico e industrial em rios, riachos ou lagos, contribuíram significativamente com o panorama de degradação dos mananciais (SOUZA et al., 2010; LEONETI et al., 2011).

Os sistemas hídricos contaminados têm o potencial de causar doença e atingir um grande número de pessoas provocando surtos. No Brasil, ações conjuntas de órgãos públicos e privados por meio de políticas de saneamento ambiental, diretrizes e metas para universalização dos serviços de saneamento têm estimulado o aprimoramento no setor de abastecimento e tratamento de água (ANA, 2010; LEONETI et al., 2011).

A importância da água como meio de veiculação de doenças entéricas é reconhecida mundialmente. Nesse sentido, a necessidade de investimentos e planejamento de ações de saneamento e esgotamento sanitário tornou-se indispensável considerando que

o efluente tratado tem por finalidade reduzir os impactos ambientais e promover a saúde da população, interrompendo o ciclo de transmissão de doenças (OMS, 2003; GOMES et al., 2011).

Os microrganismos patogênicos quando presentes na água destinada para o consumo humano indicam a inexistência ou inadequação do tratamento de dejetos e da proteção aos mananciais utilizados para abastecimento público. O problema central reside no fato de que esses eventos apresentam consequências econômicas e sociais relacionadas aos custos com o tratamento adequado da água, ações coletivas de saúde e tratamento dos indivíduos afetados, podendo até mesmo gerar falta de confiança na qualidade da água potável utilizada pela população (KARANIS et al., 2007).

A gastroenterite infecciosa é uma síndrome aguda geralmente identificada nas doenças relacionadas ao saneamento. A infecção provoca distúrbios no sistema gastrointestinal gerando quadros de diarreia, cólicas intestinais, vômitos e complicações relacionadas à desidratação severa, o que torna a doença extremamente relevante para a Saúde Pública. Estima-se que a incidência anual de casos de diarreia aguda no mundo seja de 4,6 bilhões de episódios gerando 2,2 milhões de mortes a cada ano (OMS, 2010).

De acordo com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), os dados sobre mortalidade infantil em menores de cinco anos de idade são preocupantes, com duas mil mortes diárias causadas por doenças diarreicas das quais 90% são relacionadas à água contaminada, falta de saneamento e práticas inadequadas de higiene. Para a UNICEF os números são alarmantes uma vez que aproximadamente 800 milhões de pessoas em todo mundo não tem acesso à água potável e os índices de saneamento básico são igualmente preocupantes, de tal modo que a melhoria na qualidade da água poderia reduzir de maneira significativa à mortalidade infantil em todo o mundo (UNICEF, 2013).

Diretrizes para proteção da saúde humana com base na qualidade da água potável têm sido publicadas regularmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O Guia para Qualidade da Água de Consumo (*Guidelines for Drinking-water Quality*) fornece subsídios para avaliação da qualidade da água e redução de risco à saúde recomendando os valores guia dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos, com a finalidade de que o produto consumido pela população seja de qualidade para proteção e promoção da saúde humana (OMS, 2011).

Os mananciais utilizados para captação de água para o consumo humano podem conter substâncias em suspensão muito variadas, apresentando características físicas e químicas próprias e quantidades adicionais de compostos orgânicos e inorgânicos provenientes de despejos domésticos e industriais, podendo alterar ainda mais o perfil do manancial influenciando inclusive a microbiota aquática. Portanto, é preciso ampliar as medidas de proteção e fazer a readequação dos processos de tratamento de água para cada ponto de captação em cada região (ANA, 2010).

A Organização Mundial da Saúde recomenda o uso do Plano de Segurança da Água (PSA) pelos órgãos de gestão de água. O PSA fornece instrumentos para diretrizes operacionais como, por exemplo, o mapeamento do sistema de abastecimento, a identificação e avaliação dos riscos ao consumidor desde a captação da água até o produto final a ser distribuído. Refere-se ainda à monitorização e adequação das medidas de controle preventivas visando melhora efetiva na qualidade da água utilizada para abastecimento (OMS, 2005).

Para adquirir a característica de potabilidade a água deve ser submetida ao tratamento convencional que segue parâmetros físicos, químicos e microbiológicos pré-determinados. No Brasil, a Portaria nº 2914, publicada pelo Ministério da Saúde em dezembro de 2011 e que estabelece os padrões de qualidade da água para o consumo

humano, ressalta a importância das boas práticas no abastecimento de água sob a perspectiva do risco à saúde humana, reconhecendo assim no seu inciso VI do artigo 13, a importância do PSA recomendado pela OMS (BRASIL 2011b).

O controle laboratorial de contaminação da água por microrganismos patogênicos é possível mediante a análise da presença ou ausência de indicadores bacteriológicos. Os coliformes totais incluindo os principais gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter* e os coliformes termotolerantes (que tem como principal representante a bactéria *Escherichia coli*) são utilizados no processo de avaliação da água por contaminação de origem fecal. Porém, diferentes processos analíticos são necessários para determinação destes indicadores e a ausência de um microrganismo não elimina a presença de outros tornando a análise insuficiente na proteção da saúde humana (BRASIL, 2004; BETTEGA et al., 2006).

Os protozoários entéricos pertencem a um grupo de organismos de expressiva relevância nas doenças de veiculação hídrica e representam um desafio para as autoridades de saúde e indústrias produtoras de água. Em geral, esses agentes exibem em sua constituição biológica características particulares como a eliminação de grande número de formas infecciosas no ambiente e a resistência aos processos convencionais de tratamento de água, eficientes na remoção de bactérias e vírus patogênicos, porém insuficientes na inativação e eliminação de cistos e oocistos na água (ROSEN, 2000; RYU & ABBASZADEGAN, 2008).

Os gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia* estão entre os principais protozoários intestinais estudados no mundo, podendo ser transmitidos ao homem por meio da água e alimentos contaminados com oocistos e cistos infecciosos. Nos Estados Unidos os dois parasitos estão associados a mais de 50% dos surtos de água de consumo humano captadas de fontes superficiais registrados no período 1986 a 2000, e em segundo lugar está a

enterobactéria *Escherichia coli* O157:H7 (ARNONE e WALLING, 2007; BALDURSSON E KARANIS, 2011).

A maior parte dos casos contaminação de água associados a surtos de criptosporidiose e giardose ocorreu na América do Norte e no Reino Unido. A deficiência nos processos de tratamento e pós-tratamento em conjunto com o aumento do número de casos da doença no homem, são as razões principais para propagação dos surtos citados (KARANIS et al., 2007; CHALMERS et al., 2010).

No Brasil, a norma de potabilidade da água vigente, está atenta à importância do monitoramento dos protozoários na água de abastecimento e tornou obrigatória, conforme os princípios do PSA, a pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* quando for identificada média geométrica anual maior ou igual a 1.000 *Escherichia coli*/100mL de forma a garantir qualidade da água potável e proteger a saúde da população (BRASIL, 2011b).

Nesse ponto, considerando a água como um importante veículo de transmissão dos patógenos causadores da criptosporidiose e da giardose em humanos e animais, diferentes ferramentas metodológicas que objetivam a identificação de seus oocistos e cistos em fontes de água e esgoto sanitário foram avaliadas e tornaram-se disponíveis na comunidade científica (CAREY, 2004).

Além disso, é possível avaliar o significado para a saúde humana da presença desses patógenos na água, mediante a determinação da probabilidade de infecção no hospedeiro humano. A Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM) é uma ferramenta utilizada para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos e é amplamente recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Agência de Proteção Ambiental Americana (*United States Environmental Protection Agency* - USEPA) para instrumentalizar políticas de proteção de mananciais e de controle de qualidade de águas de consumo humano (USEPA, 2005; IGNOTO, 2010).

AQRM fornece dados sobre o risco de infecção por *Cryptosporidium* e *Giardia* estimando a probabilidade de infecção devido à ingestão de água contaminada, com base nas concentrações dos protozoários detectados na água. Entretanto, fatores limitantes como a recuperação do método utilizado na pesquisa do parasito, falta de dados sobre a viabilidade, infectividade e imunidade podem influenciar de forma negativa na avaliação de risco, superestimando os dados (SATO et al., 2013).

Estudos epidemiológicos em nosso país ainda estão em andamento. Embora tenha sido instituído desde a década passada o Programa de Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA) ainda não está estruturado de forma adequada em todo país. Entretanto, o programa tem permitido elucidar alguns surtos de veiculação hídrica associados a protozoários e vírus, como o ocorrido em General Salgado no ano 2000, que teve como agente etiológico *Cyclospora cayetanensis* e o surto de norovírus ocorrido tanto na Baixada Santista como no interior do Estado (CVE, 2008; CVE, 2010).

Frente à ausência de metodologias padronizadas para detecção e monitoramento de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) propôs o Método 1623 para identificação simultânea desses protozoários, o qual foi recém-revisado. O processo envolve etapas de filtração, concentração, purificação por separação imunomagnética (IMS), análise e confirmação dos gêneros por imunofluorescência (IF) e contraste interferencial diferencial (DIC) (USEPA, 2012).

Deve-se observar, no entanto, que a IMS apresenta comportamento variável em amostras de água com alta turbidez. Outras limitações do Método 1623 estão relacionadas com a incapacidade de distinguir as espécies ou genótipos que afetam o homem e a infectividade dos oocistos, uma vez que somente microrganismos viáveis fornecem riscos à saúde humana (DiGIORGIO et al., 2002; BAQUE et al., 2011).

Uma variedade de técnicas de concentração foi sugerida e utilizada para a pesquisa e o isolamento dos oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em amostras de água (FRANCO e CANTUSIO, 2002; HIGGINS et al. 2003; HACHICH et al., 2004; JIANG et al., 2005; McCUIN e CLANCY, 2005; RAZZOLINI et al., 2010; ARAUJO et al., 2011).

Em geral, as técnicas descritas apresentam limitações, como por exemplo, a demora nos procedimentos, baixa reprodutibilidade e custo elevado. Contudo, é importante ressaltar que não há restrição quanto à aplicação de tais metodologias desde que estes métodos sejam validados e se ateste a equivalência ao Método 1623 (PEREIRA et al., 2009).

Um estudo interlaboratorial realizado nos Estado de São Paulo e Minas Gerais, com água bruta superficial, teve como objetivo avaliar o desempenho das principais metodologias de concentração propostas, de acordo com as características dos mananciais nacionais. Os pesquisadores concluíram que, embora o método de filtração em membranas apresentasse bons resultados na recuperação, o sistema Filita-Max® apresentou melhor desempenho e atendeu a todos os critérios para análise de *Cryptosporidium* e *Giardia* (FRANCO et al., 2012).

As técnicas de maior sensibilidade, especificidade e rapidez como amplificações de ácidos nucléicos através da PCR (reação em cadeia pela polimerase) despertaram o interesse dos pesquisadores por superar algumas limitações dos métodos convencionais na detecção e caracterização de organismos patogênicos principalmente em amostras ambientais (XIAO et al., 2004).

Logo, as técnicas genotípicas tornaram-se necessárias no apoio às investigações epidemiológicas, sendo particularmente importantes durante a averiguação de fontes suspeitas podendo discriminar entre os gêneros e as espécies de protozoários detectados e

auxiliar em casos de surtos da doença ou casos esporádicos (XIAO et al., 2004; RYAN et al., 2005; PLUTZER e TOMOR, 2009; ROBERTSON et al., 2010).

A técnica de reação de amplificação em tempo real (qPCR) é considerada uma técnica promissora para detecção e quantificação de diferentes organismos em diversos tipos de amostras. A qPCR é um sistema adaptado para detecção de sequências alvo que permite a determinação da variabilidade genética entre os isolados e medir a quantidade relativa de DNA acumulada ao final dos ciclos da reação (GUY et al., 2003; STROUP et al., 2006; ALONSO et al., 2011; RYU et al., 2010; STAGGS et al., 2013).

As vantagens em relação ao PCR convencional estão na redução do tempo do ensaio, redução de riscos de contaminação e aumento da sensibilidade. O procedimento segue o princípio geral da reação em cadeia pela polimerase, e sua característica fundamental é que o DNA amplificado é detectado por uma sonda específica fluorescente ou um corante de ligação ao DNA que emite um sinal após a hibridização com o DNA alvo complementar dupla-fita, assim a reação progride e pode ser acompanhada em tempo real (ALONSO et al., 2011).

Na literatura avaliada, diferentes problemas relacionados ao PCR em tempo real são citados, desde a sensibilidade das sondas para limites de detecção mais sensíveis como componentes inibitórios frequentemente encontrados em amostras ambientais resultando em redução significativa da sensibilidade e cinética da técnica. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliação mais precisa da aplicabilidade dessa metodologia e ainda, para compreender qual o significado para a saúde pública da detecção e identificação de espécies de *Cryptosporidium* no meio ambiente (STROUP et al., 2006; ALONSO et al., 2011; STAGGS et al., 2013).

1.2. Aspectos relevantes no setor de saneamento no Brasil

O planejamento dos sistemas de saneamento em centros urbanos é fundamental para promover a saúde humana e gerar impactos positivos sobre o meio ambiente (SOARES et. al., 2002). De acordo com HELLER (1998), a consolidação do enfoque “saúde, saneamento e meio ambiente” foi crucial para sensibilizar e orientar organizações governamentais, técnicos da área e a população sobre os efeitos dos agentes poluidores no ambiente como um fator determinante de agravos à saúde humana.

O objetivo do saneamento do meio está relacionado a um conjunto de medidas que visam garantir melhores condições de saúde à população e evitar a contaminação e proliferação de doenças. Desta forma, o saneamento compreende o sistema de abastecimento de água e esgoto, sistema de coleta e disposição de resíduos sólidos, drenagem urbana, e o controle de vetores, e constitui componentes importantes a serem enfatizados nas políticas públicas em saúde e para prevenção da morbi-mortalidade (GOMES et al., 2011).

Muito embora os investimentos na área de saneamento no Brasil tenham ocorrido em alguns períodos específicos entre 1970 e 1980, atualmente o setor tem recebido maior atenção governamental e uma significativa quantia de recursos a serem investidos. A partir dessas considerações, entende-se que as aplicações dos recursos devem viabilizar os órgãos gestores no cumprimento dos aspectos legais, atender aos padrões mínimos de qualidade a fim de melhorar os índices de saúde, e finalmente garantir a sustentabilidade dos mesmos (SOARES et al., 2002; LEONETI et al., 2011).

A partir de 1960, os serviços públicos de abastecimento de água e coleta de esgotos eram realizados por serviços municipalizados com o apoio técnico da atual Fundação Nacional de Saúde – FUNASA do Ministério da Saúde. A partir da consolidação do Plano

Nacional de Saneamento - PLANASA na década de 70, foram constituídas as empresas estaduais de saneamento encarregadas da prestação de serviços públicos urbanos de água e esgotos, entre elas a SABESP em São Paulo, a COPASA em Minas Gerais e a CEDAE no Rio de Janeiro (PEREIRA JUNIOR, 2008). O Quadro 1 apresenta a evolução histórica no setor de saneamento no Brasil desde o século XX até o início do século XXI.

Diretrizes nacionais para o saneamento básico e para a política federal de saneamento básico voltado para melhoria da oferta da quantidade e qualidade da água estão representadas pela Lei 9.433/1997 que se refere ao Plano Nacional de Recursos Hídricos (PNRH) e pela Lei 11.445/2007 que instituiu o Sistema Nacional de Informações em Saneamento Básico que, entre outras providências, motivaram a cooperação entre os municípios, estados e o Distrito Federal na ampliação do acesso a serviços de saneamento básico de qualidade, com ênfase na redução das desigualdades regionais e melhoria da qualidade de vida da população brasileira (PEREIRA JUNIOR, 2008; ANA, 2010).

No entanto, as ações relacionadas ao meio ambiente e controle da poluição que complementam as leis vigentes são elaboradas pelas agências regulamentadoras como, por exemplo, a resolução do CONAMA Nº 430 de 13 de Maio de 2011, que complementa e altera a Resolução nº 357/2005 sobre a classificação e diretrizes ambientais para a proteção dos corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes (MMA, 2011).

Quadro 1. Aspectos históricos relevantes no setor de saneamento no Brasil

Período	Características da evolução
Décadas de 30 e 40	<ul style="list-style-type: none"> • Apresentação do primeiro instrumento de controle de uso dos recursos hídricos no Brasil: Código das águas (1934).
Décadas de 50 e 60	<ul style="list-style-type: none"> • Primeiras iniciativas para estabelecer parâmetros físicos, químicos e microbiológicos definidores da qualidade das águas por meio de Legislações estaduais e no âmbito federal.
Década de 70	<ul style="list-style-type: none"> • Consolidação do PLANASA – Plano Nacional de Saneamento, com ênfase no índice de atendimento por sistemas de abastecimento de água; criação da Secretaria Especial do Meio Ambiente (SEMA) com base nos conceitos de ecologia e meio ambiente.
Década de 80	<ul style="list-style-type: none"> • Surgimento de instrumentos legais definidores de políticas e ações do governo brasileiro com a Política Nacional do Meio Ambiente; Revisão de normas e instrumentos técnicos dos padrões de qualidade das águas (resolução 20/86 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA).
Década de 90	<ul style="list-style-type: none"> • Planejamento e ações de saneamento com base no conceito de desenvolvimento sustentável; Portaria MS nº 36/90 que estabelece normas e padrões para qualidade da água de consumo; Instituição da Política e do Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos (Lei 9.433/97).
Século XXI	<ul style="list-style-type: none"> • Portaria MS 1.469/2000 – revisão dos padrões de potabilidade e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e os padrões de potabilidade, substituída pela Portaria MS nº 518/2004; • Resolução do CONAMA 274/2000, define os critérios de balneabilidade nas águas brasileiras. Considerando ser a classificação das águas doces, salobras e salinas essencial à defesa dos níveis de qualidade, avaliadas por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar as condições de balneabilidade. • Resolução do CONAMA 357/2005, classifica os corpos d'água e dispõe sobre diretrizes ambientais, e estabelece padrões e condições de lançamentos de efluentes de qualquer fonte poluidora; • Lei 11.445/2007 estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico; • Resolução CONAMA 396/2008, classifica as águas subterrâneas e define procedimentos para análise e controle de qualidade para o monitoramento das águas subterrâneas; • Resolução CONAMA 430/2011, altera a resolução 357/2005 e estabelece que qualquer fonte poluidora só poderá ser lançada nos corpos de água após o devido tratamento obedecendo aos padrões orgânicos e inorgânicos determinando o automonitoramento pelos responsáveis pela fonte poluidora; • Portaria nº 2.914/2011 revoga e substitui a portaria 518/2004 e dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

Adaptado de SOARES et al., 2002; ANA 2010; BRASIL 2011b.

Com o desenvolvimento na área de saneamento e seguindo a tendência mundial, houve a necessidade da implantação de normas e revisões técnicas voltadas para melhoria da qualidade da água e esses padrões são obtidos segundo orientações da Portaria MS 2914/2011 recentemente revisada (BRASIL, 2011b).

De acordo com LEONETI et al. (2011), o saneamento no Brasil ainda está marcado por grande desigualdade e deficiência de acesso, principalmente nas regiões Norte e o Nordeste, em face à diversidade socioeconômica da população. Ainda de acordo com os autores, os índices mais críticos estão relacionados à coleta e tratamento de esgoto, visto que a maior parte dos serviços prestados está relacionada ao abastecimento de água.

Dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento Básico (SNIS), em 2012, demonstram que o atendimento de abastecimento de água da população brasileira total apresentou índice médio nacional nas áreas urbanas de 93,2% e para a rede coletora de esgotos 56,1%, destacando as regiões Sul e Sudeste. Já a média do país para o tratamento do esgoto gerado é de 38,7% e coletados 69,4%, com destaque para a região Centro-Oeste, com 44,2% tratados e 90% coletados (SNIS, 2014).

O acesso à água tratada por meio de rede de abastecimento é um dos serviços urbanos mais disponibilizados nos municípios brasileiros, sendo somente superado pela energia elétrica. No Estado de São Paulo, o principal centro econômico do país, o índice de atendimento de água na área urbana é de 99,3%, valor considerado praticamente universal e para esgoto coletado 95,5% com 74,9% tratado. De acordo com a Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados - SEADE, apesar dos valores expressivos apresentados pelo estado, ainda é alarmante o percentual de carga poluidora remanescente de tratamento de esgoto que retorna para os recursos hídricos, 59,4% (FUNDAÇÃO SEADE, 2012).

Os estados que mais investiram nos últimos três anos em serviços de água e esgotos no Brasil foram: São Paulo, liderando os investimentos realizados, Minas Gerais, Bahia,

Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, com 64,2% do total investido. Por outro lado, os cinco estados que menos investiram foram Amazonas, Acre, Maranhão, Amapá e Alagoas, que juntos têm participação de apenas 1,2% do total (SNIS, 2014).

Dessa forma, com objetivo de promover a melhoria no setor e reduzir as deficiências, outras providências são adotadas como: O programa de incentivo ao tratamento de esgoto – PRODES, gerenciado pela Agência Nacional de Águas, o Programa Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental - VIGIÁGUA e projetos de desenvolvimento tecnológico e inovação associados a institutos de pesquisa e parcerias público-privadas, contribuindo na estratégia de universalização dos serviços e no crescimento econômico do país. O PNSB (Plano Nacional de Saneamento Básico) previsto na Lei nº 11.445/2007 que teve sua versão final aprovada pelo Decreto presidencial Nº 8.141 de 20 de Novembro de 2013, norteia o planejamento dos programas governamentais e os procedimentos para avaliação e monitoramento do saneamento básico no Brasil com visão estratégica de futuro (LEONETI et al., 2011; TRATA BRASIL, 2014).

1.2.1. Plano de Segurança da Água (PSA)

A baixa qualidade da água põe em risco não só a saúde humana como dos ecossistemas naturais já ameaçados por mudanças climáticas extremas (ANA, 2010). Devido ao crescimento populacional, mudanças demográficas e a quantidade de detritos despejados no ambiente aquático superando sua capacidade de decomposição natural, tornam-se necessárias medidas preventivas de ações conjuntas pelas autoridades de saúde pública e novos planejamentos pelos serviços de água e saneamento para garantir a segurança da água consumida pela população (OMS, 2012).

