Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Maria Aparecida Moraes Marciano

**Pesquisa de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii* e
Cyclospora cayetanensis em água para consumo humano**

São Paulo

2019

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Maria Aparecida Moraes Marciano

**Pesquisa de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii* e
Cyclospora cayetanensis em água para consumo humano**

Versão corrigida

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação do Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.**

**Área de Concentração: Doenças
Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia
Pereira-Chioccia**

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Marciano, Maria Aparecida Moraes

Pesquisa de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii* e *Cyclospora cayetanensis* em água para consumo humano / Maria Aparecida Moraes Marciano. – São Paulo, 2019.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Vera Lucia Pereira-Chioccia

Descritores: 1. PROTOZOA. 2. BIOLOGIA MOLECULAR. 3. ÁGUA. 4. SURTO DE DOENÇAS. 5. VIGILÂNCIA SANITÁRIA.

USP/IMTSP/BIB-19/2019.

*Dedico este trabalho a minha família linda, meus filhos Vitor e Marina, ao meu grande
companheiro Luiz e ao meu netinho Pietro que tanto me traz alegria*

*Aos meus pais Mario e Eunice, meus irmãos Katia, Graça e Francisco, meus sobrinhos
e também aos meus sogros Augusto e Vera*

Obrigada pelo apoio incondicional

Agradecimentos

Primeiramente à Dra. Vera Lúcia Pereira-Chiocola, minha orientadora, pela generosidade em me orientar, sempre tão dedicada e confiante, que mesmo com as dificuldades acreditou neste trabalho e permitiu que ele fosse concluído. Obrigada pela amizade e pelos ensinamentos.

À Dra. Maria Luisa Barbosa (Malú), minha mãezona na ciência, obrigada pelos ensinamentos moleculares e de vida. Ahhh... obrigada também pelos puxões de orelha e pelas palmadas no bumbum....aiiiii....doeu mas valeu...e muitoooo.

Marcia Bittar Atui (Bitts), minha grande incentivadora, desde quando iniciei meus trabalhos na Seção de Microscopia, como técnica de apoio. Sempre acreditou em mim e me deu oportunidade, principalmente em relação aos parasitos em alimentos....obrigada mesmo. Minhas conquistas são parte de tudo o que você permitiu.

À querida Márcia Dimov Nogueira por todo apoio, por ter acreditado no meu potencial, até mais do que eu....não me esqueço...logo no início...me falou que eu tinha um “plus”, juro que demorei para entender o que era mais leve para toda vida. Obrigada pelas trocas de experiências que foram de um valor inestimável para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Dr. Pedro Luiz da Silva Pinto, um grande incentivador, sempre disposto a repassar seus conhecimentos.....muito obrigada pelo inestimável apoio e dedicação, que muitas vezes deixava sua rotina de lado para me atender. Serei sempre grata.

Ao Antônio Roberto de Souza, um “gentleman”, sempre disposto a ajudar, o fotodocumentador mais sério e profissional que conheci, obrigada pela paciência, amizade e pelas fotos tiradas durante os experimentos.

A todos os amigos do Núcleo de Morfologia e Microscopia do Centro de Alimentos, Augusta Mendes da Silva, Laís Fernanda de Pauli Yamada, Cinthia Iara de Aquino, Hilberto Matosalem, Sandra Zoraide Obando Ayad e Juliane dos Santos Soares, meus sinceros agradecimentos, principalmente pela paciência e por me apoiar na diretoria, entendendo minhas falhas. E ao último agregado Leovil Loreno Lira da Silva, que ainda vou encher muito...pedindo muitos favores.

Um agradecimento especial a Augusta Mendes da Silva pela ajuda nas formatações do trabalho e pelas aulas de informática no dia a dia.

À Rafaela da Silva, minha primeira aluna PIBIC, obrigada pela paciência, mais aprendo do que ensino. Você será uma excelente profissional, acredito nisso.

Aos meus colegas do Núcleo de Microbiologia, todos, e em especial a Cecília, Ruth, Cris e Alcina, e a Denise e Ulisses do Cali pelos momentos de descontração e pelo apoio nos experimentos, obrigada pela amizade.