A redução dos contaminantes na fonte e o monitoramento sistemático são ainda a forma mais efetiva e barata de proteger a qualidade da água. Além dos microrganismos introduzidos nos sistemas aquáticos pela contaminação fecal humana e animal, as atividades agrícolas e poluentes industriais, entre eles os contaminantes emergentes como disruptores endócrinos e produtos farmacêuticos, contribuem para a alteração química, física e biológica da água (ANA, 2010).

O PSA tem sua metodologia baseada na gestão de riscos para saúde pública auxiliando na garantia da qualidade da água para o consumo humano. Como o plano apresenta abordagem preventiva, ele norteia os governantes e as empresas produtoras de água, não só na tomada de decisões e estratégias para melhoria da qualidade, como na definição das responsabilidades quando os padrões pré-determinados não são atendidos (OMS, 2011).

No Brasil os estudos e as ferramentas necessárias para instalação do PSA em sistemas de abastecimento estão sendo alcançados através de iniciativas de gestão coletiva entre o Ministério da Saúde, Secretarias de Vigilância em Saúde, empresas produtoras de água potável e órgãos fiscalizadores (BRASIL, 2012).

Entretanto, o gerenciamento deve ter uma abordagem preventiva em relação à origem e às fontes de captação de água, e como alguns aspectos relacionados com a gestão da qualidade da água não competem somente aos responsáveis pelo sistema de abastecimento de água o desenvolvimento do PSA deve ser acompanhado pelos comitês de Bacias Hidrográficas da região e representantes do setor de saúde (OMS, 2011). No Quadro 2, está descrita a abordagem geral da constituição do Plano de Segurança da Água, com as normas estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (BRASIL, 2012).

Quadro 2. Etapas para o desenvolvimento de um Plano de Segurança da Água.

Etapas preliminares	Planejamento das atividades, levantamento das informações, constituição da equipe técnica multidisciplinar e implantação do PSA.
Avaliação do sistema	Descrição do sistema de abastecimento de água e validação do diagrama de fluxo, identificação e análise de perigos e caracterização de riscos e estabelecimento de medidas de controle dos pontos críticos.
Monitoramento operacional	Controlar os riscos e garantir que as metas de saúde sejam atendidas por meio da seleção dos parâmetros de monitoramento e estabelecimento de limites críticos e de ações corretivas.
Planos de gestão	Verificação constante do PSA, estabelecimento de ações em situações de rotina e emergenciais, organização da documentação da avaliação do sistema, estabelecimento de comunicação de risco, e validação e verificação periódica do PSA.
Revisão do PSA	Considerar: Os dados coletados no monitoramento, as alterações dos mananciais e das bacias hidrográficas, as alterações no tratamento e na distribuição, a implementação de programas de melhoria e atualização, os perigos e riscos emergentes. O PSA deve ser revisado após desastres e emergências para garantir que estes não se repitam.
Validação e verificação do PSA	Avaliar o funcionamento do PSA e saber se as metas de saúde estão sendo alcançadas.

Adaptado de BRASIL, 2012.

Um conjunto de ações e não somente o controle laboratorial, está estabelecido na legislação nacional vigente como, por exemplo, boas práticas em abastecimento de água e a abordagem de múltiplas barreiras baseada nos princípios da análise de risco onde se estabelecem os procedimentos para prevenir, reduzir, eliminar ou minimizar a contaminação (BRASIL, 2011b).

1.3 O gênero *Cryptosporidium* e sua ocorrência no meio ambiente

O *Cryptosporidium* é um coccídia pertencente ao filo Apicomplexa, que habita preferencialmente as células da mucosa do trato gastrointestinal de diferentes hospedeiros,

incluindo o homem. O protozoário tornou-se importante na área médica por causar diarreia transitória em indivíduos imunocompetentes e diarreia crônica de difícil tratamento em pacientes com imunodeficiências, podendo levá-los ao óbito (FAYER et al., 2000; FAYER, 2010; CHALMERS & DAVIES, 2010).

A criptosporidiose ainda é endêmica na maioria das regiões tropicais. A infecção se dá pela rota fecal-oral. O parasito apresenta baixa dose infectante em indivíduos saudáveis (≤ 10 oocistos) que podem continuar eliminando oocistos infecciosos até 60 dias após o desaparecimento dos sintomas gastrointestinais (CDC, 2012).

As principais vias de transmissão são o contato entre o homem e os animais, pessoa-pessoa ou através da ingestão de oocistos infectantes presentes na água e alimentos contaminados. Portanto, a prevalência em locais onde a moradia e o saneamento são precários aumenta o risco de contágio e consequentemente de surtos da doença (WHO, 2006; FRANCO 2007).

Em países em desenvolvimento, as crianças menores de 5 anos de idade são constantemente acometidas e a infecção crônica provoca distúrbios cognitivos e nutricionais alterando o metabolismo corporal. Considerando esses fatores, *Cryptosporidium* é descrito como um patógeno emergente e a criptosporidiose está inserida na lista das doenças negligenciadas da Organização Mundial de Saúde desde 2004 (HUNTER et al., 2005; SAVOLI et al., 2006; CHALMERS & KATZER, 2013).

Devido à importância dos animais como reservatório e sua capacidade de disseminar oocistos infectantes no meio ambiente, o potencial zoonótico do parasito é avaliado em diferentes estudos taxonômicos (XIAO, 2004; FAYER, 2010; RYAN & POWER, 2012). A epidemiologia complexa e o fato de que a maioria das espécies e genótipos não pode ser distinguida morfológicamente fazem aumentar significativamente o interesse por métodos mais sensíveis e específicos indispensáveis na detecção e

diferenciação de espécies responsáveis pela infecção no homem (RYAN et al., 2005; HUMBER et al., 2007; ANTUNES et al., 2008; FERES et al., 2009; SAMRA et al., 2011; RYAN et al., 2014).

A caracterização genotípica favoreceu o conhecimento e a compreensão sobre a diversidade genética entre os organismos deste gênero. Naturalmente, após a re-descrição taxonômica feita por UPTON & CURRENT em 1985, a espécie *C. parvum* passou a ser utilizada amplamente para descrever o parasito no homem, bezerros e gados e outros mamíferos, além de ser utilizado em ratos como modelo experimental. De fato, *C. parvum* é considerado um complexo de múltiplas espécies e muitos genótipos de *Cryptosporidium* foram descritos como *C. parvum* antes de serem caracterizados como espécies novas (XIAO et al., 2004; FAYER, 2010; REN et al., 2011).

A taxonomia atual descreve 26 espécies e mais de 40 genótipos para o gênero *Cryptosporidium*, e algumas destas espécies são reconhecidas, por diversos pesquisadores, como possíveis agentes de doença no homem, entre elas o *C. parvum* (genótipo bovino ou tipo II), *C. hominis* (*C. parvum*, genótipo humano ou tipo I), *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* e *C. cuniculus* que são constantemente relatados em pacientes imunocompetentes e *C. parvum*, *C. hominis*, *C. muris*, *C. baileyi*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* e *C. suis*, os quais estão relacionados com criptosporidiose em pacientes imunocomprometidos (XIAO et al., 2004; CACCIÒ et al., 2005; SMITH et al., 2006; SUNNOTEL et al., 2006a; FAYER, 2010; ELWIN et al., 2012; RYAN et al., 2014).

No entanto, as espécies mais frequentemente identificadas em estudos epidemiológicos são *C. hominis* e *C. parvum* e a prevalência de ambas as espécies em diferentes partes do mundo é variável. *C. hominis* é descrito com maior frequência na América do Norte, América do Sul, Austrália e na África e *C. parvum* no continente europeu (SAVOLI et al., 2006; XIAO, 2010; REN et al., 2012).

O aumento no número de casos de criptosporidiose em diferentes áreas geográficas destaca a importância dos programas de vigilância e monitoramento por métodos capazes de identificar o patógeno e consequentemente a origem da contaminação. Infecções simultâneas por *C. parvum* e *C. hominis* foram detectadas em 2012, na Holanda, Alemanha, partes do Reino Unido e nos Países Baixos. O parasito foi detectado mediante análises das fezes de pacientes com queixas gastrointestinais e todos os casos foram notificados aos serviços públicos de saúde regionais (FOURNET et al., 2013).

Do ponto de vista da saúde pública a diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium* é importante por tornar possível a avaliação do ciclo de transmissão da doença. No caso da espécie *C. parvum*, além de patógeno humano, também é considerada zoonótica, enquanto que em relação a espécie *C. hominis*, a contaminação deve ocorrer somente através de dejetos humanos. Entretanto, um estudo conduzido por SMITH et al. (2005) avaliou o ciclo natural de *C. hominis* e revelou que a quantidade de hospedeiros para esta espécie pode estar subestimada, devido à identificação de *C. hominis* em gado de criação. Esta informação tem um significado importante para saúde pública caso outros hospedeiros estejam implicados na disseminação desta espécie no ambiente.

Cryptosporidium está descrito entre os protozoários mais frequentemente diagnosticados em casos de surtos associados à água no mundo. Tais ocorrências vêm sendo atribuídas a fatores biológicos e características próprias do parasito *Cryptosporidium* como, por exemplo, baixa dose infectante necessária para multiplicação no hospedeiro, habilidade em permanecer no ambiente por longos períodos e resistência elevada aos processos convencionais de tratamento de água (XIAO, 2004; RYU & ABBASZADEGAN, 2008).

Desde a maior epidemia de criptosporidiose em Milwaukee (EUA), as agências reguladoras avaliam o risco da contaminação por oocistos presentes em água potável. A

meta de risco tolerável adotada atualmente pela USEPA é de 1 caso de infecção em 10.000 pessoas por ano nos Estados Unidos. Entretanto, estudos recentes revelam que o número anual de infecção por *Cryptosporidium* está além do esperado: 52 casos em 10.000 indivíduos (JOHNSON et al., 2012).

Deste modo, a água utilizada para consumo contaminada com oocistos infectantes é um fator preditivo para o desenvolvimento da doença em humanos (FERGUSON et al., 2006). Nos Estados Unidos, surtos frequentes de veiculação hídrica fizeram a Agência de Proteção Ambiental Americana incluir o gênero *Cryptosporidium* e *Giardia* entre os organismos a serem monitorados em mananciais de abastecimento (USEPA, 2005).

Os oocistos ocorrem em baixas densidades no ambiente, e os métodos de concentração e de identificação são importantes para detectar a presença do protozoário na água. O método padrão internacional para análise simultânea de *Cryptosporidium* e *Giardia* na água é o método 1623, recentemente atualizado. No entanto, a diferenciação entre as espécies e seus respectivos genótipos só é possível por meio de técnicas moleculares (JOHNSON et al., 2012; USEPA, 2012).

As deficiências no processo de remoção de oocistos durante o tratamento da água e do esgoto e a facilidade de disseminação no ambiente de espécies que afetam o homem demonstraram a necessidade da adoção de um programa de vigilância ativo e bem executado, principalmente em regiões onde a concentração do parasito fosse elevada (OMS, 2003).

A detecção e identificação de diferentes espécies de *Cryptosporidium* em amostras ambientais confirmam a importância de medidas de intervenções para proteção das bacias hidrográficas devido à possibilidade de contaminação dos mananciais por despejo de esgoto tratado e não tratado, resíduos agrícolas e urbanos e dejetos de animais domésticos

silvestres (XIAO et al., 2001; SMITH et al., 2006; RYU et al., 2008; RAZZOLINI et al., 2010; BRANCO et al., 2011; JOHNSON et al., 2012).

Considerando o potencial de veiculação hídrica na transmissão da criptosporidiose e giardose, em Portugal foi realizado um estudo de investigação molecular associado ao método USEPA 1623 para avaliar 175 amostras de água de diferentes fontes, entre estas, água bruta superficial e água tratada. A presença do parasito *Cryptosporidium* foi detectada em 46,3% (81/175) das amostras analisadas e as espécies mais prevalentes nesta região foram *C. parvum* seguido de *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. muris* e *Giardia duodenalis* foi detectada em 38,3% (67/175) (LOBO et al., 2008).

No sudoeste da Tailândia, SRISUPHANUNT et al. (2010), investigaram a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de água de diferentes origens em áreas afetadas por Tsunamis entre os anos de 2005 e 2008. No primeiro período da investigação, 12,7% (15/118) das amostras foram positivas para *Cryptosporidium* spp e 7,6% (9/118) foram positivas para *Giardia* spp., e no segundo período o percentual de amostras positivas foi de 11,9% (5/42) para *Cryptosporidium* spp. e para *Giardia* spp., 7,1% (3/42). Apesar da detecção de ambos os parasitos ter diminuído no segundo período pós-Tsunamis, este estudo sugere a necessidade de medidas de controle na qualidade da água de abastecimento como forma de proteção e promoção da saúde pública nas províncias afetadas.

GALLAS-LINDEMANN et al. (2013), pesquisaram *Cryptosporidium* e *Giardia* em 206 amostras de água residual e 190 amostras de água de rios incluindo uma área recreacional em Lower Rhine na Alemanha entre os anos de 2009 a 2011. Neste estudo a presença de cistos de *Giardia* foi confirmada em 65% (134/206) e 31,1% (64/206) respectivamente nas amostras de água residual, enquanto nas amostras de água superficial 4,2% (8/190) foram positivas para *Giardia* e 9,5% (18/190) para *Cryptosporidium* spp.

identificados pela técnica de imunofluorescência e microscopia de contraste interferencial diferencial (DIC).

No Brasil, os estudos relacionados ao *Cryptosporidium* iniciaram em 1980, devido às altas taxas de prevalência de criptosporidiose em pacientes HIV positivos e pacientes transplantados. Porém a pesquisa de *Cryptosporidium* não faz parte da rotina da maioria dos laboratórios clínicos de análises a menos que haja suspeita clínica. Estudos objetivando a pesquisa de *Cryptosporidium* vêm sendo realizados por diferentes grupos de pesquisa, tanto na área ambiental quanto em amostras clínicas, mas somente a partir do ano 2000 os estudos empregando a detecção dos oocistos através de métodos moleculares e a genotipagem foram introduzidos no país. (CARVALHO-ALMEIDA, 2005).

A presença de *Cryptosporidium* em amostras clínicas foi avaliada em hospitais e universidades (CIMERMAN et al., 2002; GATEI et al., 2003 CARVALHO-ALMEIDA et al., 2006; OLIVEIRA-SILVA et al., 2007; ARAUJO et al., 2008; GONÇALVES et al., 2008; LUCCA et al., 2009; ASSIS et al., 2013), e a caracterização genética em isolados de fezes de animais silvestres e domésticos evidenciam a ampla distribuição de espécies zoonóticas em diversos estudos no Brasil (MEIRELES et al., 2007; ANTUNES et al., 2008; LALLO et al., 2009; PAZ e SILVA et al., 2013; PAZ e SILVA et al., 2014).

Em amostras ambientais grande parte das pesquisas de detecção de *Cryptosporidium* é desenvolvida em centros de pesquisas (FRANCO et al., 2001; SANTOS et al., 2004; HACHICH et al., 2004; MACHADO et al., 2009; RAZZOLINI et al., 2010; ARAUJO et al., 2011; HACHICH et al., 2013; BONATI & FRANCO, 2014).

CANTUSIO NETO et al. (2010) observaram em seus estudos a eficiência de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em amostras de água do Rio Atibaia entre os anos de 2005 e 2006. A presença de *Giardia* spp. foi detectada em 87,5% das amostras analisadas com densidades de 2,5 a 120 cistos/L e *Cryptosporidium*

spp em 62,5% com concentrações de 15 a 60 oocistos/L. A contaminação foi associada à descarga de esgoto não tratado no rio Atibaia.

BRANCO et al. (2012), investigaram a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em manancial de uma cidade turística no Estado de São Paulo. A presença de ambos protozoários foi detectada nas amostras analisadas no estudo, com concentrações médias de 0,2 a 0,3 oocistos/L de *Cryptosporidium* sp e 0,07-0,1 cistos/L de *Giardia* sp. O exame coproparasitológico realizado em moradores de duas comunidades rurais na mesma região revelou que 49,2% (91/185) dos residentes apresentaram resultados positivos para a presença de parasitas intestinais e entre os protozoários, o *Cryptosporidium* foi o mais prevalente com 8,1% dos infectados.

Estudos moleculares que possibilitam avaliar a presença de espécies circulantes em amostras ambientais e seu significado para saúde pública ainda são escassos no Brasil. ARAUJO et al. (2011) avaliaram a ocorrência de *Cryptosporidium* em amostras ambientais no estado de São Paulo. A caracterização molecular revelou a presença de *C. hominis* e *C. meleagridis* em amostras de águas recreacionais e superficiais destacando a importância da continuidade dos estudos epidemiológicos moleculares neste campo.

Na região metropolitana de Curitiba, OSAKI et al. (2013) avaliaram por métodos moleculares a água bruta superficial no ponto de captação de quatro estações de tratamento de água (ETA) entre os anos de 2008 e 2009. Os autores utilizaram a técnica de nested PCR associada à quantificação de oocistos por contagem em lâmina e microscopia ótica que foi padronizada no estudo. Entretanto, a detecção de *Cryptosporidium* sp foi possível em apenas um dos pontos de captação sendo que a concentração estimada de oocistos detectados foi igual ou superior a 100 oocistos/L.

A identificação de espécies, sobretudo no ambiente, tem auxiliado o melhor entendimento da dinâmica de transmissão da criptosporidiose em diferentes surtos no

mundo. Desde o reconhecimento do *Cryptosporidium* pela OMS como um importante patógeno oportunista que deve ser monitorado na água de abastecimento, diferentes metodologias - capazes ou não de detectar variações genéticas - são utilizadas no controle e vigilância da criptosporidiose (CHALMERS & DAVIES, 2010).

Entretanto, a detecção de *Cryptosporidium* em amostras de águas continua sendo um desafio, sobretudo no Brasil, devido à inexistência de dados epidemiológicos de surtos de criptosporidiose, e à dificuldade de implementação e otimização de métodos de detecção e quantificação acessíveis, em termos de custos, e reprodutíveis quando aplicados nas águas dos mananciais do nosso país (ARAÚJO et al., 2011).

1.4 Métodos de identificação de *Cryptosporidium*

O diagnóstico de *Cryptosporidium* em achados clínicos é rotineiramente realizado em amostras de fezes, através da microscopia ótica. Contudo, nos últimos anos cresceu o interesse por métodos de diagnósticos que fossem mais sensíveis e específicos com objetivo de facilitar a diferenciação das espécies detectadas e assim melhor compreender a patogenicidade dos isolados clínicos e ambientais (SAVIOLI et al., 2006; GONÇALVES et al., 2008).

Testes rápidos de Imunoensaios como ImmunoCard STAT[®], MERIFLUOR[®] *Cryptosporidium/Giardia* DFA test e ProSpecT[®] *Giardia and Cryptosporidium* EZ microplate assay (EIA) são utilizados para detecção de antígenos dos parasitas nas fezes e concentrados ambientais. Ainda que o alto custo seja considerado o fator limitante na utilização, os testes imunológicos quando empregados precisam ser interpretados com cuidado devido à baixa prevalência dos parasitos na população (JOHNSTON et al., 2003).

No ambiente, a compactação de algumas partículas fluorescentes ao redor dos oocistos e cistos presentes na água bruta e/ou no esgoto bruto podem gerar resultados falsos positivos ou mesmo falsos negativos durante a detecção por testes imunológicos (LeCHEVALLIER et al., 1995;OMS, 2006)

A identificação molecular de espécies e de genótipos de *Cryptosporidium* é possível inicialmente por meio da PCR. A PCR é a técnica mais comum utilizada nos laboratórios de pesquisa e investigação médica. A técnica baseia-se no processo natural de replicação de DNA produzindo cópias do DNA de interesse *in vitro* sem a necessidade de um organismo vivo. Entretanto, sua principal aplicação é em amostras que tenham a quantidade de DNA reduzida, aumentando esse número de forma exponencial (KARP, 2005).

De forma geral, os estudos utilizam diferentes fragmentos amplificados para posterior genotipagem empregando técnicas de digestão com enzimas de restrição (RFLP) ou sequenciamento do fragmento para estudo de posicionamento taxonômico dos organismos a fim de melhorar a efetividade na investigação e aperfeiçoar o processo, tornando-o mais rápido (HIGGINS et al., 2003; ZHOU et al., 2003; XIAO et al., 2004; RYAN et al., 2005; ARAUJO, 2008; PLUTZER e TOMOR, 2009).

A nested PCR é uma técnica de amplificação dupla e tem como finalidade aumentar a sensibilidade de detecção em amostras com baixa concentração de DNA, principalmente em amostras ambientais. Apesar de aumentar a sensibilidade de detecção, a probabilidade de contaminação da reação é favorecida neste ensaio devido ao excesso de manipulação do produto amplificado (COUPE et al., 2005).

De acordo com JIANG et al. (2005a) o maior problema a ser superado na aplicação dos métodos de amplificação por PCR é a presença de inibidores tanto em amostras clínicas como em amostras ambientais. Para que o sucesso da reação ocorra três etapas

básicas devem ser consideradas: 1) a concentração e purificação da amostra antes da extração do DNA; 2) a remoção dos inibidores durante a extração do DNA e 3) a padronização da reação de amplificação.

Para o isolamento de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* na água a metodologia 1623.1 (USEPA, 2012) é o método de referência a ser utilizado. O procedimento envolve etapas de filtração, separação imunomagnética e identificação por microscopia de imunofluorescência. A falta de dados sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* nos mananciais nacionais, fatores financeiros e o treinamento de técnicos para realização do método são considerados ainda fatores limitantes para a execução do procedimento em ampla escala (FRANCO, 2007).