Um agradecimento muito especial a Maria Imaculada Campos Goes (Macúúúúúú') que mora no meu coração....obrigada pelos cafés e pelas pipocas no meio da tarde.

Um agradecimento especial as diretoras do Centro de Alimentos Deise Ap. Pinatti Marsiglia e Regina Sorrentino Minazzi Rodrigues, que sempre me apoiaram e deram todo suporte para realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Cristina da Silva Meira-Strejevitch e Ricardo Gava por toda assistência na parte laboratorial e paciência comigo. Ricardo Dalla Zanna pelas amostras de DNA e pelo apoio no início deste trabalho.

A Maria Aparecida Perez “Cidocaaa” do Laboratório de Biologia Molecular obrigada pelo pronto atendimento com os materiais do laboratório e pelas boas risadas falando dos nossos netos.

A Eliane Araújo, secretária do Serviço de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por todo apoio durante o doutorado, sempre disposta a ajudar.

Ao Sr. Carlos José Quinteiro, bibliotecário chefe da Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelas correções estruturais do trabalho.

Não poderia deixar de agradecer ao Dr. Heitor Franco de Andrade Junior que me abriu o laboratório para desenvolver meu TCC e sempre me apoiou e me fez acreditar que eu tinha potencial.

Agradeço também a Dra. Luciana Regina Meirelles j. Eckman pela orientação durante o mestrado.

Agradeço a Camila Lopes, da Unidade Integrada de Tecnologia da Informação e Comunicação (UITIC) do IAL, que muito me ajudou no anfiteatro.

À grande amiga Amanda Danielle Brandão da Silva, pelas palavras e apoio incondicional.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Dra. Solange Maria Gennari, e ao professor Dr. João Luis Garcia do Centro de Ciências Agrárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina/Paraná, pelos oocistos de *T. gondii* usados nos experimentos.

Aos integrantes da banca de qualificação, professores Pedro Luiz da Silva Pinto, Pedro Paulo Chieffi e Expedito José de Albuquerque Luna pelas sugestões de melhorias para este trabalho.

Enfim, muita gratidão a todos que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho.

"A descoberta consiste em ver o que todos vêram e em pensar no que ninguém pensou"

A. Szent-Gyorgyi

RESUMO

Marciano MAM. Pesquisa de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii* e *Cyclospora cayetanensis* em água para consumo humano. [tese]. São Paulo:, Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2019.

Segundo normas do Ministério da Saúde, toda água destinada ao consumo humano, distribuída coletivamente por meio de sistema ou solução alternativa de abastecimento, deve ser objeto de controle e vigilância. O monitoramento adequado, aliado a técnicas capazes de detectar as diferentes espécies de microrganismos fornece informações importantes sobre a fonte de infecção durante surtos epidêmicos. Estas informações contribuem para as ações de manejo e adequada tomada de decisões de gestores em saúde pública. O presente estudo teve como objetivo padronizar e implantar metodologias microscópicas e moleculares de detecção de *Giardia* spp, *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii* e *Cyclospora cayetanensis* em águas destinadas ao consumo humano. Estes protozoários são considerados os mais prevalentes em surtos epidêmicos de veiculação hídrica, entretanto, o estudo e monitoramento dos mesmos são dificultados por condições intrínsecas das amostras de água. Foram padronizadas as determinações de protozoários em água para consumo humano pela avaliação dos métodos microscópicos e moleculares. Para as padronizações foram utilizados protozoários provenientes de fezes humanas (*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.), felinas (*T. gondii*) e DNA de *C. cayetanensis*. A seguir foi padronizado cada passo da PCR convencional (cPCR) e da PCR em tempo real (qPCR) (extração de DNA, iniciadores moleculares e reação de amplificação). Visando aumentar a sensibilidade, especificidade e diminuir o risco de contaminação após a amplificação do DNA foram padronizadas duas semi-nested PCR em tubo único, para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Os resultados mostraram que os protocolos de extração e amplificação adotados foram eficientes para a detecção

desses patógenos, em amostras de água para consumo humano e podem ser aplicadas na rotina laboratorial, no atendimento de surtos epidêmicos.