Entretanto, esta metodologia recomendada pela USEPA associada às técnicas de amplificação de genes e regiões não codificadoras do genoma do *Cryptosporidium*: *18S rRNA*, *hsp70* (*heat shock protein*) e *cowp* (*Cryptosporidium oocyst wall protein*), são amplamente indicadas para estudos taxonômicos (XIAO et al., 2004; CAREY et al., 2004; CHALMERS et al., 2005; RYAN et al., 2005; COUPE et al., 2005; FERGUNSON et al., 2006).

De maneira geral o locus *18S rRNA* é amplamente utilizado em estudos de organismos estreitamente relacionados e utilizado em diversas aplicações como análise filogenética e estudos de biodiversidade. O DNA codificador do RNA ribossomal consiste em múltiplas cópias de um conjunto de segmentos de genes que são transcritos para originar as moléculas estruturais do ribossomo denominadas 5.8S, 18S, e 28S que são intercalados por dois segmentos espaçadores, ITS1 e ITS2 (MEYER et al., 2010).

As espécies *C. hominis* e *C. parvum* apresentam características fenotípicas e genotípicas muito semelhantes em sua constituição e apenas diferenças sutis são notadas por meio do mapeamento genético nas duas espécies (XU et al., 2004).

As análises do genoma por sequenciamento completo revelam que o *Cryptosporidium* apresenta oito cromossomos com extensão de aproximadamente 9.2 milhões de pares de bases e o DNA ribossomal amplificado por meio do gene *18S rRNA* apresenta cinco cópias por genoma haploide (esporozoíto) consistindo em 20 cópias por oocisto, favorecendo a sua detecção por este gene (Le BLANCQ et al 1997; BANKIER et al., 2003; XU et al., 2004).

Sequências homólogas do gene *18S rRNA* relacionadas ao gênero *Cryptosporidium* estão amplamente disponíveis no banco de dados. Estas sequências são caracterizadas por regiões conservadas intercaladas com regiões polimórficas de aproximadamente 1700 pares de base e que apresentam três domínios reconhecidos onde as diferenças entre as espécies estreitamente relacionadas são encontradas em estudos de genotipagem (SILVA et al., 2013).

Diagnósticos moleculares mais sensíveis como reação de amplificação em tempo real (qPCR) empregam um sistema de detecção e quantificação de sequência alvo, com sondas fluorescentes específicas para o produto de PCR amplificado. Alguns trabalhos utilizam a qPCR com objetivo de demonstrar a sensibilidade e especificidade do método na identificação de *Cryptosporidium* presentes em amostras clínicas ou ambientais. Entretanto, diferentes estudos confirmam a necessidade de pesquisas adicionais de padronização de sondas específicas que apresentem melhores resultados de detecção principalmente quando aplicados em amostras ambientais (GUY et al., 2003; ALONSO et al., 2010).

O sistema de PCR quantitativo é sensível e pode detectar até uma cópia de uma sequência específica na fase exponencial da amplificação. A qPCR converte o sinal fluorescente em um valor numérico a cada reação e o resultado obtido é a relação

quantitativa entre o valor inicial do alvo e a quantidade de produto amplificado acumulado a cada ciclo referido pelo sistema como Ct (*threshold cycle*) (DORAK, 2006).

Na qPCR os valores de CTs são logarítmicos e podem ser utilizados diretamente pelo método comparativo através de curvas de quantificação relativa ou indiretamente por interpolação de curvas-padrão criando valores lineares para as análises quantitativas conhecidas como ensaios de quantificação absoluta (APPLIED BIOSYSTEMS, 2014).

De acordo com RYAN et al. (2005), os métodos de detecção e quantificação associados à especificidade dos ensaios de genotipagem são ferramentas extremamente eficientes que podem ser utilizadas nos sistemas de gestão operacional das empresas especializadas nos serviços de tratamento da água, auxiliando no monitoramento de prováveis fontes de contaminação em bacias hidrográficas e para avaliação dos riscos à saúde humana.

Nos Estados Unidos a aplicabilidade da qPCR foi testada em estudos de avaliação de remoção de patógenos nos processos de tratamento de água. Além de rápido e específico, os ensaios de qPCR podem ser utilizados para quantificação simultânea de diferentes organismos como vírus, bactérias, fungos e protozoários em diferentes matrizes (RYU et al., 2010).

STAGGS et al. (2013), avaliaram o sistema TaqMan[®] com base na detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium*. Entretanto, os autores concluíram que não foi possível medir com precisão os baixos níveis de oocistos que são normalmente encontrados em fontes de água potável, sugerindo que avaliações e estudos adicionais por este sistema fossem realizados.

A determinação da viabilidade dos oocistos de *Cryptosporidium* e seus respectivos genótipos, presentes em amostras de água, tem grande significado para a avaliação mais precisa da qualidade da água, considerando que apenas oocistos viáveis podem ser

infecciosos para o homem. Entretanto, o método usual para o teste de viabilidade é realizado por métodos *in vivo* com ensaios de infectividade em modelos animais (BAQUE et al., 2011).

Desta forma, as técnicas de reação de amplificação e quantificação de genes comuns às espécies de *Cryptosporidium*, presentes tanto em amostras clínicas como em amostras ambientais, são consideradas promissoras proporcionando informações precisas de interesse para saúde pública já que podem ser aplicadas tanto em estudos de avaliação de surtos como investigação de casos isolados (VERWEIJ et al., 2003; PLUTZER et al., 2008; YU et al., 2008; RYU et al., 2010; BAQUE et al., 2011; SOUZA et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Quantificar e caracterizar oocistos de *Cryptosporidium* spp. por métodos moleculares associados à técnica de concentração por filtração/IMS/IFA (Método 1623.1 USEPA, 2012) recuperados de amostras de água bruta superficial e esgoto bruto.

2.2 Objetivos específicos

1. Detectar o protozoário *Cryptosporidium* spp. nas amostras de água bruta superficial e esgoto bruto pela reação em cadeia da polimerase dupla (nested PCR);
2. Validar e aplicar a técnica de real time PCR (qPCR) com base no gene *18S rRNA* para identificar e quantificar *Cryptosporidium hominis* e/ou *Cryptosporidium parvum* nas amostras de água bruta superficial e esgoto bruto;
3. Sequenciar os fragmentos amplificados para confirmação das espécies encontradas no estudo;
4. Fornecer informação quanto aos genótipos identificados para serem utilizados na ferramenta de Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM), utilizada pelos sistemas produtores de água em seus Planos de Segurança da Água (PSA);

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área do estudo e periodicidade das coletas

O presente estudo foi desenvolvido como parte do Projeto de Pesquisa intitulado “Modelo de Estudo para Avaliar o Impacto de Patógenos Entéricos em Mananciais de Abastecimento Público” que pertence ao Programa de Apoio à Pesquisa em Parceria para Inovação Tecnológica 1 (PITE - FAPESP 2010/50797-4).

As amostras utilizadas para este estudo foram obtidas em colaboração com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) e Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP). As coletas foram realizadas em dois mananciais localizados nos municípios de São Lourenço da Serra e Taboão da Serra no estado de São Paulo, ambos pertencentes à Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) e Microrregião de Itapeverica da Serra. De acordo com objetivo do Projeto PITE-FAPESP, os pontos de amostragem foram definidos levando-se em conta a captação de água do manancial pelo sistema de abastecimento público, rede de tratamento de esgoto e os municípios eleitos precisariam estar inseridos no programa de Monitoramento de Doenças Diarréicas Agudas (MDDA), coordenado pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) do Estado de São Paulo.

O município de São Lourenço está localizado a 56 km da capital de São Paulo e é abastecido pelo rio São Lourenço que faz parte de uma rede hídrica pertencente à bacia do Ribeira de Iguape (UGHRI-11) com atendimento urbano de água de 41% dos domicílios e a coleta de esgotos abrangendo 24% dos domicílios, segundo o relatório do Plano Municipal de Saneamento Básico de São Lourenço de novembro de 2010.

O município de Taboão da Serra utiliza como fonte de abastecimento o sistema produtor integrado, constituído pela represa Billings e Guarapiranga (UGRHI-06). O

município possui o percentual de 100% no nível de abastecimento de água e 87% do esgoto coletado, sendo 34% tratado na ETE Barueri segundo dados do Relatório de Qualidade das Águas Superficiais do Estado de São Paulo (CETESB, 2013). As descrições e a localização dos pontos de coleta podem ser visualizadas no Quadro 3. Foram realizadas 25 coletas, quinzenalmente, em cada ponto, totalizando 50 amostras de água bruta superficial e 50 amostras de esgoto bruto de Janeiro a Dezembro de 2013.

Quadro 3. Características e localização dos pontos de coleta utilizados no estudo.

Município	Tipo de amostra	Descrição	Localização geo-referenciada
São Lourenço da Serra	Água bruta superficial	P1A-Rio São Lourenço da Serra	23°51'7.82"S – 46°56'38.97"O
	Esgoto bruto	P1E- Esgoto bruto gerado na cidade de São Lourenço da Serra	23°51'23.78"S – 46°57'17.13"O
Taboão da Serra	Água bruta superficial	P2A-Reservatório do Guarapiranga, próximo da barragem junto da captação	23°40'17.60" – 46°43'37.54"O
	Esgoto bruto	P2E-PV situado na Rua Oshiaru Ogawa, esquina com a Avenida Armando de Andrade – Centro	23°36'24.93"S – 46°46'4.27"O

Fonte: Google Earth, <https://earth.google.com>

As coletas foram realizadas pela Divisão de Amostragem da CETESB, seguindo os procedimentos do Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (CETESB, 2011), as amostras foram transportadas sob refrigeração e processadas dentro do período de 24 horas. Os pontos de amostragem estão representados nas Figuras 1 e 2.

Figura 1. Rio São Lourenço da Serra (P1A)(A); Ponto de captação do esgoto bruto (P1E) gerado na cidade de São Lourenço da Serra (B). Fonte: Laboratório de Biologia Ambiental do Departamento de Saúde Ambiental/USP.

Figura 2. Reservatório do Guarapiranga (P2A) próximo ao ponto de captação (A); Poço vertical utilizado na coleta do esgoto bruto (P2E) de Taboão da Serra (B). Fonte: Laboratório de Biologia Ambiental do Departamento de Saúde Ambiental/USP.

A concentração foi realizada em colaboração com o Laboratório de Análises Biológicas do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, e imediatamente encaminhada ao Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP, para análise molecular.

3.2. Procedimento para concentração das amostras

3.2.1 Água bruta superficial

Em cada ponto de captação foram coletados 20L de água bruta superficial. No total, 50 amostras foram concentradas para as análises, sendo: 25 amostras pertencentes ao ponto P1A e 25 amostras ao P2A. As amostras foram processadas pelo Método 1623.1 (Anexo 1) conforme preconizado pela Agência Ambiental Americana (USEPA, 2012). Os oocistos foram concentrados através do sistema Filta-Max® e purificados por separação imunomagnética (IMS) utilizando o kit *Dynabeads Crypto-Combo* (DynaL Biotech, UK). Entretanto, dois eluatos com sedimentos concentrados da água bruta foram obtidos para detecção dos oocistos. O primeiro volume de 500µL foi retirado após a primeira centrifugação do material extraído dos filtros e outro após completar todo o procedimento até a etapa de purificação imunomagnética e dissociação dos Dynabeads fornecendo o volume final de 100µL. Ambos foram armazenados a -20°C para extração do DNA genômico e identificação por meio da reação de amplificação dupla pela polimerase (*nested* PCR), PCR quantitativo (qPCR) e sequenciamento do fragmento amplificado para confirmação das espécies encontradas. Na Figura 3 é possível observar o fluxograma com o procedimento para obtenção dos sedimentos de água bruta e esgoto bruto, utilizados para extração do material genético no estudo.

Figura 3. Fluxograma do processamento das amostras de água bruta superficial e esgoto bruto para obtenção dos sedimentos utilizados na extração do DNA e amplificação das amostras por nested PCR e qPCR.

3.2.2 Esgoto bruto

Para o isolamento e a identificação dos protozoários no esgoto bruto foram coletados 500 mL de amostra em cada ponto, conforme a Figura 3. No total, 50 amostras foram concentradas: 25 amostras pertencentes ao ponto P1E e 25 amostras ao P2E. A concentração foi realizada utilizando a técnica de centrifugação e separação imunomagnética com base em modificações do Método 1623.1 (Anexo 2) para esgoto bruto (efluente primário), e conforme sugerido por McCUIN & CLANCY 2005. Dois eluatos foram obtidos, um após centrifugação e ressuspensão do sedimento no volume de 500µL, e outro após as etapas de dissociação dos Dynabeads com volume de 100µL. Os sedimentos foram conservados a -20°C até a extração do DNA genômico e caracterização genotípica.

3.3. Caracterização genotípica de *Cryptosporidium*

3.3.1 Extração de DNA total

A extração do DNA total foi realizada por meio de *kit* comercial QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany), processada de acordo com as instruções do fabricante após as seguintes modificações: antes da adição do tampão ASL foi realizado um tratamento mecânico prévio de 5 ciclos de aquecimento a 95°C por cinco minutos em banho-maria e congelamento por cinco minutos em gelo seco de acordo com protocolo adaptado de YU et al., 2008. O DNA foi eluído em 100µL de tampão TEII (Tris 10mM, EDTA 0,1 mM) e conservado sob refrigeração a 4°C até o momento da utilização.

3.3.2 Controles internos para confirmação das espécies isoladas

Foram utilizados como controles positivos das reações de PCRs fragmentos de aproximadamente 826 pares de bases, amplificados por nested PCR do *gene 18S rRNA* com base no protocolo de Xiao et al. 2000 a partir de amostra de fezes e/ou fragmentos clonados em vetor plasmidial, para construção da curva padrão e teste de especificidade. As espécies utilizadas neste estudo foram *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium meleagridis*. Para controles negativos da reação de qPCR foram utilizados, *Cryptosporidium muris* e *Giardia intestinalis* e água ultrapura. Todos os controles obtidos foram purificados com o kit Illustra (GE–UK), seqüenciados usando o 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems-US) e comparados com a base de dados GenBank utilizando a ferramenta BLAST.

3.3.3 Clonagem

A clonagem foi realizada para fragmentos amplificados e utilizados como controle e para separação de espécies mistas detectadas na amplificação por PCR convencional. Após a identificação e purificação da sequência de interesse, o inserto foi submetido à ligação em vetor TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen™) e transformado em células eletrocompetentes One Shot® TOP10 Eletrocomp™ *E.coli* (Invitrogen™), conforme instruções do fabricante, exceto por uma etapa de centrifugação de 10 minutos a 14.000rpm da reação de ligação antes da transformação. As análises dos transformantes foram realizadas após extração dos plasmídeos por kit comercial, QIAprep® Spin miniprep Kit (Qiagen, Germany) e confirmação da presença do inserto utilizando os iniciadores M13

direto e reverso correspondentes às regiões de flanco do vetor plasmidial. Os fragmentos clonados foram então purificados com o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA (GE – UK), sequenciados e comparados com a base de dados de sequências conhecidas no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST.

3.3.4 Reação em cadeia pela polimerase dupla (nested PCR)

O DNA obtido do primeiro eluato com sedimento de 500 µL foi submetido às reações de nested PCR e o DNA extraído do segundo eluato purificado por IMS foi submetido à qPCR para quantificação, conforme a Figura 3. Para a detecção molecular da presença de *Cryptosporidium* spp por nested PCR nas amostras foram realizadas amplificações da região do gene *18S rRNA*, conforme descrito por ARAÚJO et al. (2011).

Na primeira reação de PCR foram utilizados os iniciadores externos, SCL1- 5'-CTG GTT GAT CCT GCC AGT AG - 3' - direto e CPB-DIAGR – 5'- TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG - 3' – reverso, descritos por COUPE et al. 2005, amplificando um fragmento de 1035 pares de bases. Para a segunda etapa da PCR o produto da primeira reação foi amplificado com os seguintes iniciadores internos: 826SSU -5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG -3'- direto e 5'- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A - 3'- reverso, descritos por XIAO et al. (2000) amplificando um fragmento de 826pb aproximadamente.

A primeira reação de PCR foi realizada em cinco réplicas para cada amostra, com volume final de 25µL cada, contendo: 5µl de DNA, 12,5µl de água ultra pura Milli Q® q.s.p, 5µl de tampão 5X (contendo 1,5 mM de MgCl₂), 1,0µl de PVP 1% (polivinilpirrolidona), 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Fermentas), 0,3 µM de cada iniciador (Bioneer Oligo Synthesis Report) e 1,25U de

GoTaq® DNA Polymerase (Promega).

As reações foram incubadas em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf®), como segue: um ciclo para desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 40 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 60°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 90 segundos e finalmente 1 ciclo para extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a reação as amostras foram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador.

Os produtos da primeira reação de PCR foram concentrados, purificados e transferidos para novos tubos para amplificação nas seguintes diluições: puro, 1:10, 1:100 e 1:1.000 e submetidos à segunda reação utilizando os iniciadores internos que amplificam o fragmento de 826pb aproximadamente.

Para esta reação foi realizada uma mistura de PCR com volume final de 25 µl contendo 3 µl de produto amplificado, água ultra pura Milli Q, 5 µl de tampão 5X (Promega 1,5 mM de MgCl₂), 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada iniciador, 1,25U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega).

As condições para amplificação final do produto são as mesmas da anterior à exceção da desnaturação a 94°C por 30 segundos e anelamento a 58°C por 45 segundos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2% (Amersham Bioscience), sob intensidade de corrente de 6v/cm. O tamanho dos fragmentos foram estimados por comparação com o marcador de peso molecular 100bp Plus MassRuler™ DNA Ladder, Fermentas. O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta de 302 nm em transiluminador e fotodocumentado. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP). Após a confirmação do fragmento de interesse o mesmo foi purificado com o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA (GE – UK) e encaminhado para sequenciamento.

3.3.5 Bioinformática

Os fragmentos sequenciados foram alinhados e submetidos ao sistema BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*) para comparação com sequências homólogas disponíveis de *Cryptosporidium* no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As sequências alvo disponíveis no banco de dados GenBank e os fragmentos sequenciados foram alinhados manualmente com o auxílio do software BioEdit (*Biological Sequence Alignment Editor*). As análises filogenéticas foram realizadas através do programa Mega 5 (http://www.megasoftware.net/m_test_reliab.html).

3.4 Análise quantitativa (qPCR)

3.4.1 Iniciadores e sonda TaqMan® (Applied Biosystems)

Os iniciadores utilizados na detecção do DNA de *Cryptosporidium parvum* e/ou *Cryptosporidium hominis* foram desenhados utilizando sequências alvo disponíveis no banco de dados GenBank e alinhadas manualmente com o auxílio do software BioEdit (*Biological Sequence Alignment Editor*) para detecção das regiões do gene *18S rRNA* comuns a todas as espécies de *Cryptosporidium*.

Uma sonda linear de hidrólise (oligonucleotídeo) foi construída na região variável do gene *18S rRNA* para amplificação de fragmentos específicos de *C. hominis* e *C. parvum*. No Quadro 4, é possível observar as sequências selecionadas para amplificação do DNA de *C. hominis* e *C. parvum* nas amostras ambientais. Após as análises, as sequências foram submetidas ao sistema BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*) para confirmação da especificidade de amplificação dos iniciadores e testadas posteriormente pelo programa Primer Express® Software Version 3.0 (*Applied Biosystems*) para avaliação da compatibilidade com sistema TaqMan® MGB (Minor Groove Binder).

Quadro 4. Iniciadores e sonda do gene *18S rRNA* desenvolvidos neste estudo.

Iniciador e Sonda	Sequência 5'- 3'	Localização no gene
682SSU-F 683SSU-R	CCTAATACAGGGAGGTAGTGAC CGCTATTGGAGCTGGAATTACC	440 - 461 587- 589
Sonda H/P (<i>C. hominis</i> e <i>C. parvum</i>)	FAM-ACAGGACTTTTTGGTTTTGTA-MGB	475 - 497 Região variável

3.4.2 Curva Padrão com o gene *18S rRNA* para *Cryptosporidium*

A curva padrão foi construída utilizando plasmídeos contendo a sequência genética de 826pb do gene *18S rRNA* de *Cryptosporidium*, previamente obtidos e submetidos à digestão enzimática para linearização com 1U de enzima *XbaI* por 3,5 horas e posterior purificação para remoção de resíduos da digestão. A concentração do DNA fita dupla foi avaliada no quantificador Qubit®2.0 Fluorometer (Invitrogen™). O valor obtido de 114 ng/ml foi convertido em número de cópias/μL utilizando a fórmula descrita abaixo e multiplicado pelo volume total de 2 μL de DNA utilizados na reação de qPCR.

Portanto:

$$\text{N}^{\circ} \text{ cópias } 18S \text{ rRNA} = \frac{\text{ng}/\mu\text{L DNA plasmídeo} \times 6,022 \times 10^{23}}{(\text{tamanho plasmídeo} + \text{inserto}) \times 649(\text{g/mol/pb})}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ cópias } 18S \text{ rRNA} = \frac{1,14 \times 10^{-10} \text{ g}/\mu\text{L DNA plasmídeo} \times 6,022 \times 10^{23}}{4720 \times 649(\text{g/mol/pb})} = \text{n}^{\circ} \text{ de cópias em } 1 \mu\text{L}$$

Onde:

Clone = 3.9kb + 820pb da sequência específica de *Cryptosporidium*

649g/mol=PM médio de 1pb DNA

$6,022 \times 10^{23}$ = n° de moléculas em 1 mol (constante de Avogadro)

Após a conversão dos valores foram realizadas diluições seriadas na ordem de 10 vezes do DNA concentrado. As unidades utilizadas para curva padrão com as concentrações avaliadas foram os valores de $1,0 \times 10^5$ cópias/μL a $1,0 \times 10^1$ cópias/μL. Após amplificação os valores quantificados foram então convertidos em número de oocistos,

considerando o número de cópias já determinado do gene *18S rRNA* por genoma do parasito. Portanto, um oocisto apresenta cinco cópias por genoma de trofozoíto sendo o total de vinte cópias deste gene por oocisto (Le BLANCQ et al 1997; XU et al., 2004). A curva padrão foi avaliada mediante o coeficiente de correlação fornecido pelo software do equipamento de qPCR que inclui a porcentagem de eficiência da reação obtida pela equação da reta: $Y = aX + b$.

Onde:

$Y = C_t$ s (ciclos no qual a fluorescência gerada dentro da reação cruza o limiar).

$a = slope$ (inclinação da reta);

b = interseção do eixo Y, observados em um gráfico de regressão linear por meio do software fornecido pelo equipamento Step One Plus – Real Time PCR System (Applied biosystems™).

A partir da equação da reta aplicada no cálculo da curva padrão, foi possível estimar a quantidade de DNA de *Cryptosporidium* extraído das amostras de água bruta e esgoto bruto. Ao aplicar o valor de C_t de cada amostra na equação, encontra-se o valor de X, que é o logaritmo natural da quantidade (ng) de DNA.

3.4.3 Condições de amplificação da qPCR

Para amplificação do fragmento-alvo foram utilizadas reações com volume final contendo 20 μ L, sendo: 4,9 μ L de água ultra pura MiliQ®, 10 μ L (1X) de TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Applied biosystems™), 0,16 μ M de cada iniciador (Exxtend Exxpress - Brasil), 0,15 μ M de sonda TaqMan-MGB, 2 μ L de 10X IPC Mix, 0,4 μ L de 50X IPC DNA (Applied biosystems™) e 2 μ L do DNA extraído da amostra.

As amostras foram amplificadas em triplicata para monitorar a precisão durante a etapa de detecção. As condições de amplificação do fragmento pela qPCR estão descritas no Quadro 5. Os dados de amplificação foram obtidos e analisados por meio do equipamento Step One Plus – Real Time PCR System (Applied biosystems™). As análises dos dados e gráficos foram feitas através do software fornecido pelo sistema em conjunto com um controle positivo interno nas reações IPC (*internal positive control*, Applied Biosystems, USA) que sinaliza a possível ocorrência de resultados falso-negativos devido à presença de inibidores na amostra extraída.

Quadro 5. Condições de amplificação do DNA de *Cryptosporidium* pela qPCR.

Parâmetros de Ciclagem		Tempo
Pré-PCR		60°C por 30 segundos
Desnaturação inicial para ativação da enzima AmpliTaq Gold®		95°C por 10 minutos
40 ciclos	Desnaturação	95°C por 15 segundos
	Anelamento e extensão	60°C por 1 minuto

A capacidade de detecção dos iniciadores em diferentes concentrações de DNA (sensibilidade) foi avaliada por meio da diluição seriada de $1,0 \times 10^5$ cópias/ μL até $1,0 \times 10^0$ cópia/ μL do fragmento clonado contendo a sequência de 826pb e utilizadas na curva-padrão posteriormente submetidas à reação de qPCR. A especificidade dos iniciadores e da sonda em amplificar apenas DNA de *C. hominis* e *C. parvum* foi realizada utilizando DNA de outros microrganismos entre eles *Giardia intestinalis*, *Toxoplasma gondii*, *Ascaris lumbricoides* e *Escherichia coli*, incluindo *C. muris* e *C. meleagridis* e em triplicata. A reprodutibilidade da curva-padrão foi realizada obtendo a média dos valores dos Cts, os Desvios Padrão dos cinco pontos exponenciais pré-determinados e análise do coeficiente

de variação em dias alternados, por pelo menos cinco vezes em cada tipo de amostra (água bruta e esgoto bruto). Todo o procedimento de validação foi realizado de acordo com o Guia de Informação Mínima para Publicação de PCR quantitativo - MIQE (BUSTIN et al., 2009). Após os resultados da qPCR os valores de cópias por microlitros foram convertidos em oocistos por litro por meio de regra de três simples conforme descrito nas fórmulas 1, 2 e 3 abaixo. Considerando o baixo volume retirado no sedimento para nested PCR os volumes das amostras foram mantidos para efeito de cálculo.

Fórmula 1 - Cálculo do número de cópias/100µL

$$\frac{\text{Concentração obtida na qPCR}}{X} = \frac{2 \mu\text{L de DNA}}{100\mu\text{L}}$$

Onde: X corresponde ao número total de cópias em 100µL de DNA extraído que representa 20 L de amostra de água ou 0,5 litros para esgoto.

Fórmula 2 - Cálculo do número de cópias em 1 Litro de amostra

$$\frac{\text{Número de cópias Total}}{Y} = \frac{20 \text{ Litros para água ou } 0,5 \text{ litros para esgoto}}{1 \text{ Litro}}$$

Onde: Y corresponde ao número de cópias por litro de amostra.

Fórmula 3 - Conversão de número de cópias para número de oocistos.

$$\frac{1 \text{ oocisto}}{Z} = \frac{20 \text{ cópias } 18S \text{ rRNA}}{\text{número de cópias obtidos na fórmula 2}}$$

Onde: Z corresponde ao número de oocistos em 1 Litro de amostra.

3.4.4 Análises estatísticas

Neste estudo, foi realizada a estatística descritiva com a apresentação dos dados em gráficos, tabelas e quadros (distribuição das frequências e porcentagens das variáveis qualitativas). Para análise dos dados quantitativos, foram empregados os cálculos de: Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação, através de planilhas eletrônicas no Microsoft Excel[®] 2010.

4. RESULTADOS

4.1. Detecção de *Cryptosporidium* nas amostras de água bruta pela nested PCR

Por meio das análises dos sedimentos sem a purificação por IMS foi possível a amplificação por nested PCR do gene *18SrRNA* para identificação do parasito *Cryptosporidium* em 14% (7/50) das amostra avaliadas, na Figura 4 está ilustrado o percentual de amostras positivas na PCR convencional por ponto coletado.

Figura 4. Total de amostras (n=50) com percentual positivo para cada ponto de coleta obtidos pela nested PCR do gene *18S rRNA* do parasito *Cryptosporidium* na água bruta superficial.

Entre as 25 amostras coletadas no manancial P1A - São Lourenço da Serra, 12% (3/25) foram positivas, no manancial P2A-Guarapiranga a nested PCR foi positiva em 16% (4/25) das amostras. O sequenciamento direto dos produtos de PCR positivos revelou

sequências homólogas compatíveis com a espécie *Cryptosporidium parvum* nas amostras de água bruta analisadas por esta metodologia.

A segunda reação de amplificação foi realizada com o *amplicon* puro e diluído da primeira reação, com objetivo de dissolver os possíveis inibidores presentes nas amostras.

Na Figura 5, é possível observar alguns resultados positivos pela nested PCR.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos amplificados nas reações de nested PCR para o fragmento de 826pb. M (marcador de peso molecular 100bp), Ca (controle positivo amostra ambiental); As amostras 2 a 11 estão dispostas em ordem nas diluições: 1:10, 1:100 e 1:1000; nC+ (controle positivo da nested); dC+ (controle positivo direto da segunda amplificação); C- (controle negativo); Br (branco).

4.2. Detecção de *Cryptosporidium* no esgoto bruto pela nested PCR

O sedimento do esgoto submetido à amplificação por *nested* apresentou os seguintes resultados: Entre as amostras analisadas, 22% (11/50) foram positivas para *Cryptosporidium*. Na Figura 6 é possível observar o percentual de amostras positivas por ponto coletado.

Figura 6. Total de amostras (n=50) com percentual positivo em cada ponto de coleta obtidos pela nested PCR do gene *18S rRNA* do parasito *Cryptosporidium* no esgoto bruto.

Entre as 25 amostras pertencentes ao ponto P1E - São Lourenço da Serra, 20% (5/25) foram positivas e no ponto P2E – Taboão da Serra, o percentual de amostras positivas foi de 24% (6/25). As amostras foram positivas foram sequenciadas em ambas as direções utilizando os iniciadores direto e reverso empregados na amplificação do fragmento de 826pb. O resultado do sequenciamento revelou a identificação das espécies

C. hominis, *C. parvum* e *C. muris* no ponto P1E e as espécies *C. hominis*, *C. parvum* e *C. muris* no ponto P2E.

Durante as análises do eletroferograma das amostras sequenciadas verificou-se que uma das amostras apresentou amplificação de DNA com mais de uma espécie no ponto 15E. O *amplicon* foi separado por ligação em vetor plasmidial para separação e caracterização genética. A partir dos clones obtidos, os vetores contendo os fragmentos de interesse foram reenviados para o sequenciamento e comparados com o banco de dados.

O sequenciamento das amostras resultou em perfis compatíveis com as espécies *C. parvum* e *C. muris*, quando comparadas a sequências homólogas disponíveis no banco de dados GenBank. Na Figura 7, é possível verificar o alinhamento obtido por meio do programa BioEdit (*Biological sequence alignment editor*) entre os isolados nas amostras ambientais e as sequências conhecidas disponíveis no banco de dados GenBank do fragmento 826pb, e na Figura 8, a relação filogenética com todas as amostras positivas pela nested PCR no estudo.

Figura 7. Alinhamento entre as sequências obtidas a partir dos fragmentos amplificados de 826pb do gene *18S rRNA* pela nested PCR de amostras ambientais e as sequências representantes das diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium* disponíveis no banco de dados GenBank.

Figura 7. Alinhamento entre as sequências obtidas a partir dos fragmentos amplificados de 826pb do gene *18S rRNA* pela nested PCR de amostras ambientais e as sequências representantes das diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium* disponíveis no banco de dados GenBank (Continuação).

Figura 7. Alinhamento entre as sequências obtidas a partir dos fragmentos amplificados de 826pb do gene *18S rRNA* pela nested PCR de amostras ambientais e as sequências representantes das diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium* disponíveis no GenBank (Continuação).

Figura 7. Alinhamento entre as sequências obtidas a partir dos fragmentos amplificados de 826pb do gene *18S rRNA* pela nested PCR de amostras ambientais e as sequências representantes das diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium* disponíveis no banco de dados GenBank (Continuação).

Figura 8. Relações evolutivas dos táxons baseadas no método de Neighbor-Joining utilizando sequências do gene *18S rRNA* de diferentes espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no banco de dados GenBank e os valores de bootstrap após 2000 réplicas. As demais amostras representadas pelas letras A e E são amostras positivas de água e esgoto oriundas deste estudo. As Amostras 15E (A) e 15E (B) referem-se a sequências clonadas de espécies mistas.

No Quadro 6 está descrito o resultado geral da caracterização genotípica realizada pela amplificação por nested PCR, e sequenciamento nos isolados para água superficial bruta e esgoto bruto.

Quadro 6. Resultados da amplificação e caracterização genotípica pela nested PCR e sequenciamento das amostras de água bruta superficial e esgoto bruto

Água bruta superficial					Esgoto bruto			
Data	P1A	nPCR	P2A	nPCR	P1E	nPCR	P2E	nPCR
08/jan	1A	Negativo	2A	Negativo	1E	<i>C. parvum</i>	2E	Negativo
22/jan	3A	Negativo	4A	Negativo	3E	Negativo	4E	<i>C. parvum</i>
05/fev	5A	<i>C. parvum</i>	6A	Negativo	5E	<i>C. parvum</i>	6E	Negativo
19/fev	7A	Negativo	8A	Negativo	7E	<i>C. parvum</i>	8E	Negativo
05/mar	9A	Negativo	10A	Negativo	9E	Negativo	10E	Negativo
19/mar	11A	Negativo	12A	Negativo	11E	Negativo	12E	Negativo
09/abr	13A	Negativo	14A	Negativo	13E	<i>C. hominis</i>	14E	<i>C. parvum</i>
23/abr	15A	Negativo	16A	<i>C. parvum</i>	15E	<i>C. parvum</i> <i>C. muris</i>	16E	<i>C. hominis</i>
08/maio	17A	Negativo	18A	Negativo	17E	Negativo	18E	Negativo
21/maio	19A	Negativo	20A	Negativo	19E	Negativo	20E	<i>C. muris</i>
11/jun	21A	Negativo	22A	Negativo	21E	Negativo	22E	Negativo
25/jun	23A	Negativo	24A	Negativo	23E	Negativo	24E	Negativo
02/jul	25A	Negativo	26A	Negativo	25E	Negativo	26E	Negativo
16/jul	27A	Negativo	28A	Negativo	27E	Negativo	28E	Negativo
29/jul	29A	Negativo	30A	Negativo	29E	Negativo	30E	Negativo
13/ago	31A	Negativo	32A	Negativo	31E	Negativo	32E	Negativo
27/ago	33A	Negativo	34A	Negativo	33E	Negativo	34E	Negativo
10/set	35A	Negativo	36A	Negativo	35E	Negativo	36E	Negativo
26/set	37A	Negativo	38A	Negativo	37E	Negativo	38E	Negativo
08/out	39A	Negativo	40A	Negativo	39E	Negativo	40E	Negativo
21/out	41A	Negativo	42A	Negativo	41E	Negativo	42E	Negativo
11/nov	43A	Negativo	44A	Negativo	43E	Negativo	44E	Negativo
25/nov	45A	Negativo	46A	<i>C. parvum</i>	45E	Negativo	46E	<i>C. parvum</i>
02/dez	47A	<i>C. parvum</i>	48A	<i>C. parvum</i>	47E	Negativo	48E	Negativo
16/dez	49A	<i>C. parvum</i>	50A	<i>C. parvum</i>	49E	Negativo	50E	<i>C. parvum</i>

nPCR = nested PCR

4.3. Ensaios de validação da qPCR

4.3.1 Análise de sensibilidade dos iniciadores e sonda

Os iniciadores e a sonda foram submetidos a testes de amplificação utilizando plasmídios concentrados (114ng/ml) em diluição seriada na razão 1:10 com concentração inicial de $1,0 \times 10^7$ e final de $1,0 \times 10^{-1}$ cópias/ μ L. Após as corridas na qPCR as reações de amplificação com os melhores resultados nos ensaios de validação utilizando os iniciadores e a sonda específica *C. hominis*/*C. parvum* desenhados neste estudo foram entre os logaritmos de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^0$ cópias/ μ L tanto para as amostras de água bruta como de esgoto bruto.

Após avaliação dos testes de amplificação a curva de regressão linear apresentou os seguintes resultados de precisão analítica: Eficiência = 100.1 %; $R^2 = 0.998$; Slope = -3.312. Um novo ensaio foi realizado utilizando cinco logaritmos de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^1$ cópias/ μ L para definir a concentração da curva padrão nos ensaios. O resultado da amplificação com a média dos valores dos Cts de acordo com número de cópias para reação com 2 μ L de DNA utilizados na validação do ensaio estão apresentados no Quadro 7.

Quadro 7. Valores com as médias de Cts por número de cópias obtidas pela qPCR no ensaio de validação.

N° cópias de DNA	Médias Cts	Média de cópias/2 μ L
100.000	19,74	$4,50 \times 10^5$
10.000	23,07	$4,50 \times 10^4$
1.000	26,31	$4,50 \times 10^3$
100	29,04	$4,50 \times 10^2$
10	32,82	$4,50 \times 10^1$
1	36,53	$4,50 \times 10^0$

Na Figura 9 está a representação da curva de amplificação linear em escala logarítmica de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^0$ cópias/ μL . Na Figura 10, é possível observar o gel de agarose representando os pontos avaliados e validados no ensaio com controle interno da reação de aproximadamente 150pb.

Figura 9. Representação gráfica linear utilizada nas análises de sensibilidade da qPCR. O eixo X está representado pela quantidade de ciclos na reação e o eixo Y os valores da magnitude do sinal gerado (ΔRn) nas condições da qPCR.

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 3% mostrando bandas específicas de 150pb da curva padrão e controle positivo utilizado na qPCR.

A Figura 11 representa as análises de regressão linear fornecidas pelo *software* Step One Plus (*Applied biosystems*™) com os resultados obtidos a partir da curva padrão utilizando cinco logaritmos de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^1$ cópias/ μ L e com o controle positivo.

Figura 11. Gráfico da curva padrão representando a curva de regressão linear utilizada na qPCR. No eixo X são apresentados os valores de quantificação e no eixo Y os valores de Cts. Na legenda a cor vermelha representa as amostras positivas da curva, a cor azul o controle positivo clínico e a cor verde DNA extraído de amostra de água bruta.

4.3.2 Análise de especificidade dos iniciadores e sonda

A especificidade dos iniciadores e sonda foi avaliada utilizando DNA extraído de amostras de fezes positiva contendo o fragmento com a região de 826pb do gene *18S rRNA* de *Cryptosporidium hominis*, *C. parvum* e *C. muris*, juntamente com DNA total extraído de outros microrganismos, entre eles *Giardia intestinalis*, *Toxoplasma gondii*, *Ascaris*

lumbricoides e *Escherichia coli* (ATCC 25922). A amplificação revelou resultado de amplificação positiva apenas para as amostras contendo DNA de *C. parvum* e *C. hominis*, atestando a especificidade da sonda para somente as duas espécies de interesse. O DNA de *C. hominis* foi posteriormente utilizado como controle positivo interno nas reações. As representações gráficas das curvas com os controles internos são observadas nas Figuras 12 e 13. O gráfico com amplificação do controle positivo para sonda e resultado negativo para espécie *C. muris* pode ser visualizado na Figura 14.

Figura 12. Representação da curva padrão e amplificação positiva para *C. hominis*. de acordo com a legenda as amostras referentes às linhas A e B estão relacionadas com a curva-padrão e a linha F com o controle positivo clínico, as demais linhas representam os resultados de amplificação negativos referentes aos outros patógenos.

Figura 13. Representação das curvas de amplificação positiva no qPCR para *C. parvum* e *C. hominis*. O ruído abaixo do limiar (*Threshold*) representa amostras negativas de outras espécies que não resultaram em amplificação. O eixo X está representado pela quantidade de ciclos na reação e o eixo Y os valores da magnitude do sinal gerado (ΔRn) nas condições da qPCR.

Figura 14. Gráfico multicomponente representando o ensaio qPCR com a curva padrão e amplificação positiva para *C. hominis* e negativa para *C. muris*. O eixo X apresenta o número de ciclos da reação e o eixo Y os valores atribuídos a intensidade do sinal fluorescente. Na legenda em azul representando as amostras amplificadas com a sonda ligada ao corante *reporter* FAM e vermelho para o ROX.

4.3.3 Avaliação da reprodutibilidade da curva-padrão para quantificação

Os ensaios de reprodutibilidade foram realizados por comparação das curvas padrão amplificadas em dias alternados para validação. As curvas foram avaliadas utilizando controles positivos internos e incluindo controles ambientais (água bruta superficial e esgoto bruto). Valores de Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação, foram calculados para a cada ensaio para a validação da curva intra-ensaios (FONTAINE & GUILLOT, 2003; PFAFFL, 2004). Com base nos valores das médias dos CTs e médias do Desvio Padrão produzidos a cada ponto, o Coeficiente de Variação foi calculado para os pontos de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^1$. Os valores obtidos estão representados exponencialmente por número de cópias em cada curva e estão apresentados na Tabela 1 para água bruta superficial e na Tabela 2 para o esgoto bruto.

Tabela 1. Avaliação da reprodutibilidade da curva padrão utilizada nas amostras de água bruta para detecção de *Cryptosporidium* pela qPCR, apresentando os valores de Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação.

Nº cópias	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Média Cts	*SD	Cv %
10^5	18,00	18,94	16,68	16,80	18,09	17,70	± 0,2079	1,17
10^4	20,50	21,39	20,12	20,32	21,33	20,73	±0,1084	0,52
10^3	24,63	25,51	23,57	23,89	25,51	24,62	±0,1481	0,60
10^2	27,33	29,22	27,05	27,35	28,51	27,89	±0,2089	0,75
10^1	29,96	31,27	30,03	30,33	30,86	30,49	±0,1644	0,54

*Valor correspondente a Média do Desvio Padrão dos CTs liberados pelo equipamento qPCR.

Tabela 2. Avaliação da reprodutibilidade da curva padrão utilizadas nas amostras de esgoto bruto para detecção de *Cryptosporidium* pela qPCR, apresentando os valores de Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação.

Nº cópias	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Média Cts	*SD	Cv %
10 ⁵	21,48	21,28	21,05	21,65	21,01	21,30	±0,3771	1,77
10 ⁴	24,67	24,53	24,27	24,78	23,81	24,41	±0,1371	0,56
10 ³	28,69	28,46	28,23	28,68	27,40	28,29	±0,1103	0,39
10 ²	31,72	31,38	31,32	31,86	31,36	31,53	±0,4669	1,48
10 ¹	34,56	34,45	34,62	35,38	33,80	34,56	±0,5055	1,46

*Valor correspondente a Média do Desvio Padrão dos CTs liberados pelo equipamento qPCR.

A curva padrão construída, manteve-se linear e os resultados foram avaliados por meio da amplificação em triplicata a cada ponto com cinco logaritmos da concentração de DNA padrão (plasmídeo + inserto) e os resultados de regressão linear foram obtidos por meio dos cálculos de Coeficiente de Correlação (R^2) e Eficiência emitidos pelo software do equipamento. Os resultados obtidos na validação da curva padrão para o Coeficiente de Correlação (R^2) foram de: 0,986 a 0,992, Eficiência: ε : 97.836% a 103% e Slope: -3.375 a -3.236 para as análises das amostras de água bruta e R^2 : 0,988 a 0,999, ε : 96.145% a 100.3% e Slope: -3.418 a -3.314, para o comparativo com as amostras de esgoto bruto, confirmando o desempenho da amplificação e do sistema de detecção para *C. hominis* e *C. parvum* nas amostras. A metodologia utilizada foi capaz de quantificar o mínimo de $1,0 \times 10^1$ cópias/2 μ l correspondente a 20 cópias do gene *18S rRNA* determinado nos experimentos do qPCR por meio das curvas de quantificação ou 1 a 2 oocisto/L calculados após conversão por meio de regra de três simples. Um controle exógeno IPC (internal positive control) foi utilizado em todas as corridas e o conjunto de dados referentes à amostra e ao IPC foram comparados a cada análise para prevenir a ocorrência de

resultados falso-negativos decorrentes da possível presença de inibidores nos DNAs extraídos e a confirmação do rendimento de todos os reagentes no ensaio, incluído a *MasterMix TaqMan Environmental®*, específica para ensaios de amostras ambientais. Ao avaliar a amplificação do IPC por meio dos Cts apresentados em conjunto com os Cts produzidos pelas amostras, nenhuma alteração significativa foi observada durante a amplificação das amostras de água bruta. No esgoto foi observada uma variação correspondente a 0,5 Cts no IPC em algumas amostras referente ao ponto P1E, a mesma não foi suficiente para caracterizar inibidores de reação de acordo com os parâmetros de análise deste controle. Na Figura 15 está representada a curva de amplificação do controle IPC com as amostras nas reações de qPCR.