Descritores: Protozoários. Biologia molecular. Água. Surto de doenças. Vigilância sanitária. Microscopia.

ABSTRACT

Marciano MAM. Research for *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in drinking water. [tese]. São Paulo:, Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2019.

According to Ministry of Health rules, all water intended for human consumption, distributed collectively through a system or alternative supply solution, must be subject to control and surveillance. Proper monitoring and techniques capable of detecting different species of microorganisms provide important information on the source of infection during outbreaks. This information contributes to the management actions and proper decision making of public health managers. This study aimed to standardize and implement microscopic and molecular methodologies for detection of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in waters intended for human consumption. These protozoans are the most prevalent in water transmission and the most related to epidemic outbreaks. However, the study and monitoring of these parasites are hampered by intrinsic conditions of water samples. The determinations of protozoa in drinking water were standardized by the evaluation of microscopic and molecular methods. For standardization, protozoa from human feces (*Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp.), felines (*T. gondii*) and *C. cayetanensis* DNA were used. Next, each step of conventional PCR (cPCR) and real-time PCR (qPCR) (DNA extraction, molecular primers and amplification reaction) was standardized. Aiming to increase the sensitivity, specificity and reduce the risk of contamination after DNA amplification, two single-nested PCR in a single tube were standardized for *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. The results showed that the extraction and amplification protocols adopted were efficient for the detection of these

pathogens in samples of water for human consumption and can be applied in the laboratory routine to attend epidemic outbreaks.

Descriptors: Protozoa, Molecular biology, Water, Outbreaks, Sanitary surveillance. Microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo de vida <i>Giardia</i> spp. Fonte: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (CDC - http://www.cdc.gov).....	31
Figura 2 - Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp. Fonte: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (CDC - http://www.cdc.gov).....	34
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>T. gondii</i> e formas de transmissão da toxoplasmose humana e animal.....	37
Figura 4 - Ciclo de vida <i>Cyclospora cayetanensis</i> . Fonte: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (CDC - http://www.cdc.gov).....	39
Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de funcionamento do corante PMA. Fonte: Adaptado de PMA™ dye Product Information.....	44
Figura 6 - Esquema da semi-nested PCR em tubo único para detecção de <i>Giardia</i> spp. evidenciando as quantidades e disposições dos iniciadores moleculares na reação.	56
Figura 7 - Esquema da semi-nested PCR em tubo único para <i>Cryptosporidium</i> spp. evidenciando as quantidades e disposições dos iniciadores moleculares na reação.	58
Figura 8 - Esquema da diluição seriada da solução contendo oocistos de <i>T. gondii</i> para quantificação pela qPCR, partindo de uma concentração de 106 oocistos por mL.....	63
Figura 9 - Esquema representativo da fotoativação das amostras contendo oocistos antes e após o aquecimento, tratadas com PMA sob cama de gelo e incidência de luz por lâmpada alógena de 500 W.....	64
Figura 10 - Distribuição geográfica dos surtos atendidos entre os anos de 2017 a 2019 para os respectivos protozoários envolvidos nos surtos epidêmicos, destacando os acometimentos no estado de São Paulo.....	69