Figura 15. Representação gráfica do ensaio qPCR com amplificação positiva do IPC (*internal positive control*). As demais linhas representam os ruídos da reação de amplificação.

4.4 Resultados de detecção e quantificação de *C. hominis*/*C. parvum* nas amostras ambientais amplificadas pela qPCR

Nas amostras de água bruta superficial o ensaio de PCR em tempo real detectou o total de 62% (31/50) de amostras positivas. No manancial P1A- São Lourenço da Serra, 52% (13/25) de amostras positivas. Conforme determinado por meio da curva padrão ($4,5 \times 10^1$ cópias/2µl) as amostras contendo maiores concentrações do parasito foram 27A a 35A e 45A e 47A, coletadas nos meses de julho a dezembro. No manancial P2A- Guarapiranga a presença do parasito foi detectada em 64% (16/25) e as concentrações mais altas do parasito foram observadas nas amostras 42A e 48A coletadas nos meses de outubro e dezembro.

Para as amostras de esgoto bruto o percentual de positividade total foi de 72% (36/50). Nas amostras coletadas no ponto P1E – São Lourenço da Serra foi possível a detecção de 72% (18/25) com 28% de amostras negativas ou indetectáveis e no ponto P2E – Poço Vertical de Taboão da Serra, 72% (18/25) das amostras foram positivas para presença de *C.hominis*/*C. parvum*.

Para amplificação das amostras de esgoto bruto foram realizadas diluições seriadas do produto amplificado na proporção 1:10 e 1:100 com objetivo de diminuir a inibição da reação por DNA excedente nas amostras ou diluir substâncias inibidoras características das amostras de esgoto. As amostras 5E, 21E, 22E, 27E e 41E, apresentaram alto percentual em número de cópias e foram submetidas à repetição do ensaio e encaminhadas para o sequenciamento, confirmando a detecção específica da sonda pela qPCR para a presença de *C. hominis*/*C. parvum* em todas as amostras sequenciadas. Nas tabelas 3 e 4 é possível observar os resultados gerais da quantificação de *C. hominis*/*C. parvum* e resultados positivos e negativos por amostragem obtidos pela qPCR.

Tabela 3. Resultados de detecção e quantificação pela qPCR e o número de ciclos necessários para atingir o *threshold* durante a amplificação nas amostras de água bruta superficial.

Ponto coleta P1A					Ponto coleta P2A				
Nº	Cts	Nº cópias/L	Nº oocistos/L	qPCR	Nº	Cts	Nº cópias/L	Nº oocistos/L	qPCR
1A	33,8	1,13E+00	0,06	+	2A	I	0	0,00	-
3A	33,2	1,65E+00	0,08	+	4A	32,8	2,52E+00	0,13	+
5A	32,9	2,12E+00	0,11	+	6A	I	0	0,00	-
7A	33,2	1,61E+00	0,08	+	8A	I	0	0,00	-
9A	32,7	2,33E+00	0,12	+	10A	32,8	2,52E+00	0,13	+
11A	33,1	2,10E+00	0,10	+	12A	33,0	2,13E+00	0,11	+
13A	I	0	0,00	-	14A	33,0	2,22E+00	0,11	+
15A	I	0	0,00	-	16A	33,0	2,20E+00	0,11	+
17A	I	0	0,00	-	18A	I	0	0,00	-
19A	I	0	0,00	-	20A	I	0	0,00	-
21A	I	0	0,00	-	22A	30,1	7,39E+00	0,37	+
23A	I	0	0,00	-	24A	I	0	0,00	-
25A	I	0	0,00	-	26A	I	0	0,00	-
27A	29,0	2,54E+01	1,27	+	28A	I	0	0,00	-
29A	28,5	3,66E+01	1,83	+	30A	29,1	1,61E+01	0,80	+
31A	28,7	3,29E+01	1,64	+	32A	30,3	2,70E+00	0,13	+
33A	28,5	3,70E+01	1,85	+	34A	30,4	2,58E+00	0,13	+
35A	28,6	2,54E+01	1,78	+	36A	30,1	3,22E+00	0,16	+
37A	I	0	0,00	-	38A	30,1	3,10E+00	0,16	+
39A	I	0	0,00	-	40A	30,3	2,75E+00	0,14	+
41A	I	0	0,00	-	42A	29,2	1,50E+01	0,72	+
43A	I	0	0,00	-	44A	31,2	1,86E+00	0,09	+
45A	29,7	1,58E+01	0,79	+	46A	30,2	3,03E+00	0,15	+
47A	29,5	1,75E+01	0,88	+	48A	28,9	2,82E+01	1,4	+
49A	I	0	0,00	-	50A	I	0	0,00	-

P1A: São Lourenço da Serra; P2A: Guarapiranga; *Cts: ciclos *threshold*; *I: indetectável.

Tabela 4. Resultados de detecção e quantificação pela qPCR e o número de ciclos necessários para atingir o *threshold* durante a amplificação nas amostras de esgoto bruto.

Ponto coleta P1E					Ponto coleta P2E				
Nº	Cts	Nº cópias/L	Nº oocistos/L	qPCR	Nº	Cts	Nº cópias/L	Nº oocistos/L	qPCR
1E	34,1	1,96E+03	98	+	2E	31,9	9,91E+03	496	+
3E	36,4	1,41E+02	7	+	4E	34,9	1,46E+03	73	+
5E	32,7	3,88E+03	194	+	6E	34,8	2,34E+03	117	+
7E	31,9	8,76E+03	438	+	8E	33,8	2,77E+03	138	+
9E	I	0	0	-	10E	36,7	3,59E+02	18	+
11E	36,4	4,95E+02	25	+	12E	I	0	0	-
13E	33,9	2,21E+03	110	+	14E	35,3	9,71E+02	49	+
15E	31,6	1,11E+04	555	+	16E	36,3	6,77E+02	34	+
17E	31,3	1,31E+04	655	+	18E	36,7	3,56E+02	18	+
19E	I	0	0	-	20E	36,0	5,90E+02	29	+
21E	32,4	4,36E+03	218	+	22E	31,9	1,04E+04	519	+
23E	36,2	4,73E+02	24	+	24E	37,0	3,13E+02	16	+
25E	I	0	0	-	26E	I	0	0	-
27E	31,9	6,12E+03	306	+	28E	35,7	4,34E+02	22	+
29E	37,6	1,81E+02	9	+	30E	35,7	4,40E+02	22	+
31E	32,6	5,41E+03	270	+	32E	I	0	0	-
33E	I	0	0	-	34E	I	0	0	-
35E	35,4	1,05E+03	52	+	36E	I	0	0	-
37E	37,2	2,62E+02	13	+	38E	35,7	4,37E+02	22	+
39E	35,8	7,67E+02	38	+	40E	33,6	1,71E+03	85	+
41E	36,1	4,84E+02	24	+	42E	33,1	2,41E+03	121	+
43E	35,4	1,27E+03	63	+	44E	36,5	1,10E+02	5	+
45E	I	0	0	-	46E	I	0	0	-
47E	I	0	0	-	48E	35,5	8,76E+02	44	+
49E	I	0	0	-	50E	I	0	0	-

P1E: esgoto São Lourenço da Serra; P2E: esgoto Taboão da Serra; *Cts: ciclos threshold;
*I: indetectável.

Na Figura 16, está ilustrado o percentual total das amostras positivas e negativas na água bruta superficial referente aos pontos P1A e P2A e no esgoto bruto referente aos pontos P1E e P2E analisados neste estudo.

Figura 16. Resultados obtidos para amostras de água bruta (P1A e P2A) e esgoto bruto (P1E e P2E), positivos e negativos para a presença de *Cryptosporidium* quando avaliadas por meio da reação de qPCR.

A Figura 17 ilustra os valores da quantificação do número de oocistos por litro nas amostras de água bruta superficial no ponto P1A – São Lourenço da Serra e na Figura 18, estão representados os valores de oocistos/L no ponto P2A – Guarapiranga. Os valores de quantificação nas amostras do ponto P1E – Esgoto de São Lourenço da Serra estão apresentados na Figura 19 de acordo com número de cópias/L em escala logarítmica. A Figura 20 representa os valores da quantificação em número de cópias/L no ponto P2A – Poço vertical de Taboão da Serra.

Figura 17. Número de oocistos/L de acordo com os meses de coleta detectados na qPCR a partir do DNA de *Cryptosporidium* extraído diretamente nas amostras de água bruta superficial no ponto P1A.

Figura 18. Número de oocistos/L de acordo com os meses de coleta detectados na qPCR a partir do DNA de *Cryptosporidium* extraído diretamente nas amostras de água bruta superficial no ponto P2A.

Figura 19. Número de cópias/L do fragmento *18S rRNA* a partir do DNA de *Cryptosporidium* extraído diretamente das amostras de esgoto bruto no ponto P1E.

Figura 20. Número de cópias/L do fragmento *18S rRNA* a partir do DNA de *Cryptosporidium* extraído diretamente das amostras de esgoto bruto no ponto P2E.

5. DISCUSSÃO

O maior número de pessoas residentes no estado de São Paulo está concentrado nos 113 municípios da macrometrópole paulista. Esta extensa área urbana formada pela Região Metropolitana de São Paulo, Região Metropolitana da Baixada Santista (RMBS), Região Metropolitana de Campinas (RMC), Região Metropolitana do Vale do Paraíba e Litoral Norte (RMVP-LN) e Aglomeração Urbana de Jundiaí (AU de Jundiaí), é considerada a região econômica mais importante do país correspondendo a 80% do PIB estadual e um quarto do PIB nacional (IBGE, 2010; EMPLASA, 2011).

De acordo com a tendência de crescimento econômico e populacional do estado de São Paulo a macrometrópole paulista encontra-se em constante expansão. Todavia, um dos maiores desafios atuais para instituições públicas e concessionárias de saneamento básico é a execução de políticas urbanas e de saneamento adequadas para fornecer água de qualidade e atender toda a população aglomerada neste local (EMPLASA, 2011; RIBEIRO, 2011).

O crescimento urbano desordenado somado à ocupação precária e ilegal nas áreas de entorno dos mananciais provocam a contaminação e o esgotamento das reservas naturais, contribuindo com a proliferação de doenças (ANA, 2010). Para a Organização Mundial de Saúde as estratégias de proteção dos mananciais aliadas à gestão do sistema de distribuição e tratamento de água que prioriza a prevenção ou redução da entrada de patógenos em fontes de água de abastecimento ajudarão a diminuir a dependência de processos de tratamento para a remoção de patógenos e proteger a qualidade da água tratada (OMS, 2011).

O sistema de Múltiplas Barreiras fundamentado no Plano de Segurança da Água tem se mostrado eficaz na prevenção e redução da contaminação da água utilizada para abastecimento por organismos distintos como bactérias, vírus e protozoários ajudando a

diminuir significativamente os casos de surtos através da água contaminada por estes patógenos em todo o mundo (RYU et al., 2010).

Entretanto, os protozoários veiculados pela água ainda representam um grande problema de saúde pública no mundo. Entre eles, *Cryptosporidium* que é considerado um dos patógenos mais estudados em países desenvolvidos e em desenvolvimento, por sua capacidade de resistentência ambiental e ainda pela dificuldade de ser removido nos tratamentos convencionais utilizados na produção de água potável (KARANIS et al., 2007; BALDURSSON & KARANIS, 2011).

Apesar disso, há um consenso na comunidade científica sobre a necessidade de padronizar e aplicar métodos de detecção mais sensíveis, rápidos e com identificação simultânea de espécies destes parasitos associados a doenças humanas nas amostras de água e assim, obter dados confiáveis sobre as vias de transmissão e origem da contaminação para a avaliação e o gerenciamento do risco microbiológico.

O Método USEPA 1623.1 utilizado para isolar *Cryptosporidium* neste estudo é o recomendado internacionalmente para monitorar protozoários na água. Embora esta metodologia seja útil no monitoramento ela é incapaz de diferenciar entre espécies ou determinar infectividade dos oocistos presentes no ambiente aquático. Assim, as técnicas moleculares são alternativas promissoras para caracterização das espécies do parasito (STAGGS et al., 2013).

No presente estudo amostras de água bruta superficial foram monitoradas por um período de doze meses para se obter informações sobre a ocorrência de espécies de *Cryptosporidium* em dois mananciais que abastecem a Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) e que atualmente enfrentam problemas de escassez de água em consequência do mau uso dos recursos naturais e crescimento urbano desordenado.

A associação do método de concentração de oocistos empregado neste estudo com a nested PCR para amplificação do gene *18S rRNA* é utilizada como alternativa para identificação molecular de espécies de *Cryptosporidium* em água. KEELEY & FAULKNER (2008) utilizaram o Método 1623 para concentrar amostras de águas superficiais influenciadas por descargas agrícolas e a caracterização molecular por meio da nested PCR e confirmaram a contaminação por espécies associadas a hospedeiro bovino, ressaltando que os resultados de amplificação foram obtidos a partir de 10 oocistos/L.

Entretanto, algumas limitações técnicas são constantemente avaliadas quanto à capacidade de detecção, concentração e identificação de protozoários no ambiente. A etapa de retenção de (oo)cistos em filtros, por exemplo, pelo sistema Filt-Max® é importante no processo de concentração mas também pode ser crítica devido à aderência dos microrganismos em partículas maiores que seu tamanho pois eles podem ficar retidos no filtro dificultando a sua remoção durante a etapa de eluição (HU et al., 2004).

HIGGINS et al. (2001) observaram que o material particulado presente nas amostras de água pode se comportar como agente floculante durante a concentração do parasito no sedimento. Entretanto, os autores concluem que grandes quantidades de impurezas podem influenciar negativamente na etapa de ligação dos anticorpos aos epítomos presentes na membrana dos oocistos durante a IMS.

Da mesma forma, as dificuldades de amplificação por PCR estão associadas aos diferentes fatores que envolvem desde a contaminação com substâncias presentes na água que favorecem a inibição da reação, como o número reduzido de oocistos presentes no ambiente e que quando são submetidos aos métodos de concentração a partir de 10L de água para recuperação, ainda pode levar à redução significativa na quantidade do protozoário disponível para análise.

Substâncias surfactantes, sais, compostos fenólicos, ácidos húmicos e fúlvicos desfavorecem a detecção dos oocistos principalmente quando submetidos aos métodos moleculares por apresentarem propriedades de formação de complexos com ácidos nucleicos e/ou inibição da atividade da enzima polimerase (KOONJUL et al., 1999; JIANG et al., 2005).

Sendo assim, a remoção dos inibidores das amostras ambientais é um componente importante para o sucesso da PCR e a etapa de purificação realizada pela IMS pode reduzir os inibidores, mas não eliminá-los completamente, ocorrendo a necessidade de meios de purificação adicionais associados aos kits de extração de DNA e ainda a necessidade de utilização de aditivos na reação de PCR para melhorar a detecção de *Cryptosporidium* a partir de amostras ambientais (JIANG et al., 2005).

Melhorias na reação da nested PCR foram obtidas com adição de coadjuvantes de DNA, aditivos e colunas de purificação com a finalidade de obtenção de mais qualidade do produto amplificado em um estudo de detecção molecular do DNA do parasito em sedimentos de amostras de água concentradas pela técnica de membrana filtrante (ARAÚJO et al., 2011).

A PCR quantitativa apresenta elevada sensibilidade analítica e melhor desempenho que a PCR convencional, portanto é uma alternativa promissora na identificação e quantificação simultânea de patógenos em diferentes tipos de amostras. Entretanto, esta tecnologia necessita de complexa padronização do sistema de detecção por sondas ou corante intercalante de DNA, dos reagentes e testes de validação associados a análises estatísticas que são indispensáveis na utilização da técnica (DORAK, 2007).

Ficou evidente no início deste estudo a necessidade de avaliar as amostras pelo método de detecção convencional devido à quantidade de DNA extraído com volume final de 100µL pelo método purificado com os Dynabeads e que seria utilizado também para

detecção de cistos de *Giardia* spp. no Projeto PITE-FAPESP, e devido ao tempo de execução e validação do ensaio de qPCR. Deste modo, as amostras concentradas após filtração foram submetidas à nested PCR para amplificação do fragmento do gene *18S rRNA* antes da detecção pela PCR quantitativa.

A partir dos resultados apresentados após a amplificação pela nested PCR o posicionamento taxonômico revelou a presença da espécie *C. parvum* em 12% (3/25) das amostras do rio São Lourenço da Serra. Na Represa Guarapiranga das 25 amostras analisadas, *Cryptosporidium* foi detectado em 20% (5/25) e também apresentou sequências compatíveis com *C. parvum*.

C. parvum é uma espécie comum em casos de infecção humana e também é considerada uma espécie zoonótica (XIAO et al., 2004). Após a sua re-descrição taxonômica em 1985, os estudos de caracterização molecular relacionados ao complexo *parvum* avançaram e muitos genótipos foram descritos e renomeados como novas espécies (UPTON & CURRENT, 1985; REN et al., 2012).

A identificação de *C. parvum* neste estudo é importante para o conhecimento das possíveis fontes de disseminação dessa espécie nos pontos amostrados. Segundo RYAN et al. (2012), *C. parvum* está amplamente distribuídos no ambiente aquático e a informação sobre a circulação e a identificação dessa espécie é relevante para vigilância da água não só pela sua importância clínica mas pela quantidade de hospedeiros que, se infectados, podem carrear e disseminar esta espécie.

Ainda que esta espécie se revele preocupante para os casos de infecção em seres humanos principalmente nos países em desenvolvimento, *C. parvum* tem despertado grande interesse também na área veterinária por afetar a cadeia produtiva de bovinos e ovinos e provocar prejuízos financeiros no ramo do Agronegócio. Assim, os bovinos são uma importante fonte de transmissão indireta do parasito através da água contribuindo com

grande volume de dejetos que podem conter altas concentrações de oocistos e contaminar os corpos de água (XIAO, 2010; RYAN et al. 2012).

MEIRELES et al. (2011) caracterizaram, por meio da nested PCR utilizando como alvo o gene *18S rRNA* de *Cryptosporidium*, amostras de fezes de bezzeros provenientes de fazendas de criação de gado leiteiro no noroeste do estado de São Paulo e obtiveram 10% (21/196) de positividade para o protozoário. As espécies caracterizadas no estudo foram *C. parvum* (7), *C. andersoni* (1), *C. bovis* (1) e *C. ryanae* (2).

Diferentes tipos de animais domésticos e selvagens podem ser reservatórios para espécies zoonóticas. Por meio de análises dos genes *18S rRNA*, *GP60* e sequenciamento, *C. parvum* subtipo IIaA15G2R1, usualmente isolado em bovinos, foi identificado em fezes de capivaras coletadas nas margens de rios em São Paulo, entretanto, pouco se sabe sobre a contribuição deste mamífero roedor em disseminar oocistos no ambiente aquático, necessitando de estudos adicionais nessa área já que estes animais são abundantes em ambientes semi-aquáticos (MEIRELES et al., 2007).

Assim, o monitoramento deste patógeno em amostras ambientais é importante devido a esta cadeia transmissível entre animais e o homem. Desta forma, a detecção de *Cryptosporidium*, incluindo a espécie *C. parvum*, representa um risco potencial para saúde pública em especial para os indivíduos que são vulneráveis aos diversos tipos de doenças oportunistas, como os imunodeficientes.

HACHICH et al. (2004) conduziram as primeiras análises dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de água coletadas em 10 bacias hidrográficas no Estado de São Paulo, entre elas a Bacia do Alto Tiête (UGRHI 06), onde está localizada a Represa de Guarapiranga. Os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foram detectados em 27% e 2,5% respectivamente nas amostras avaliadas.

Em continuidade ao monitoramento de protozoários em mananciais de abastecimento público na Região Metropolitana de São Paulo, RAZZOLINI et al. (2010), detectaram na Bacia do Alto Tiête (UGRHI 06) a presença de *Giardia* spp. em 46,1% e *Cryptosporidium* spp. em 7,6% das amostras de água bruta, e ao avaliarem amostras de água tratada o percentual de positivos foi de 41,7% de *Giardia* spp. e 25% para *Cryptosporidium* spp. nesta região.

Em 2011, o primeiro estudo de genotipagem de espécies de *Cryptosporidium* em mananciais na região Metropolitana de São Paulo foi realizado e incluiu o Reservatório da Guarapiranga (UGRHI 06) entre os mananciais analisados. Mesmo com as limitações inerentes ao tipo de amostra foi possível a detecção de espécies importantes como *C. hominis* e *C. meleagridis* que podem ocasionar a infecção humana, ressaltando a necessidade de um monitoramento contínuo desse agente nos mananciais nacionais (ARAÚJO et al., 2011).

A amplificação das amostras de esgoto bruto coletadas neste estudo durante a monitorização dos mananciais foi realizada com o intuito de avaliar a disseminação de espécies de *Cryptosporidium* provenientes de dejetos humanos que são eliminados no esgoto e podem ser uma fonte de contaminação para os mananciais.