Figura 11 - Distribuição no número de surtos com suspeita dos protozoários decorrentes de achados clínicos., totalizando 33 surtos de veiculação hídrica.	69
Figura 12 - Discriminação do número de amostras ensaiadas pelos diferentes tipos de água, na pesquisa dos protozoários patogênicos de veiculação hídrica.	70
Figura 13 - Distribuição da origem das amostras envolvidas em surto epidêmico, coletadas em diferentes pontos da cidade de Cascavel/PR.	71
Figura 14 - (A) cistos de <i>Giardia</i> spp. após a coloração com Lugol (aumento de 400 vezes); (B) oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. após coloração por DAPI (aumento de 1000 vezes).	73
Figura 15 - Comparação da morfologia dos cistos de <i>Giardia</i> spp. antes e após tratamento com miçangas plásticas e agitação. (A) cistos com membranas preservadas antes do tratamento, (B) cistos com membranas disformes após tratamento, e (C) detalhe da membrana disformes após tratamento, e (C) detalhe da membrana disforme. A e B, aumento de 400 vezes; e C, de 100 vezes.	76
Figura 16 - Produto amplificado de 149 pb na semi-nested PCR em tubo único para <i>Giardia</i> spp. em gel de agarose 2%.	77
Figura 17 - Produto amplificado de 531 pb na semi-nested PCR em tubo único para <i>Cryptosporidium</i> spp. em gel de agarose 2% com uso do conjunto de iniciadores moleculares CryIAL1(F)/ CryIAL 2(F) / CryIAL3(R).	78
Figura 18 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos do fragmento amplificado de <i>Cryptosporidium</i> spp. com diferentes sequências disponíveis no GenBank. Clustal W do BioEdit versão 7.0.9 (1997-2007, Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA).	79
Figura 19 - Oocistos de <i>T. gondii</i> após coloração por DAPI, evidenciando dois esporocistos em seu interior (aumento de 400 vezes).	81
Figura 20 - Curva padrão de oocistos de <i>T. gondii</i> utilizando o conjunto de iniciadores REP529 (A) e Gene B1 (B) com sondas de hidrólise marcadas com FAM. Os valores apresentados são do limiar do ciclo médio obtidos a partir dos resultados em triplicata de cada	

concentração de DNA. As análises foram feitas em diluições seriadas de 10 vezes de DNA extraído de oocistos, na concentração inicial de 50 ng/μl (1 x 10⁶ oocistos). R² = 0,9923. 82

Figura 21 - Imagens microscópicas, em campo claro, evidenciando oocisto purificado com membrana intacta após incubação a 25 ° C por 30 minutos (A); e oocisto após incubação a 100 ° C por 30 minutos com membrana danificada (B). Ampliação: 400 vezes. 83

Figura 22 - Imagens microscópicas, em campo claro, evidenciando oocisto purificado com membrana intacta após incubação a 25 °C por 30 minutos, sem a coloração pelo azul de tripano 0,4% (A); e oocisto após incubação a 100 °C por 30 minutos com membrana danificada corado com azul de tripano 0,4% (B). Ampliação: 400 vezes. 84

Figura 23 - Imagens microscópicas, em campo claro, evidenciando oocisto purificado com membrana intacta após incubação a 25 °C por 30 minutos, com a coloração com o vermelho neutro (A); e oocisto após incubação a 100 °C por 30 minutos com membrana danificada não corado com o vermelho neutro (B). Ampliação: 400 vezes. 84

Figura 24 - qPCR para detecção de oocistos de *T. gondii* utilizando o REP-529 com sonda de hidrólise marcada com FAM. Os resultados representam o número de oocistos (em Log10) (incubados a 25 °C ou a 100 °C) não tratados (barras brancas); e tratado com PMA (barras brancas); e tratado com PMA (barras cinzas). 86

Figura 25 - qPCR para detecção de oocistos de *T. gondii* utilizando o REP-529 com sonda de hidrólise marcada com FAM. Os resultados representam o número de oocistos (em Log10) e diluídos serialmente, tratados (barras cinzas) e não tratados (barras brancas) com PMA. 86

Figura 26 - Produto amplificado de 531 pb na semi-nested PCR em tubo único para *Cryptosporidium* spp. em gel de agarose 2%. (1) 1000 cistos/oocistos em galão; (2) 100 cistos/oocistos em galão; (3) 10 cistos/oocistos em galão; (4) 1000 cistos e oocistos em garrafa; (5) 100 cistos e oocistos em garrafa; (6) 10 cistos/oocistos em garrafa; (7) lavagem galões; (8) lavagem garrafas; (9 e 10) lavagem do sistema de filtração antes e após autoclavagem; (11) água destilada. 88

Figura 27 - Produto amplificado de 149 pb na semi-nested PCR em tubo único para <i>Giardia</i> spp. em gel de agarose 2%. (1) 1000 cistos/oocistos em galão; (2) 100 cistos/oocistos em galão; (3) 10 cistos/oocistos em galão; (4) 1000 cistos/oocistos em garrafa; (5) 100 cistos/oocistos em garrafa; (6) 10 cistos/oocistos em garrafa; (7) lavagem galões; (8) lavagem garrafas; (9 e 10) lavagem do sistema de filtração antes e após autoclavagem; (11) água destilada.	88
Figura 28 - Produto amplificado de 115 pb na cPCR em gel de agarose 2%. (1) 1000 cistos/oocistos em galão; (2) 100 cistos/oocistos em galão; (3) 10 cistos/oocistos em galão; (4) 1000 cistos/oocistos em garrafa; (5) 100 cistos/oocistos em garrafa; (6) 10 cistos e oocistos em garrafa; (7) lavagem galões; (8) lavagem garrafas; (9 e 10) lavagem do sistema de filtração antes e após autoclavagem; (11) água destilada.	89
Figura 29 - Fluxograma de recepção, filtração e extração de DNA para amostras de água envolvidas em surtos epidêmicos com suspeita de contaminação por protozoários.	90
Figura 30 - Total de surtos epidêmicos atendidos no período de 2017 a 2019 e resultado (positivo/negativo) na detecção dos protozoários <i>Giardia</i> spp. <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>T. gondii</i> nas amostras analisadas, onde a barra azul representa as amostras negativas e a barra laranja representa as amostras positivas.	91
Figura 31 - Distribuição da positividade dos protozoários investigados em amostras de água envolvidas em surtos epidêmicos, representado em números e porcentagem.	91
Figura 32 - Número de amostras positivas e negativas no total de amostras ensaiadas por protozoários, onde a barra azul representa as amostras negativas e a barra laranja representa as amostras positivas.	92
Figura 33 - Gráfico apresentando a positividade de amostras de água ensaiadas para pesquisa de protozoários relacionadas ao surto epidêmico da cidade de Cascavel/PR.	68
Figura 34 - Resultado microscópico da pesquisa de oocistos de <i>C. cayetanensis</i> corados com fucsina (técnica de kynion) em amostras de água do surto de Cascavel/PR.	94

Figura 35 - Resultados da detecção de protozoários nas diferentes origens de amostras, coletadas no município de Cascavel/PR, onde a barra azul representa as amostras negativas e a barra laranja representa as amostras positivas..... 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos iniciadores moleculares para cPCR utilizados neste estudo.....	53
Tabela 2 - Descrição dos iniciadores moleculares para qPCR utilizados neste estudo.....	54
Tabela 3 - Programa de amplificação da semi-nested PCR em tubo único para <i>Giardia</i> spp., com as respectivas temperaturas do 1º e do 2º ciclos.	57
Tabela 4 - Programa de amplificação da semi-nested PCR em tubo único para <i>Cryptosporidium</i> spp.....	58
Tabela 5 - qPCR para diferenciação de <i>C. parvum</i> e <i>C. hominis</i>	59
Tabela 6 - Quantidade de cistos/oocistos inoculados experimentalmente em amostras de água acondicionadas em galões e garrafas plásticas.....	74
Tabela 7 - Comparação dos resultados das PCRs após aplicação de diferentes protocolos de extração de DNA, para os protozoários <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.....	75
Tabela 8 - Resultado da cPCR utilizando diferentes marcadores moleculares para detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	79
Tabela 9 - Conjunto de sondas para detecção e diferenciação de gênero e das duas espécies de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	80
Tabela 10 - Diluição do padrão de oocistos para obtenção de inóculo.	81
Tabela 11 - Resultados das análises microscópicas e moleculares das amostras de água do surto de Cascavel/PR, ensaiadas para pesquisa de protozoários de veiculação hídrica.	97
Tabela 12 - <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. em amostras de água coletadas em diferentes estações do ano.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(F)	<i>forward</i>
(R)	<i>reverse</i>
ASL	Stool Lysis Buffer
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEMEI	Centro Municipal de Educação Infantil
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
cPCR	reação de PCR convencional
CT	(do inglês <i>Threshold cycle</i>) número de ciclos
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride, Sigma Chemicals®
dATP	trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	desoxicitidina trifosfato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
dTTP	Trifosfato de timidina
DNA	(do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>) ácido desoxirribonucleico
DO	densidade ótica
DTA	doenças transmitidas por alimentos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPI's	equipamentos de proteção individual
FAM	amidita de fluoresceína
g	força centrífuga
GVE	grupo de vigilância epidemiológica
GVS	grupo de vigilância sanitária