A pesquisa de parasitos no esgoto é uma importante fonte de informação devido à atual situação de acesso à rede de coleta e tratamento de esgoto sanitário no Brasil. Em muitos municípios do país a situação ainda é precária, fazendo com que a falta de saneamento básico em algumas regiões do país cause impacto direto nos índices de saúde e na qualidade de vida da população (TRATA BRASIL, 2014).

De acordo com o Instituto Trata Brasil, em 2013 o número de internações relatadas pelos médicos como “diarreia e gastroenterite de origem infecciosa presumível” foi de 340 mil pessoas, sendo 170,7 mil entre crianças e jovens de até 14 anos com 2.135 mortes no

país. As diarreias correspondem a 50% das doenças diretamente ligadas ao saneamento básico e mais da metade dos gastos públicos com essa enfermidade, e mesmo com a situação do saneamento básico favorável de alguns municípios da região sudeste e sul do país em muitas regiões a população permanece exposta e vulnerável às doenças diarreicas (TRATA BRASIL, 2014).

Em São Paulo o Programa de Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA) é realizado pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE). Os dados fornecidos pelo CVE referem-se à monitorização dos casos de doenças diarreicas por municípios notificados pelos postos de saúde regionais para rastreabilidade de surtos de cada região.

Os municípios de Taboão da Serra e São Lourenço da Serra estão vinculados ao GVE10 - Osasco (grupo de vigilância epidemiológica) que centraliza as informações de doenças diarreicas e alimenta o banco de dados do CVE. O município de São Lourenço da Serra está localizado ao Sul do estado a 56 km da capital de São Paulo, a região apresenta predomínio de áreas cobertas por vegetação e está inserida em uma Área de Preservação dos Mananciais, e abriga uma população de 14.595 habitantes. Acompanhando a evolução do relatório do MDDA nota-se que o município notificou 1956 casos em 2013 de diarreia aguda com aumento de casos na 29ª semana do monitoramento com 189 casos. A faixa etária mais atingida foi de indivíduos acima de 10 anos de idade, porém não há informações sobre o agente etiológico dos casos (dados não publicados).

As informações fornecidas pelo MDDA foram utilizadas para verificar a possibilidade de algum surto ter sido notificado no período em ambos os pontos, o presente estudo não teve como objetivo utilizar os dados do MDDA como análise comparativa ou para fornecer dados estatísticos. No entanto, é importante observar que nenhum surto foi detectado no período avaliado.

Das doenças consideradas de veiculação hídrica, apenas cólera, febre tifóide e hepatite são doenças de notificação obrigatória de acordo com a Portaria nº 2325/2003 (BRASIL, 2003). No Brasil, os pedidos de testes diagnósticos para criptosporidiose são insuficientes e a detecção de oocistos em fezes somente é realizada por hospitais de referência ou centros de pesquisa. Assim, poucos casos de infecção por *Cryptosporidium* são notificados, pois sequer existe uma determinação para pesquisa do protozoário nas fezes de indivíduos doentes em postos de saúde e/ou nos hospitais regionais do país.

A detecção molecular pela nested PCR amplificando o gene *18S rRNA* de *Cryptosporidium* nas amostras de esgoto apresentou positividade para espécies importantes para os estudos epidemiológicos moleculares como *C. hominis*, *C. parvum* e *C. muris*. De forma geral a detecção de *C. parvum* já discutida anteriormente pressupõe uma contaminação por excreta humana e/ou animal, entretanto, estudos revelam que esta espécie está amplamente relacionada com a criptosporidiose humana assim como *C. hominis* que a contaminação é considerada antroponótica (SMITH et al., 2005; XIAO, 2010).

A detecção de *C. hominis* tanto em amostras de água como no esgoto implica em um alerta mediante a monitorização do parasito devido ao seu potencial de disseminação para o homem, e como os casos de criptosporidiose são subnotificados a contaminação do ambiente pode desencadear surtos e atingir um grande número de pessoas principalmente se a água estiver envolvida na cadeia de transmissão. Outra informação relevante foi citada em um estudo multilocus realizado em fezes de gado na Escócia que alertou para a ocorrência de zooantroponose por *C. hominis* em gado de criação da região (SMITH et al., 2005).

De fato, as espécies *C. hominis* e *C. parvum* são abordadas na literatura como as espécies mais comuns em casos de surtos de veiculação hídrica, entretanto, outras espécies

vem sendo notificadas em surtos de origem hídrica como, por exemplo, *C. cuniculus* primeiramente detectado em coelhos e agora considerado como patógeno emergente em humanos (HADFIELD & CHALMERS, 2012).

Em 2010 na cidade de Östersund na Suécia, 27.000 pessoas foram atingidas por um surto provocado pela falha na remoção de *Cryptosporidium hominis* na água de abastecimento. O surto foi caracterizado por um início rápido e de alto risco coletivo de contaminação e atingiu principalmente os jovens e adultos de meia idade. O estudo lançou um alerta demonstrando a importância de minimizar o risco por meio da otimização de controle de qualidade da água bruta e a utilização das múltiplas barreiras que são efetivas em remover ou inativar um grande grupo de patógenos, assegurando a qualidade da água (WIDERSTRÖM et al., 2014).

Ao analisar a amostra 15E coletada em abril/2013 no ponto P1E, foi possível observar que as espécies *C. parvum* e *C. muris* foram amplificadas simultaneamente pela nested PCR e consequentemente a técnica de clonagem foi utilizada para o isolamento das sequências amplificadas. No ponto P2E uma amostra coletada em maio/2013 também foi positiva para *C. muris*.

De forma geral, os ratos e camundongos representam um importante papel na transmissão de doenças e um risco para saúde pública. Assim, o potencial de disseminação de *Cryptosporidium*, incluindo *C. muris*, por roedores tem sido avaliado em algumas regiões no mundo devido à sua capacidade de contaminar grandes áreas, locais de estocagem de alimentos e fontes de água (XIAO & FAYER, 2008; PAPARINI et al., 2012; NG-HUBLIN et al., 2013; SILVA et al., 2013).

A caracterização de *C. muris* no estudo também foi importante para nortear as discussões sobre a especificidade dos métodos em detectar espécies de importância para clínica humana, uma vez que as metodologias baseadas na detecção do parasito por IMS e

Imunofluorescência na água e no esgoto não são capazes de distinguir entre as espécies isoladas.

Além da espécie, a viabilidade também deve ser considerada na avaliação, pois somente os organismos viáveis são considerados capazes de produzir infecção (BAQUE et al., 2011). A utilização de RT-PCR (transcrição reversa) para a detecção de transcritos de RNAm encontrados apenas em oocistos viáveis e o sistema integrado de cultura de células associado ao método de qPCR para quantificação de *Cryptosporidium* em cultura de células são alguns exemplos de técnicas utilizadas na pesquisa de oocistos viáveis em amostras ambientais (DiGIOVANNI & LeCHEVALLIER, 2005).

ALONSO et al. (2014) avaliaram uma técnica promissora que envolve a combinação de propídio monoazida (PMA) e qPCR baseada no gene *COWP* de *Cryptosporidium* para discriminar entre os protozoários viáveis e não viáveis. Os resultados do estudo mostraram-se satisfatórios quanto à inibição dos oocistos inviáveis corados com PMA que possibilitou a quantificação dos viáveis pela qPCR, tornando-se uma alternativa para os estudos de quantificação e de risco em amostras ambientais.

Para melhorar as chances de detecção e avaliar a possibilidade de quantificar os oocistos presentes nas amostras analisadas, no presente estudo utilizou-se o ensaio de PCR quantitativo com base no gene *18S rRNA* de *Cryptosporidium*. A sonda TaqMan® MGB utilizada como sistema de detecção apresenta alta sensibilidade e especificidade por este método que é considerado mais sensível que o PCR convencional (APPLIED BIOSYSTEMS, 2014).

A curva-padrão contendo os valores de Cts versus a quantidade de cópias do fragmento de 826pb do gene *18S rRNA*, representadas na Figura 11 pelos pontos de $1,0 \times 10^1$ e $1,0 \times 10^5$, foi gerada para determinar o número de cópias do DNA de

Cryptosporidium presente nas amostras ambientais e o número de oocistos foi obtido após a conversão dos valores na contagem de cópias/L para oocistos/L.

Sabe-se que a curva-padrão com pelo menos 90% a 110% de eficiência é o esperado para os ensaios de quantificação absoluta. Assim, a eficiência da curva-padrão utilizada atendeu os critérios de validação, uma vez que as triplicatas das diluições seriadas ficaram bem agrupadas e apresentaram o coeficiente de correlação de R^2 : 0,986 a 0,992, Eficiência: ϵ : 97.836% a 103% e Slope: -3.375 a - 3.236 para as amostras de água; e R^2 : 0,988 a 0,999, ϵ : 96.145% a 100.3% e Slope: -3.418 a -3.314 para as amostras de esgoto.

FONTAINE & GUILLOT (2002) utilizaram o sistema TaqMan® para quantificação de oocistos com base na linearidade da curva-padrão com plasmídeos recombinantes de *C. parvum*. O limite de detecção observado no estudo foi de cinco oocistos, similar ao relatado na PCR convencional, entretanto, este resultado foi obtido pela amplificação de um gene de cópia única. Já no presente estudo o gene escolhido apresenta 20 cópias por oocisto, aumentando proporcionalmente a sensibilidade do método e a eficiência da reação mediante a distribuição do DNA mediante as diluições seriadas.

O coeficiente de variação com percentual de < 2.4% para as curvas padrão apresenta boa reprodutibilidade em estudos de quantificação por qPCR (FONTAINE & GUILLOT 2003; PFAFFL, 2004). Neste estudo a validação da reprodutibilidade foi realizada em ensaios diferentes para amostra de água bruta e esgoto bruto devido ao volume de plasmídeo extraído não ser suficiente para os dois ensaios. Entretanto, os coeficientes de variação de < 1,17 para as análises de água bruta e < 1,77 para o comparativo no esgoto bruto foram obtidos nas curvas utilizadas para quantificação, demonstrado um desempenho satisfatório nas reações.

As condições utilizadas pela PCR quantitativa para detectar o parasito nas amostras P1A-São Lourenço da Serra permitiram a detecção em 52% (13/25) das amostras com a

sonda específica para espécies *C. hominis*/*C. parvum*. Quando analisadas de acordo com as concentrações por número de cópias do parasito os valores obtidos foram de $1,13 \times 10^0$ a $3,66 \times 10^1$ cópias/L. Conforme o ensaio de padronização das curvas padrão representadas pelos pontos de $1,0 \times 10^1$ e $1,0 \times 10^5$, os resultados de quantificação alcançados para estes pontos foram de 0,79 a 1.85 oocistos/L. Algumas amostras apresentaram sinal de amplificação com valores mais altos de Cts de 32 a 33 e as concentrações obtidas foram determinadas pelo ponto $1,0 \times 10^0$. Estas amostras mesmo estando abaixo do ponto de corte de $1,0 \times 10^1$ determinado neste estudo foram consideradas positivas devido ao sinal de amplificação observado no ensaio.

Nas amostras P2A- Represa de Guarapiranga, a qPCR apresentou positividade em 64% (16/25) e a quantificação de $1,86 \times 10^0$ a $2,82 \times 10^1$ cópias/L foi observada. Após a substituição dos valores o número de oocistos obtidos neste ponto foi de 0,72 a 1,4 oocistos/L calculados pela curva no ponto $1,0 \times 10^1$. As amostras que apresentaram baixo número de cópias na triplicata apresentaram sinal de amplificação e foram consideradas positivas.

Conforme observado neste estudo, e de acordo com o método empregado, quando o número de cópias é muito baixo não é possível determinar os valores de Média e Desvio Padrão nas análises quantitativas e o sinal gerado pode inclusive indicar que somente uma das amostras da triplicata apresentou valor de Ct ou amplificação, contudo estas amostras são consideradas positivas, pois emitem sinal de fluorescência na curva de amplificação.

Durante o levantamento bibliográfico foi possível observar que muitos estudos de PCR quantitativo utilizam o gene *18S rRNA* para identificação de *Cryptosporidium* em amostras fecais e amostras ambientais (HIGGINS et al., 2001; FONTAINE & GUILLOT, 2002; MASAGO et al., 2006; HADFIELD et al., 2011; BURNET et al., 2012; STAGGS et al., 2013). Entretanto, nenhum destes estudos utilizou iniciadores e sondas capazes de

distinguir completamente entre as espécies *C. hominis* e *C. parvum* por esse gene. Por outro lado, ambas as espécies são relevantes para o desenvolvimento da doença humana e avaliar a presença das mesmas pode ajudar nos estudos de avaliação de risco microbiológico.

STAGGS et al. (2013) avaliaram a aplicabilidade do ensaio TaqMan no qPCR quanto ao potencial de detecção e quantificação em amostras ambientais previamente purificadas pela IMS. Os autores concluíram neste estudo que a melhor sensibilidade é obtida por meio do gene multicópias *18S rRNA*, no entanto o limite mínimo de detecção é de 10 oocistos/L para amplificação pelos genes DNAJ-like e NTF2. Os autores constataram que os dois genes apresentam apenas uma cópia no genoma do parasito.

O mesmo estudo ainda estimou a especificidade das sondas para amplificação do gene *18S rRNA* que apresentaram similaridade com sequências de diferentes microrganismos como algas e dinoflagelados comuns em amostras ambientais. Porém, as sondas utilizadas no estudo são gênero-específica e apresentam maior potencial para reações cruzadas em amostras ambientais. Com base nas análises do Genbank a sonda gênero-específica inicialmente desenhada neste estudo e que deveria ser utilizada para triagem das amostras dos mananciais e do esgoto bruto foi descartada devido à sua baixa especificidade para detecção do gênero *Cryptosporidium*.

A comparação prévia das sequências de espécies de *Cryptosporidium* com o banco de dados *GenBank* foi realizada para avaliar a possibilidade de reação cruzada da sonda padronizada no estudo. O teste de especificidade realizado posteriormente com DNA do parasito só foi possível entre as espécies *C. hominis*, *C. parvum*, *C. muris* e *C. meleagridis* confirmando a não amplificação de *C. muris* e a hibridização específica com *C. hominis* e *C. parvum*, entretanto, a possibilidade de hibridização da sonda com do DNA de *C. meleagridis*, foi verificada. Porém, pela nested PCR e sequenciamento esta espécie não foi

identificada, e de acordo com as análises realizadas no gene *18S rRNA* utilizado neste estudo, mais ensaios deverão ser realizados, incluindo outros genes, para avaliação e diferenciação entre estas espécies.

As amostras de esgoto bruto amplificadas com sonda *C.hominis/parvum* onde a concentração do parasita foi elevada, foram encaminhadas para sequenciamento para confirmação. Os DNAs de outros parasitas e da bactéria *E. coli* também foram avaliados no ensaio de especificidade e não apresentaram nenhum sinal de amplificação.

Durante os ensaios de qPCR foi avaliada também a presença de inibidores nas amostras que poderiam afetar a performance da DNA polimerase. Assim, as amostras obtidas dos sedimentos purificados pela IMS foram amplificadas utilizando um controle positivo exógeno (IPC) para avaliar a interferência de inibidores provenientes do ambiente que não foram eliminados durante o procedimento de extração do DNA.

De forma geral, os métodos de extração de DNA são laboriosos com etapas de centrifugações excessivas e o uso de solventes, além de longos períodos de digestão utilizando a proteinase K, o que pode produzir DNA degradado e de baixo peso molecular principalmente quando a amostra é ambiental.

Por comparação entre os Cts das amostras com os Cts do IPC não foram constatados inibidores nas amostras pesquisadas pela qPCR. Conclui-se, portanto, que a purificação pela IMS associada ao kit TaqMan® Environmental Master Mix, específico para amplificação em amostras ambientais tenham sido suficientes para remoção dos inibidores.

Avaliando os resultados das amostras amplificadas a partir do sedimento do esgoto bruto, um número significativo de oocistos foi detectado nos dois pontos coletados, P1E (72%) e P2E (72%) com concentrações de 7 a 655 oocistos/L e 5 a 519 oocistos/L respectivamente. Nessas amostras ensaios repetidos foram realizados para confirmação dos resultados, além da reação de amplificação ser realizada em conjunto com controles

negativos incluindo *C. muris*. As amostras com elevadas concentrações do parasito foram encaminhadas para o sequenciamento para confirmação da amplificação específica de *Cryptosporidium* e todas as amostras foram positivas para espécies *C. hominis*/*C. parvum* pelo sequenciamento.

Todas as amostras de água bruta superficial detectadas pela nested PCR quando avaliadas pela qPCR reproduziram positividade, exceto as amostras 49A (P1A) e 50A (P2A), enquanto que no esgoto bruto apenas a amostra 46E (P2E) foi negativa pela qPCR. É provável que tenha ocorrido uma falha na amplificação da qPCR devido à baixa concentração de oocistos nas amostras e consequentemente de concentração de DNA nestas amostras ou mesmo a degradação do material extraído.

Apesar de não ser objetivo do estudo a comparação das técnicas aplicadas na detecção do parasito é possível inferir que a amplificação pela PCR convencional está mais sujeita aos efeitos inibitórios da amostra principalmente nas amostras de esgoto que não foram submetidas a nenhum método de purificação, uma vez que a qPCR foi capaz de detectar um maior número de amostras positivas.

Ainda que a reação dupla de amplificação (nested-PCR) seja necessária para amplificar amostras com baixa concentração de DNA, este método quando aplicado em amostras com concentração elevadas do parasito também pode gerar inibição em razão da quantidade de *amplicon* gerado na primeira reação. O tamanho do fragmento amplificado também pode estar envolvido na falha da amplificação, pois é necessário ter o DNA mais íntegro quando se amplifica fragmentos de tamanhos maiores.

No caso da qPCR a eficiência de amplificação é mais dependente da qualidade do DNA do que da quantidade extraída das amostras, já que a técnica é considerada mais sensível e tem maior capacidade de detectar poucas cópias. Além disso, este método tem como objetivo a amplificação de fragmentos menores que, quando associados aos kits de

reagentes para amplificação com volumes padronizados e com adição de substâncias anti-inibidoras, pode facilitar na exposição do alvo de interesse.

Neste estudo, por meio da amplificação pela qPCR também foi possível observar algumas curvas de amplificação com características de DNA degradado (dados não apresentados) devido à capacidade da técnica de acompanhar a amplificação em tempo real. Estas amostras amplificadas durante os ensaios de validação também forneceram informações importantes sobre a qualidade do material genético extraído.

Deste modo, os estudos moleculares apesar de representarem um componente importante de investigação epidemiológica, a padronização dessas técnicas quando aplicadas em amostras ambientais continua sendo um desafio para os estudiosos da área. Além disso, a relação entre patógeno e hospedeiro é complexa, pois as espécies de *Cryptosporidium* parecem possuir certa especificidade ao hospedeiro, mas não estão limitadas a um tipo de hospedeiro particular e isso favorece a sua disseminação no ambiente e dificulta a identificação da fonte de contaminação.

5.1. Considerações finais

A água é o elemento central da vida e sua qualidade é tão importante quanto a sua disponibilidade quando se trata de atender as necessidades básicas dos seres humanos. A poluição hídrica e o saneamento básico precário produzem efeitos econômicos com impactos significativos na agricultura, piscicultura, turismo, ramo imobiliário, produção industrial e nos serviços de saúde.

O acesso à água de qualidade, consequentemente livre de microrganismos patogênicos como, por exemplo, *Cryptosporidium* e *Giardia*, estão entre as principais deliberações do governo nacional amparadas pela Portaria 2914 de Dezembro 2011. Assim, podemos observar no artigo 31, § 2º da atual legislação a importância da monitorização do parasito *Cryptosporidium* na água de abastecimento. O Ministério da Saúde determina a obtenção de efluente em filtração rápida com valor de turbidez menor ou igual a 0,3 µT em 95% das amostras mensais ou uso de processo de desinfecção que comprovadamente alcance este resultado quando for detectada a concentração maior ou igual a 3,0 oocistos/L no(s) pontos(s) de captação de água.

As metodologias para avaliação de protozoários na água estão baseadas em padrões de ocorrência e remoção pelos sistemas de abastecimento de água, entretanto algumas limitações entre os métodos e a habilidade de sobrevivência dos organismos no ambiente dificultam o seu controle constituindo em ameaça à saúde humana. Neste sentido, além da aplicação e avaliação das técnicas laboratoriais adequadas na determinação dos patógenos, a Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM) ao determinar a probabilidade de infecção do hospedeiro humano oferece um suporte para o Plano de Segurança da Água aplicado pelas empresas produtoras da água e conforme recomendado pela OMS.

É importante fixar que nenhum ensaio molecular e ou de PCR quantitativo atualmente padronizado pode substituir a enumeração de organismos realizada pelo Método 1623.1 da USEPA que atualmente é considerado padrão-ouro de detecção de protozoários na água. Esta ferramenta está em constante avaliação e é utilizada associada ou não ao Método 1623.1 e a outros métodos moleculares por diferentes pesquisadores com objetivo de superar as limitações existentes e melhorar a detecção e enumeração dos oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* isolados em amostras ambientais.

Trabalhando com ambas as técnicas, acredito que é importante direcionar a atenção às etapas de concentração e extração do material genético de interesse para o sucesso da investigação e caracterização molecular, uma vez que a maior dificuldade na detecção dos protozoários na água está relacionada à quantidade das formas de resistência que não apresentam distribuição homogênea no ambiente aquático.

Por meio dos resultados observados no presente estudo, a identificação das espécies de *Cryptosporidium* isoladas na água bruta superficial e no esgoto bruto foi relevante já que as espécies que estavam circulando no período analisado fornecem informações epidemiologicamente importantes, pois estas espécies impõem risco à saúde humana conforme citado na literatura específica.