HCL	ácido clorídrico
HIV	(do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>) Vírus da imunodeficiência humana
ICZN	Código Internacional de Nomenclatura Zoológica
IAL	Instituto Adolfo Lutz
KCl	cloreto de potássio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MS	Ministério da Saúde
N/D	não detectado
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
pb	pares de bases
PCR	(do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>) reação em cadeia pela polimerase
PMA	propídio monoazida
PK	Proteinase K
qPCR	PCR em tempo real
SAC	solução alternativa coletiva
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TE	tampão de eluição
TM	(do inglês <i>Trademark symbol</i>) símbolo da marca
USEPA	(do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>) Agência de Proteção Ambiental Americana
VMP	valores máximos permitidos

LISTA DE SÍMBOLOS OU FÓRMULAS

%	porcentagem
®	marca registrada
µm	micras
cm ²	centímetro quadrado
g	gramas
mL	mililitro
ng	nanogramas
nm	nanômetros
β	beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
1.1 Aspectos gerais.....	26
1.2 Protozoários em água.....	28
1.3 <i>Giardia</i> spp.....	29
1.4 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	32
1.5 <i>Toxoplasma gondii</i>	34
1.6 <i>Cyclospora cayetanensis</i>	38
1.7 Métodos de isolamento e identificação de protozoários.....	40
1.8 Pesquisa molecular de protozoários em água.....	42
1.9 Estudo da viabilidade de oocistos de <i>T. gondii</i>	43
1.10 JUSTIFICATIVA.....	45
2. OBJETIVO GERAL.....	47
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1. <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp.....	48
3.1.1 Obtenção e purificação de cistos/oocistos (<i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp).....	48
3.1.2 Quantificação de cistos/oocistos (<i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp.)....	49
3.1.3 Extração de DNA.....	49
3.1.3.1 Kit fezes QIAamp DNA Stool – Qiagen.....	50
3.1.3.2 Rompimento mecânico com uso de miçangas.....	50
3.1.3.3 Fervura.....	51
3.1.3.4 Concentrações de Proteinase K.....	51

3.1.4 cPCR.....	52
3.1.4.1 <i>Giardia</i> spp.....	55
3.1.4.2 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	56
3.1.4.2.1 qPCR para diferenciar <i>C. parvum</i> e <i>C. hominis</i>	58
3.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	59
3.2.1 Obtenção e purificação de oocistos.....	59
3.2.2 Extração de DNA.....	60
3.2.3 PCR.....	61
3.2.3.1 cPCR.....	61
3.2.3.2 qPCR.....	61
3.2.4 Curva padrão de oocistos de <i>T. gondii</i>	62
3.2.5 Avaliação da viabilidade de oocistos de <i>T. gondii</i> por microscopia e análise molecular.....	63
3.2.5.1. Corantes vitais.....	63
3.2.5.2 Tratamento com (propídio monoazida) PMA™ - intercalante celular.....	64
3.3 Contaminação experimental dos recipientes e filtração de amostras de água.....	65
3.4 Recuperação dos protozoários.....	66
3.5 <i>Cyclospora cayetanensis</i>	66
3.5.1 Obtenção de DNA.....	66
3.5.2 qPCR.....	67
3.6 Aplicação das metodologias para determinação de protozoários em amostras de surtos epidêmicos.....	67
3.6.1 Pesquisa de protozoários patogênicos em surto de veiculação hídrica do município de Cascavel/PR.....	70
3.7 Pesquisa de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de água de escolas rurais do município de Itatiba/SP.....	71
3.8 Análise dos dados.....	72
3.9 Aspectos de biossegurança.....	72
4. RESULTADOS.....	73