6. CONCLUSÕES

As técnicas utilizadas no presente estudo, permitiram obter as seguintes conclusões:

- ✓ Apesar do baixo percentual de amostras positivas pelo PCR convencional a utilização da nested PCR possibilitou sem a purificação por IMS a identificação e a confirmação taxonômica dos isolados de *Cryptosporidium* tanto nas amostras de água bruta como de esgoto bruto.
- ✓ A técnica de qPCR com a sonda específica padronizada no presente estudo para identificação das espécies *C. hominis* e/ou *C. parvum* permitiu a detecção nas amostras coletadas nos dois mananciais investigados sugerindo um bom desempenho quando associado a métodos de concentração e purificação como o Método 1623.1.
- ✓ Embora a qPCR tenha alcançado um baixo limite de detecção a quantificação foi mais eficiente quando aplicado nas amostras com maiores concentrações de oocistos, destacando a importância da escolha do gene multicópias *18S rRNA* no aumento da sensibilidade neste método e os testes de validação em ensaios de quantificação molecular.
- ✓ Entre as espécies caracterizadas genotipicamente estão *C. parvum* e *C. hominis* na água bruta superficial e *C. hominis*, *C. parvum* e *C. muris* no esgoto bruto revelando uma contaminação antroponótica tanto na água bruta superficial como no esgoto bruto.
- ✓ A detecção de *C. muris* nos pontos estudados demonstrou a importância dos roedores na disseminação de oocistos *Cryptosporidium* no ambiente devido à sua proximidade a ambientes urbanos e peri-urbanos e devido à possibilidade de se

tornarem hospedeiros para outras espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* como, por exemplo, *C. parvum*.

- ✓ As metodologias empregadas neste estudo demonstraram no geral, o potencial para aplicação em estudos de vigilância ambiental e, de acordo com os resultados apresentados, a necessidade da expansão de medidas efetivas para proteção destes mananciais e o monitoramento deste patógeno nos pontos estudados devido à sua capacidade de impactar negativamente a qualidade destas águas utilizadas no abastecimento público.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

Alonso JL, Amorós I, Guy R. Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. **Parasitol Res** 2014;113(7):2671-2678.

Antunes RG, Simões DC, Nakamura AA, Meireles MV. Natural Infection with *Cryptosporidium galli* in Canaries (*Serinus canaria*), in a Cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), and in Lesser Seed-Finches (*Oryzoborus angolensis*) from Brazil. **Avian dis** 2008; 52: 702-705.

ANA, Agência Nacional de Águas. O que é o Prodes. 2011 Disponível em: www.ana.gov.br/prodes/prodes.asp. Acesso em: 10/12/2011.

ANA, Agência Nacional de Águas. Altas Brasil - Abastecimento urbano de água.vol. 2. 2010. Disponível em: www.ana.gov.br/atlas Acesso em: 08/12/2011.

Applied Biosystems. Real-time PCR handbook, 3rd Edition, 68 p: 2014. Disponível em: <http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/real-time-pcr-handbook.html> Acesso em 08/2014.

Araújo RS, Carvalho TT, Matte RG, Fernandes LN, Balsalobre LC, Matte MH. A modified method for detecting of *Cryptosporidium* oocysts using DNA templates extracted from environmental samples. **Rev Inst Adolfo Lutz** 2010; 69 (1):141-143.

Araújo RS, Dropa M, Fernandes LN,Carvalho TT, Sato MIZ, Soares RM, Matte RG, Matte MH. Genotypic characterization of *Cryptosporidium hominis* from water samples in São Paulo, Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 2011; (85)5: 834- 838.

Araujo AJUS, kanamura HY, Almeida ME, Gomes AS, Pinto THL, Silva AJ. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-Infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo** 2008; 50 (3):139 – 143.

Arnone R D & Walling J P. Waterborne pathogens in urban watersheds. **J Water and Health** 2007; 5 (1): 149-162.

Assis DC, Resende DV, Cabrine-Santos M, Correia D & Oliveira-Silva MB. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora Belli* in HIV-infected patients. **Rev Inst Med Trop S Paulo** 2013;55(3):149-154.

Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks, An update 2004-2010. **Water Research** 2011; 15: 6603–6614.

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. **W Research** 2011; 45: 3175-3184.

Basso RMC, Silva-Ribeiro RT, Soligo DS, Ribacki SI, Callegari-Jacques SM, Zoppas BC. A Evolução da prevalência de parasitoses intestinais em escolares em Caxias do Sul, RS. **Rev Soc Bras Med Trop** 2008; 41(3):263-268.

Bankier AT, Spriggs HF, Fartmann B, et al. Integrated mapping, chromosomal sequencing and sequence analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Genome Res.* 2003;13(8):1787-99.

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):410-417.

Bettega JMPR, Machado MR, Presibella M, Baniski G, Barbosa CA. Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. **Ciênc Agrotec** 2006; 30(5): 950-954.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria Nº2325/GM de 08 de dezembro de 2003. Define a relação de doenças de notificação compulsória para todo território nacional. Disponível em: tr2001.saude.gov.br/sas/Portarias/Port2003/GM/GM-2325.htm

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria Nº518/GM de 25 de março de 2004, Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano. 2004. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm> Acesso em: 01/11/2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria Nº2914/GM de 12 de Dezembro de 2011, Procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2011b Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/PORTARIA2914.pdf>. Acesso em: 05/03/2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Plano de segurança da água: garantindo a qualidade e promovendo a saúde: Um olhar do SUS/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Brasília Ministério da Saúde, 2012.60p.

BRASIL, Ministerio das Cidades. PLANSAB, Plano Nacional de Saneamento Básico - Mais saúde com qualidade de vida e cidadania. Brasília, Ministério da Saúde, 2014. 215p.

Bonatti TR, Franco RMB. Real scale environmental monitoring of zoonotic protozoa and helminth eggs in biosolid samples in Brazil. **J Parasit Dis** 2014.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Muller R, Nolan T, Pfaffl M, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clin Chemis** 2009; 55:4; 611-622.

- Burnet JB, Ogorzaly L, Tissier a, Penny C, Cauchie HM. Novel quantitative TaqMan real-time PCR assays for detection of *Cryptosporidium* at the genus level and genotyping of major human and cattle-infecting species. **J Appl Microbiol.** 2013;114(4):1211-22.
- Cacciò SM. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. **Parassitologia.** 2005; 47(2):185-192.
- Carey CM, Lee H, Trevors Jt. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium hominis* oocyst. **W Research** 2004; 38:818-862.
- Carvalho Almeida TT, Pinto PLS. Quadros CMS, Torres DMAGV, Kanamura HY, Casimiro AM. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo Brazil. **Rev Inst Med Trop** 2006;48(3): 27- 32.
- Carvalho Almeida, TT. Cassimiro AM, Matté GR, Matté MH. An improved method for extracting *Cryptosporidium* sp. DNA from preserved faeces and potential application for cryptosporidiosis surveillance. **Rev Vigil San** v.1, n.3, p. 208 – 21, 2005.
- Cantusio Neto R, Santos LU, Sato MIZ and Franco RMB. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, southeast Brazil. **Water Sci & Technol** 2010; 62(1):217-222.
- Chalmers RM, Ferguson C, Caccio S, Gasser RB, El-Osta YGA, Heijnen L, Xiao L, Hadfield S, Sinclair M, Stevens M. Direct comparison of selected methods for genetic characterization of *Cryptosporidium parvum*. **Inter J for Parasitol** 2005; 35:397 – 410.
- Chalmers RM, Campbell B, Crouch N, Davies AP. Clinical laboratory practices for detection and reporting of *Cryptosporidium* in community cases of diarrhoea in the United Kingdom, 2008. **Euro Surveill.** 2010;15(48):pii=19731. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19731>.
- Chalmers RM, Davies AP. Minireview: clinical cryptosporidiosis. **Exp. Parasitol.** 2010;124(1):138-46.
- Chalmers RM, Katzer F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends Parasitol.** 2013;29(5):237-51.
- Centers for Disease Control and Prevention. CDC Cryptosporidiosis Surveillance-United States, 2009–2010 and Giardiasis Surveillance-United States, 2009–2010, MMWR 2012;61:5:23p
- Cimerman S, Castanedo CG, Luliano WA, Palacios R. Profile of intestinal parasitosis diagnosed in HIV infected patients in the HAART era at a reference center in São Paulo. **Braz Parasitol Latinoam** 2002; 57(3-4):111 – 119.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; CETESB. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos; Brasília: ANA, 2011.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no estado de São Paulo, 2014. Disponível em:

<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/agua/aguas-superficiais/relatorio-aguas-superficiais-2013-parte1.pdf> > 28/08/2014.

Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F. Detection of *Cryptosporidium* and Identification to the species level by *Nested* PCR and restriction fragment length polymorphism. **J Clin Microbiol** 2005; 43(3):1017 – 1023.

Conselho Nacional Do Meio Ambiente, CONAMA. Resolução Conama n. 357, de 17 de março de 2005 . Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília: MMA, 2005.

Centro de Vigilância Epidemiológica, CVE, 2008. Eduardo MBP, Vilela DB, Alvarez GG, Carmo GMI, Reina MCFP, Eid VRT, Vieira AM, Caldeira RP, Baldi ERSS, Arnaldo Mauro Elmec AM, Silva AJ. Primeiro surto de *Cyclospora cayetanensis* investigado no Brasil, ocorrido em 2000, no município de General Salgado (SP), e medidas de controle. BEPA. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa49_cyclo.htm. Acesso em: 10/10/2010.

Centro de Vigilância Epidemiológica, CVE, 2010. Eduardo MBP, Suzuki E, Fred J, Marques D, Lima LMA, Silva CMB, *et al.*. Investigação de surto de diarreia por norovírus no município de Guarujá, SP, Brasil, Dezembro de 2009 a Janeiro de 2010. In: Conferência Internacional em Epidemiologia - EPI CVE 2010. São Paulo, 2010. p.72. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/2010/Poster10_Surto_Guaruja.pdf

DiGiorgio CL, Gonzalez DA, Huitt CC. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural Waters by using Environmental Protection agency Method 1623. **Appl Environ Microbiol** 2002; (68)12: 5952-5955.

Dorak TM. Real time PCR. New York: Ed. Taylor & Francis Group, 2006.

Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Crouch ND, Chalmers RM. *Cryptosporidium* viatorum n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. **Int J Parasitol** 2012;42(7):675-82.

Empresa Paulista de Planejamento Metropolitano - EMPLASA, Rede urbana e regionalização do estado de São Paulo. São Paulo, 2011: 150p.

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int J for Parasitol** 2000; 30:1305 – 1322.

Fayer R, Santín M, Macarisin D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. **Vet Parasitol**. 2010;172(1-2):23-32.

Franco RMB, Rocha-Eberhardt, R & Cantusio NR. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Rev Inst Med Tropical** 2001; 43(2): 109-111.

Franco RMB & Cantusio NR. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in city of Campinas, State of São Paulo. Brazil. **Mem Inst Osw Cruz** 2002; 97(2): 205-207.

Franco, R.M.B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em Saúde Pública. **Rev Panam Infectol** 2007; 9(4): 36 - 43.

Franco RMB, Hachich EM, Sato MIZS, Naveira, RML, Silva, EC, Campos, MMC, Cantusio NR, 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. e Serv Saúde** 2012;21(2):233-242.

Feres FC, Lombardi AL, Carvalho MPP, Mendes LCN, Peiró JR, Cadioli FA, Meireles MV, Perri SHV, Feitosa FLF. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em cordeiros. **Arq Bras Med Vet Zootec** 2009; 61: 1002-1005.

Ferguson C, Deere D, Sinclair M, Chalmers RM, Elwin K, Hadfield S, Xiao L, Ryan U, Gasser R, El-Osta YA, Stevens M. Meeting Report: Application Of Genotyping Methods To Assess Risks From *Cryptosporidium* In Watersheds. **Environ Health Perspect** 2006; 114(3): 430 – 434.

Fernandes LN, Souza PP, Araújo RS, Razzolini MTP, Soares RM, Sato MIZ, Hachich EM, Cutolo AS, Matté RG, 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.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** 39:783-791.

Fournet N, Deege MP, Urbanus AT, et al. Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands , the United Kingdom and Germany in late summer season , 2012. 2012:3-7.

Fontaine M, Guillot E. Development of a TaqMan quantitative PCR assay species for *Cryptosporidium parvum*. **FEMS Microbiol Lett** 2002;214:13-17.

Fontaine M, Guillot E. An immunomagnetic separation–real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. **J. Microbiol. Methods** 2003;54(1):29-36.

Fundação SEADE. Relatório estadual de acompanhamento de 2012, Objetivos de Desenvolvimento do Milênio. Disponível em: http://produtos.seade.gov.br/produtos/odm/pdf/Metas_Milenio_2012.pdf Acesso em: 02/06/2014.

Fundação SEADE. Características populacionais e econômicas; fornecimento de água e coleta de esgotos em Taboão da Serra, Disponível em: <http://produtos.seade.gov.br/produtos/perfil/perfilMunEstado.php> Acesso em: 15/08/2014.

Fundação SEADE. Características populacionais e econômicas; fornecimento de água e coleta de esgotos em São Lourenço. Disponível em: <http://produtos.seade.gov.br/produtos/perfil/perfilMunEstado.php?loc=616> Acesso em: 15/08/2014.

Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Plutzer J. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and the surface, drink and ground Waters in the Lower Rhine, Germany. **Epidemiol Infect** 2013; 141: 9-21.

Gatei W, Greensill J, Ashford RW, Cuevas LE, Parry CM, Cunliffe NA, Beeching NJ, Hart CA. Molecular analysis of the *18S rRNA* gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **J Clin Microbiol** 2003; 41(4):1458-62.

Gomes MCRL, Souza JB, Fujinaga CI. Estudo de caso das condições de abastecimento de água e esgotamento sanitário dos moradores da estação ecológica de Fernandes Pinheiro (PR). **Ambiência** 2011; (7)1: 25-38.

Gonçalves EMN, Araújo RS, Orban M, Matté GR, Matté MH, Corbett CE. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. **Rev Inst Med Trop** 2008;50(3):165-167.

Guy RA, Pierre 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: 5178–5185.

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(10): 230 - 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.

Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. **J Clin Microbiol** 2011;49(3):918-24.

Heller L. Relação entre saúde e saneamento na perspectiva do desenvolvimento. **Ciência & Saúde Col** 1998; 3(2): 73-84.

Higgins JA, Trout JM, Fayer R, Shelton D & Jenkins MC. Recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples using continuous flow centrifugation. **Water Res** 2003; 37(15): 3551 - 3560.

Howard G, Pedley S & Tibatemwa S. Quantitative microbial risk assessment to estimate health risks attributable to water supply: Can the technique be applied in developing countries with limited data? **J Water Health** 2006; (4)1; 49-65.

- Huber F, Silva S, Bomfim TC, Teixeira KR, Bello AR. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Vet Parasitol** 2007; 150:65 -74.
- Hunter PR, Thompson RC. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int J Parasitol** 2005; 35(11-12):1181-1190.
- Hadfield SJ, Chalmers RM. Detection and characterization of *Cryptosporidium* cuniculus by real-time PCR. **Parasitol Res** 2012;111(3):1385-90.
- Ignoto RF. Avaliação quantitativa de risco microbiológico em águas e biossólidos: estado da arte. 2010. 66p. Dissertação (**Mestrado em Ciências**) - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE. Censo demográfico, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/> Acesso em 09/09/2014.
- Instituto Trata Brasil. esgotamento sanitário inadequado. Um diagnóstico da situação nos 81 municípios brasileiros com mais de 300 mil habitantes, 2010, 11p.
- Instituto Trata Brasil. Benefícios econômicos da expansão do saneamento brasileiro- Qualidade de vida, produtividade, educação e valorização ambiental. 2014, 24p.
- Jiang J, Alderisio KA, Singh A, Xiao L. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. **Appl Environ Microbiol** 2005; 75(3):1135-1141.
- Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causer L, Wilkins PP. Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens **J Clin Microbiol** 2003; 41(2); 623-626.
- Johnson AM, Di Giovanni GD, Rochelle PA. Comparison of assays for sensitive and reproducible detection of cell culture-infectious *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in drinking water. **Appl Environ Microbio** 2012; 78(1):156-162.
- Karp G. Biologia Celular e Molecular, 3º Edição - Ed Manole, Barueri - São Paulo, 2005.
- 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 - 38.
- Katsumata T, Hosea D, Ranuh IG, Uga S, Yanagi T, Kohno S. Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. **Am J Tropic Med Hyg** 2000; 62(1): 70- 72.
- Keeley A, Faulkner BR. Influence of land use and watershed characteristics on protozoa contamination in a potential drinking water resources reservoir. **Water Res** 2008 doi: 10.1016/j.watres.2008.02.028.

- Lallo MA, Pereira A, Araújo RS, Favorito SE, Bondan EF. Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios em animais silvestres em área de desmatamento no Estado de São Paulo, Brasil. 2009.
- Leal PMRM, Heller L, Cerqueira DA, Queiroz JTM. Avaliação quantitativa do Risco à Saúde: Protozoários em água de consumo, um estudo em Divinópolis-MG. **Cad saúde Colet** 2009; 17(2): 391-408.
- Le Blancq SM, Khramtsov NV, Zamani F, Upton SJ, Wu T. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. **Mol Biochem Parasitol**. 1997; 15; 90(2): 463-78.
- Lebwohl B, Deckelbaum RJ, Green PHR. Giardiasis. **Gastr Endosc** 2003; 57(7): 906-913;
- LeChevallier MW, Norton WD, Siegel JE & Abbaszadegan M. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. **Appl Environ Microbiol**. 1995; 61(2): 690-697.
- Leoneti AB, Prado EL, Oliveira SVWB. Saneamento básico no Brasil: considerações sobre investimentos e sustentabilidade para o século XXI. **Rev Adm Pública** 2011; 45(2): 331-348.
- Lobo M.L, Xiao L, Antunes F, Matos O. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. **Lett in App Microbiol** 2009; 48: 732-737.
- Lucca P, Gaspari EN, Bozzoli LM, Funada MR, Silva SOS, Iuliano W, Soares RM. Molecular characterization of *Cryptosporidium* Spp. from HIV infected patients from an urban area of \brazil **Rev Inst Med Trop S Paulo** 2009 51(6):341-343.
- Machado E R, Santos DS, Costa-Cruz JM. Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of MinasGerais. **Rev Soc Bras Med Trop** 2008; 41(6):581-585.
- Machado ECL, Stamford TLM, Machado EHL, Soares DS, Albuquerque MNL. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife-PE. **Arq Bras Med Vet Zootec** 2009; 61(6):151-155.
- Masago Y, Oguma K, Katayama H, Ohgaki S. Quantification and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in river water by quenching probe PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Water Sci Technol**. 2006;54(3):119-26.
- Matos SMA, Assis AMO, Prado MS, Strina A, Dos Santos LA, De Jesus SR, Barreto ML. *Giardia duodenalis* infection and anthropometric status in preschoolers in Salvador, Bahia state, Brasil. **Cad Saúde Pública** 2008 24(7):1527-1535.
- Meireles MV, Soares RM, Bonello F, Gennari SM. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. **Vet Parasitol** 2007; 147: 166–170.

Meireles MV. *Cryptosporidium* infection in Brazil : implications for veterinary medicine and public health. **Rev Bras Parasitol Vet Jaboticabal** 2010;19(4:) 197-204.

Meyer A, Todt C, Mikkelsen NT, Lieb B. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. **BMC Evolutionary Biology** 2010; 10:70.

Ministério do Meio Ambiente-MMA. Resolução do CONAMA Nº 430 de 13 de Maio de 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/> Acesso em: 01/12/2011.

Minarovicová J, Kacliková E, Krascenicsová K, Siekel P, Kuchta T. A single-tube nested Real-time polymerase chain reaction for sensitive contained detection of *Cryptosporidium parvum*. **Lett in App Microbiol** 2009; 49: 568-572.

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

Nishi L, Baesso ML, Santana RG, Fregadolli P, Falavigna DLM, Falavigna-Guilherme AL. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a Public Water-Treatment System. **Zoon Public Health** 2009; 56: 221-228.

Ng-Hublin SYJ, Singleton RG, Ryan U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rats and mice from rural communities in the Philippines. **Infect Genet Evol** 2013; 16: 5–12.

Organização Mundial da Saúde - OMS. Guidelines for drinking water quality. Emerging issues in water and infectious disease. 2003, Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/emerging.pdf Acesso em: 23/10/2011.

Organização Mundial da Saúde - OMS. Water Safety Plans -Managing drinking-water quality from catchment to consumer 2005. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/wsp0506/en/ Acesso em 02/11/2013.

Organização Mundial da Saúde - OMS. Guidelines for drinking water quality. *Cryptosporidium* as reference pathogen, 2006. Disponível em http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/gdwqrevision/cryptodraft2.pdf.2006 Acesso em 19/11/2011.

Organização Mundial da Saúde - OMS. Progress on sanitation and drinking-water. 2010 Update. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/9789241563956/en/ Acesso em 01/10/2011

Organização Mundial da Saúde - OMS. Guidelines for drinking-water quality, fourth edition. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/ Acesso em 01/02/2013.

Organização Mundial da Saúde - OMS. Consultation on the Development of a Strategy on Water Quality and Health 2012. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/ Acesso em: 08/08/2014.

- Oliveira-Silva MB, Oliveira LR, Resende JC, Peghini BC, Ramirez LE, Lages-Silva E, Correia D. Seasonal profile and level of CD4+ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/AIDS patients in the Triângulo Mineiro region Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2007; 40(5):512 – 515.
- Osaki SC, Soccol VT, Costa AO, Oliveira-Silva MB, Pereira JT, Procópio AE. Polymerase chain reaction and nested-PCR approaches for detecting *Cryptosporidium* in water catchments of water treatment plants in Curitiba, State of Paraná, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**.2013;46(3):270-276.
- Paparini, A, Jackson, B, Ward, S, Young, S, Ryan, U, 2012. Multiple *Cryptosporidium* genotypes detected in wild black rats (*Rattus rattus*) from northern Australia. **Ex Parasitol** 131 (4), 404–412.
- Paz e Silva FM, Lopes RS and Araujo Jr JP.High. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet Jaboticabal** 2013; 22,(1): 22-28.
- Paz e Silva FM, Lopes RS , Bresciani KDS, Amarante AFT and Araujo Jr JP.High occurrence of *Cryptosporidium ubiquitum* and *Giardia duodenalis* genotype E in sheep from Brazil. **Acta Parasitol** 2014, 59(1), 193–196.
- Pedraza-Díaz S, Amar C, Iversen AM, Stanley P J & McLauchlin J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* ‘dog type’ from patients in England. **J Med Microbiol** 2001; 50: 293–296.
- Pereira Junior JS. Aplicabilidade Da Lei Nº 11.445/2007 Diretrizes Nacionais Para o Saneamento Básico. Consultoria Legislativa. Disponível em:www2.camara.gov.br/documentos-e/2008-4884-Juvenil.pdf Acesso em 03/12/2011.
- Pereira JT, Soccol VT, Costa AO, Castro EA, Osaki SC, Paulino RC. *Cryptosporidium* spp.: para controlar é necessário conhecer. **Rev Saúde Amb** 2009; 10(2): 13-25.
- Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. 2004, Chapter 3 pages 87 – 112.
- Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Törökné A, Márialigeti K. Detection and Characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water sample by IFT PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. **Int J Hyg environ Health** 2008; 211: 524-533.
- Plutzer J & Tomor B. The role of aquatic birds in the environmental dissemination of human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary. **Parasitol International** 2009; 58: 227–231.
- Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions **Int J Hyg Environ Health** 2010; 213; 321-333.
- Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes Infection** 2004; 6:773-785.

Razzolini MTP, Santos TFS & Bastos VK. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* cysts/oocysts in watersheds and drinking water sources in Brazil urban areas. **J Water Health** 2010; 8(2):399-404.

Relatório do plano municipal de saneamento básico de São Lourenço da Serra, Secretaria de Saneamento e Energia de São Lourenço da Serra, 2010, 166p.

Ren X, Zhao J, Zhang L, et al. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). **Exp Parasitol** 2012;130(3):274-81.

Ribeiro WC. Oferta e estresse hídrico na Região Metropolitana de São Paulo. **Estudos Avançados** 2011; 25 (71), 119.

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: 1147-1152.

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

Rose JB, Huffman DE, Gennaccaro A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS Microbiol Rev** 2002; 26(2): 113-123.

Rosen, B. 2000. *Waterborne Pathogens in Agricultural Watersheds*. US Department of Agricultural, Natural Resources Conservation Service, **Watershed Science Institute**, School of Natural Resources, University of Vermont, Burlington, Vermont.

Ryan UM, Read C, Hawkins P, Warnecke M, Swanson P, Griffith M, Deere D, Cunningham M, Cox P. Genotype of *Cryptosporidium* from Sydney water catchments areas. **J Appl Microbiol** 2005; 98:1221-1229.

Ryan U, Power M. *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. **Parasitology** 2012;139(13):1673-88.

Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**. 2014 Aug 11:1-19.

Ryu H, Abbaszadegan M. Long-term study of *Cryptosporidium* and *Giardia* occurrence an quantitative microbial risk assessment in surface waters of Arizona in the USA. **J Water Health** 2008; 6(2): 263-273.

Ryu H, Mayer B, Abbaszadegan M. Applicability of quantitative PCR for determination of removal efficacy of enteric viruses and *Cryptosporidium* by water treatment processes. **J Water Health** 2010; 8(1): 101-107.

Ruecker NJ, Hoffman RM, Chalmers RM, Neumann NF. Detection and resolution of *Cryptosporidium* species and species mixtures by genus-specific nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, direct sequencing, and cloning. **Appl Environ Microbiol** 2011;77(12):3998-4007.

- Samra NA, Jori F, Samie A, Thompson P. The prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in wild mammals in the Kruger National Park, South Africa. *Vet. Parasitol.* 2011;175(1-2):155-9.
- Samra NA. An epidemiological study of cryptosporidiosis at the wildlife / livestock / human interface in Mpumalanga Province , South Africa by. 2013;(April).
- Santos LU, Bonatti TR, Cantusio Neto R, Franco R.M. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge sample in Campinas, SP, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 2004; 46(6): 309 – 313.
- Sato MIZ, Galvani AT, Padula JA, et al. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Sci. Total Environ.** 2013; 442:389-396.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol and Evol** 4:406-425
- Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’ **Trends in Parasitol** 2006; 22(5) 203-208.
- Silva SOS, Richtzenhain LJ, Barros IN, Gomes, AMMC, Silva, AV, Kozerski, ND, Araújo CJB, Keid, LB, Soares, RM. A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. **Exp Parasitol.** 2013;135(3):551-7.
- Soares SRA, Bernardes RS, Netto OMC. 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.
- Souza CF, Bacicurinski I, Silva EFF. Avaliação da qualidade da água do rio Paraíba do Sul no município de Taubaté-SP. **R Bioc** 2010; 16(1): 16-23.
- Souza DS, Ramos APD, Nunes FF, Moresco V, Taniguchi S, Leal DAG, Sasaki ST et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecot Environ Safety** 2012;76: 153–161.
- Soliman RH & Othman AA. Evaluation of DNA melting curve analysis Real-time PCR for detection and differentiation of *Cryptosporidium* species. **Parasitol U Journal** 2009; 2(1) 47-54.
- Sunnotel O, Lowery CJ, Moore JE, Dooley JS, Xiao L, Millar BC, Rooney PJ, Snelling WJ. *Cryptosporidium*. **Lett Appl Microbiol** 2006a; 43(1):7-16.
- Smith HV, Nichols RAB, Mallon M, Macleod A, Tait A, Reilly WJ, Browning LM, Gray D, Reid SWJ, Wasrling JM. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. **The vet Rec** 2005, 156,710-711.

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

SNIS-Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos - 2012. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2014.164 p.

Staggs SE, Beckman EM, Keely SP, et al. The applicability of TaqMan based quantitative real-time PCR Assays for detecting and enumerating *Cryptosporidium* spp. oocysts in the Environment. **PLoS One** 2013;8(6):e66562.

Stroup SE, Roy S, Mchele J, Maro V, Ntabaguzi S, Siddique A, Kang G, Guerrant RL, Kirkpatrick BD, Fayer R, Herbein J, Ward H, Haque R, Houpt ER. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using scorpion probes. **J Med Microbiol** 2006; 55 (9):1217-1222.

Srisuphanunt M, Panagiotis K, Charoenca N, Boonkhao N, Ongerth JE. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in environmental waters of southwest coastal areas of Thailand. **Parasitol Res** 2010;106: 1299-1306.

Tashima NT, Simoes MJ, Leite CQ, Fluminhan A, Nogueira MA, Malaspina AC. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 2009; 51(1):19-24.

Tamura K. and Kumar S. (2002). Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages **Molecular Biology and Evolution** 19:1727-1736.

Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)** 101:11030-11035.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol Bio Evol** 2011; 28 (10); 2731-9.

TRATA BRASIL - Benefícios econômicos da expansão do saneamento, Relatório de pesquisa produzido para o Instituto Trata Brasil e o Conselho Empresarial Brasileiro para o Desenvolvimento Sustentável, 2014. 69p

Thompson RCA, Monis PT. Variation In *Giardia*: Implication For Taxonomy And Epidemiology. **Adv Parasitol** 2004; 58:69-137.

USEPA - Environmental Protection Agency. 2005 Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. EPA-815-R-05-002. Disponível em: <http://www.epa.gov/nerclwww/1623ap01.pdf>. Acesso em 20/08/2010.

USEPA - Environmental Protection Agency 2005. Rogers S, Haines J Detecting and Mitigating the Environmental Impact of Fecal Pathogens Originating from Confined Animal Feeding Operations: Review. 185p.

- USEPA - United States Environmental Protection Agency. 2012 Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Disponível em: <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/labcert/upload/epa816r12001.pdf> Acesso em: 12/01/2013
- UNICEF -Fundo das Nações Unidas para a Infância. Crianças morrem diariamente devido à falta de água potável, saneamento básico e higiene, 2013. Disponível em: http://www.unicef.org/brazil/pt/media_25190.htm Acesso em: 01/08/2014.
- Upton, S.J., Current, W.L., 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. **The Journal of Parasitology** 71, 625– 629
- Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, Rooyen MAAV, Lieshout LV, Polderman AM. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. **Mol and Cell Probs** 2003; 17: 223-225.
- Widerström M, Schönning C, Lilja M, et al. Large Outbreak of *Cryptosporidium hominis* Infection Transmitted through the Public **Wat Suppl Sweden**. 2014;20(4):581-589.
- Xiao L, Escalante L, Yang C, et al. Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* Parasites Based on the Small-Subunit rRNA Gene Locus. **Appl Environ Microbiol** 1999;65(4):1578-1583.
- Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk Tk, Gradus S, Lal A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw water and wastewater. **Appl Environ Microbiol** 2001; 67(3): 1097-1101.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton Sj. *Cryptosporidium* taxonomy, recent advances and implications for public health. **Clin Microbiol Rev** 2004; 17(1): 72-77.
- Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Exp Parasitol** 2010;124(1):80-89.
- Xu P, Widmer G, Wang Y, Ozaki LS, Alves JM, Serrano MG, Puiu D, Manque P, Akiyoshi D, Mackey AJ, Pearson WR, Dear PH, Bankier AT, Peterson DL, Abrahamsen MS, Kapur V, Tzipori S, Buck GA. The genome of *Cryptosporidium hominis*. **Nature**. 2004;28;431(7012):1107-12.
- Yang R, Murphy C, Song Y, et al. Specific and quantitative detection and identification of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in clinical and environmental samples. **Exp Parasitol** 2013;135(1):142-7.
- YU X, Michele I, Dyke V, Pritt A, Peter MH. Development of a direct extraction protocol for real-time PCR detection of *Giardia lamblia* from surface water, **Ecotoxicology**, 2008 18: 661-668).
- Zhou L, Singh A, Jiang J, XIAO L. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. **J Clin Microbiol** 2003; 41: 5254 - 5257.

8. ANEXOS

Anexo 1

Deteção de cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. pela técnica de filtração/IMS/FA (Método 1623.1/EPA 2012), utilizando sistema Filta-Max®.

Concentração da amostra

1. Primeiramente, o fluxo de 1 a 4L por minuto eajustado mediante passagem de água reagente, após esse ajuste é realizado a filtração da amostra;
2. Colocar o filtro de espuma do sistema Filta-Max® no compartimento do filtro e proceder ao fechamento do mesmo para a passagem da amostra, sem vazamentos;
3. Após a passagem da amostra, deixar a pressão diminuir para escoamento total do fluxo. Nessa etapa, quando houver saturação do filtro de espuma, esse é trocado quantas vezes forem necessárias;
4. Após a filtração o filtro de espuma do sistema Filta-Max® é transferido e fixado ao tubo de eluição da estação de lavagem manual (Idexx®). O compartimento de filtros é lavado com solução tampão (PBST – solução salina tamponada com fosfato). O excedente de amostra e a água de lavagem são incorporados ao tubo de eluição.

Eluição da amostra

1. A membrana (73mm), com a parte rugosa voltada para cima, é posicionada na base do tubo de concentração acoplado à estação de lavagem. O filtro de espuma saturado com a amostra é fixado à cabeça do êmbolo e em seguida o tubo de eluição acoplado à cabeça do êmbolo da estação de lavagem manual.
2. O êmbolo é deslocado para baixo para a retirada do parafuso do filtro de espuma permitindo que a haste de aço seja acoplada à base do tubo de eluição.
3. Um volume de 600mL é adicionado ao tubo de concentração e este logo em seguida é atarraxado à base do tubo de eluição para a realização da primeira lavagem;

4. A lavagem dos discos de espuma é promovida pela movimentação, ascendente e descendente, do êmbolo por 20 vezes. Esses movimentos são suaves para prevenir a formação de espuma e danificação dos discos de espuma;
5. Após essa primeira etapa de lavagem, o tubo de concentração será desatarraxado e o líquido que fica no interior da haste de aço é purgado e incorporado ao conteúdo do tubo de concentração;
6. O tubo de concentração contendo o resultado da primeira etapa de lavagem é levado ao agitador magnético e o conjunto de vácuo manual acoplado à torneira da parte inferior do tubo de concentração. Com o auxílio da bomba de vácuo manual, o líquido contido nesse tudo é drenado até o limite de um volume de 50mL desse líquido recobrando a membrana posicionada na base do tubo. Em seguida, esse volume de 50ml é transferido a um tubo cônico de centrífuga com capacidade de 50mL;

Obs: O vácuo aplicado deve ser o menor possível e não excedendo a 30cm Hg.

7. Para o enxágue do tubo de concentração um volume aproximado de 50mL é utilizado e então transferida a um tubo de capacidade de 50mL;
8. Para a realização da segunda lavagem, proceder como já descrito para a realização da primeira lavagem e, então seguir para a concentração do eluído obtido na segunda lavagem com a incorporação do concentrado obtido na etapa anterior;
9. Após completar as duas etapas de eluição e concentração, é realizada a eluição e a concentração da membrana.
10. A membrana é retirada da base do tubo de concentração e colocada no interior de um saco plástico com a adição de 5mL de PBST. A membrana então é massageada através do saco plástico até adquirir um aspecto limpo e o eluído transferido ao tubo de capacidade de 50mL. Essa operação é repetida por uma segunda vez, e ainda por uma terceira se observada necessidade.

Obs: Utilizar quantas membranas forem necessárias de acordo com a turbidez da amostra.

11. O concentrado é transferido para tubos cônicos de centrífuga de 250mL ou 50mL, dependendo da necessidade.

Concentração e purificação

1. O eluato obtido é concentrado por centrifugação por 15 minutos a 1500XG. Após a centrifugação, é obtido o sedimento e o seu volume registrado, assim como a data e hora da concentração;
2. Caso, o volume do sedimento seja menor que 0,5mL, o sobrenadante deve ser cuidadosamente aspirado utilizando-se pipeta *Pasteur*, deixando um volume total de 5mL;
3. A etapa de IMS é realizada com todos os reagentes a temperatura ambiente, 15° C a 25° C.
4. A partir do tampão SL-A 10X fornecido é preparada uma diluição de 1X do tampão SL-A;
5. A um tubo de lado plano, é adicionado 1mL de tampão SL-A 10X e 1mL do tampão SL-B fornecido. Para a captura dos cistos e oocistos é utilizada pipeta graduada de 10mL (enxaguada com o tampão de eluição) e a amostra concentrada será transferida ao tubo de lado plano contendo tampão SL;
6. É efetuada a agitação em agitador tipo Vortex contendo os *DynabeadsCrypto-Combo* do *kit* por, aproximadamente, 10 segundos;
7. São adicionados 100µL de *DynabeadsGC-Combo* ao tubo contendo o concentrado e os tampões A e B;
8. Após a realização da etapa anterior. O tubo é fixado a um *mixer* rotatório e agitado por 1 hora a 18 rpm, e então removido e colocado no concentrador de partícula magnéticas (MPC-1) com o lado plano do tubo junto ao magneto;
9. O tubo é removido do MPC-1 e ocorre a ressuspensão da amostra com a adição de 1mL do tampão SL-A 1X (preparado anteriormente, a partir do tampão SL-A 10X, solução estoque fornecida), nessa etapa não há agitação em agitador tipo Vortex;
10. São efetuados dois enxagues (o primeiro com 1,5mL de solução tampão SL-1X e o segundo com 0,5mL de água purificada), o líquido é transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL;
11. O tubo de microcentrífuga contendo a amostra é colocado em um segundo concentrador de partículas magnéticas (MPC-M), com sua faixa magnética, por 1 minuto com aproximadamente um balanço de 180° por segundo. Ao final dessa

etapa, as partículas deverão produzir nítida mancha marrom na parte posterior do tubo;

12. O sobrenadante obtido no tubo mantido no MPC-M, é imediatamente aspirado;
13. Para a dissociação dos cistos e oocistos das partículas, a faixa magnética é removida do MPC-M e adicionados 100µL de água purificada ao tubo de microcentrífuga, e esse é submetido a agitação em agitador tipo Vortex;
14. Após agitação, o tubo é transferido a um banho úmido e incubado a 80°C por 10 minutos; Passados 10 minutos de incubação, o tubo de microcentrífuga é submetido a nova agitação em agitador tipo Vortex, assegurando-se que toda a mostra se encontra no fundo do tubo;
15. O tubo é, então, colocado no MPC-M com a faixa magnética e todo o seu conteúdo armazenado a - 20°C.

Anexo 2

Deteção de cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. por meio da técnica Concentração/IMS/FA (McCuin & Clancy, 2005) para Esgoto bruto - efluente primário.

A técnica contempla as etapas descritas a seguir:

1. Para concentração dos oocistos de *Cryptosporidium* são utilizados 500 mL de esgoto bruto.
2. Adicionar a cada amostra, um volume apropriado de Tween 80 para se obter a concentração final de 1%. Homogeneizar totalmente as amostras;
3. Centrifugar 1500g/15 minutos (tubos cônicos de 250 mL). Registrar volume do pellet e aspirar o sobrenadante para aproximadamente 5-8 mL;

Separação Imunomagnética (Dyna)

- ✓ Transferir amostra concentrada para tubos de Leighton individual, contendo 1,0 mL de cada tampão SL-A e SL-B (kit Dynal). Lavar cada tubo cônico com 2 mL de tampão PBS contendo 0,01% de Tween 20 (PBST) e transferir para o tubo de Leighton contendo a respectiva amostra;
- ✓ Adicionar a cada tubo de Leighton 0,75g de Kaolin (não adicionar em efluentes secundário e terciário). Para cada tubo de Leighton são adicionado 100µL de Crypto Dynabeads e incubados durante 1 hora no sample mixer (18rpm) em temperatura ambiente.
- ✓ Transferir tubo de Leighton para MPC-1 e homogeneizar suavemente num ângulo de 90 graus durante 1 minuto e deixar em repouso durante 3 minutos. No final dos 3 minutos, homogeneizar novamente gentilmente cinco vezes para ressuspender os beads. Recolocar o tubo no MPC-1. Homogeneizar suavemente num ângulo de 90 graus durante 1 minuto e deixar em repouso por mais 3 minutos e no final homogeneizar novamente durante 30 segundos/90 graus no MPC-1 e decantar o sobrenadante.

- ✓ Ressuspender os beads em 1mL de buffer SL A 1X, transferir para tubos tipo eppendorf de 1,5 mL, colocar os tubos no MPC-M e homogeneizar 180 graus durante 2 minutos. Descartar o sobrenadante, remover o tubo do MPC-M e adicionar 100 µL de água destilada e agitar suavemente no vortex;
- ✓ Transferir o tubo de eppendorf para o banho úmido 80 graus/10 minutos. Agitar o tubo de eppendorf suavemente no vortex e assegurar-se que toda amostra está no fundo do tubo. Colocar o tubo no MPC-M com a faixa magnética para separação e armazenar todo o volume a -20°C para posterior extração do DNA.

Anexo 3

Ronalda Silva de Araújo

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/7580082337030752>

Última atualização do currículo em 28/11/2014

Biomédica, Mestre em Saúde Pública Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo USP; Doutoranda em Ciências, pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo USP (2014 -2015), Pesquisador colaborador no Laboratório de Práticas em Saúde Pública da Universidade de São Paulo; Tem experiência na área de Saúde Pública, com ênfase em doenças emergentes e oportunistas, atuando nos seguintes temas: epidemiologia molecular, saúde pública, doenças parasitárias e parasitologia ambiental. Participação em projetos de pesquisa na área de Saúde Coletiva e Ambiental que visam o estudo de organismos de interesse em Saúde Pública e Vigilância Sanitária, por intermédio de métodos microbiológicos e moleculares para a caracterização desses organismos e para avaliar a aplicação desses estudos nas diferentes áreas de atuação do Laboratório de Saúde Pública seja ela para a clínica ou meio ambiente. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação**Nome**

Ronalda Silva de Araújo

Nome em citações bibliográficas

ARAÚJO, Ronalda Silva de; Araujo, R. S.

Endereço**Endereço Profissional**

Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo.

AV. Dr. Doutor Arnaldo 715

Cerqueira Cesar

01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil

Telefone: (11) 30617753

URL da Homepage: <http://www.fsp.usp.br>

Formação acadêmica/titulação

2011

Doutorado em andamento em Saúde Pública.

Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Título: Aplicação de PCR em tempo real na detecção e quantificação de protozoários entéricos para estudo de avaliação e monitoramento de patógenos em mananciais de abastecimento público, Ano de obtenção: 2014.

Orientador: Maria Helena Matte.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Palavras-chave: Cryptosporidium; Doenças Parasitárias; Biologia Molecular; Protozoários Emergentes; Public health.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva.

Setores de atividade: Saúde humana e serviços sociais; Atividades de atenção à saúde humana.

2006 - 2008

Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 5).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Genotipagem de Cryptosporidium spp. provenientes de amostras de águas superficiais e recreacionais como fonte de informação da dispersão de espécies no ambiente, Ano de Obtenção: 2008.

Orientador: Maria Helena Matté.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

Palavras-chave: Vigilância Sanitária; Biologia Molecular; Saúde Pública; Epidemiologia Molecular.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.

Setores de atividade: Educação; Saúde e Serviços Sociais.

2005 - 2006

Aperfeiçoamento em Aprimoramento Profissional. (Carga Horária: 380h).

Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Título: Detecção de microrganismos de interesse para Saúde Pública por técnicas microbiológicas e de biologia molecular.. Ano de finalização: 2006.

Orientador: Maria Helena Matté.

Bolsista do(a): Fundação do Desenvolvimento Administrativo.

2001 - 2004

Graduação em Biomedicina.

Universidade Bandeirante de São Paulo, UNIBAN, Brasil.

Título: Ocorrência de Cryptosporidium spp em Fezes de Animais Silvestres Capturados nas Áreas de Inundação e Entorno dos Reservatórios de Paraitinga e Biritiba-Mirim..

Orientador: Profa Dra. Maria Anete Lallo.