4.1	Obtenção de cistos de <i>Giardia</i> spp. e e oocistos <i>Cryptosporidium</i> spp. para contaminação das amostras.....	73
4.1.1	Concentrações de DNA.....	74
4.1.2	cPCR.....	76
4.1.2.1	<i>Giardia</i> spp.....	76
4.1.2.2	<i>Cryptosporidium</i> spp.....	77
4.1.2.3	qPCR para diferenciar de <i>C. parvum</i> e <i>C. hominis</i>	80
4.2	<i>T. gondii</i> : obtenção, purificação e quantificação de oocistos.....	80
4.2.1	qPCR.....	82
4.2.2	Investigação da viabilidade de oocistos de <i>T. gondii</i> por microscopia.....	83
4.2.3	Investigação da viabilidade de oocistos de <i>T. gondii</i> por PMA.....	85
4.3	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	87
4.4	Contaminação experimental e recuperação dos protozoários.....	87
4.5	Aplicação das metodologias para determinação de protozoários em amostras de surtos epidêmicos.....	89
4.5.1	Pesquisa de protozoários patogênicos em surto de veiculação hídrica do município de Cascavel/PR.....	93
4.6	Monitoramento de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de água de escolas rurais do município de Itatiba/SP.....	98
5	DISCUSSÃO.....	100
6	CONCLUSÕES.....	113
	REFERENCIAS.....	116
	ANEXOS.....	130

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

Fornecer acesso universal à água potável é um dos maiores desafios de desenvolvimento com que a comunidade internacional se depara no início do século XXI¹. Há décadas os serviços de saúde têm dedicado uma atenção especial à qualidade das águas destinadas ao consumo humano, tendo desenvolvido e aplicado conceitos de vigilância sanitária com vistas às ações conjuntas dos órgãos competentes na avaliação da qualidade da água e à prevenção de riscos para a Saúde Pública.

As doenças de veiculação hídrica, sobretudo aquelas causadas por protozoários intestinais, emergiram como um dos principais problemas de Saúde Pública, causando mais de 2,2 milhões de mortes por ano^{2,3}, incluindo acometimentos como diarreia e doenças gastrointestinais, principalmente em crianças menores de 5 anos de idade⁴. O aprimoramento da qualidade da água e das condições de saneamento e higiene pode impedir a morte de mais de dois milhões de crianças anualmente⁵.

No Brasil, diversos fatores contribuem para a alta prevalência dessas parasitoses, tais como o saneamento básico precário, carência da efetividade das ações de vigilância sanitária entre outros fatores culturais como hábitos de higiene e alimentares. Entre os protozoários veiculados por água, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii* e *Cyclospora cayetanensis* são considerados os de maior importância e ocorrência clínica. Segundo o inciso CXXXIII, do Artigo 864 da Portaria de Consolidação nº5 de 28/10/2017 do Ministério da Saúde (MS)⁶, toda água destinada ao consumo humano, distribuída coletivamente por meio de sistema ou solução alternativa de abastecimento, deve ser objeto de controle e vigilância para avaliar a sua qualidade.

De acordo com a portaria supracitada, a água destinada ao consumo humano deve estar em conformidade com os valores máximos permitidos (VMP) para cada parâmetro de qualidade estabelecido. Por sua vez, o artigo quinto da mesma Portaria define água potável como “água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça risco à saúde” ⁶ .

As fontes de água doce utilizadas pelo homem, na forma de poços, rios, riachos e lagos, sofrem um contínuo e crescente processo de degradação em função do despejo de esgotos, fezes de animais (silvestres e de produção), além dos efluentes resultantes das atividades industriais⁷, promovendo a contaminação das águas de abastecimento público⁸. Dentre as diversas formas de contaminação das águas, alguns autores relatam a participação de moscas, especialmente coprófagas, na disseminação mecânica de protozoários, transportando-os para os corpos d'água em seu exoesqueleto e no trato digestivo^{9,10}.

A capacidade de fornecer água potável é bastante limitada em alguns países devido aos custos envolvidos na construção de represas, no tratamento adequado da água e na implantação de sistemas de abastecimento eficientes. Neste sentido, a população das áreas urbanas é beneficiada com uma maior efetividade da oferta de água tratada em relação aos moradores das áreas rurais, onde as pessoas dependem de fontes naturais de água, como a água da chuva, rios, lagos, dentre outras, que podem estar contaminadas com microrganismos, dentre eles, os parasitos¹¹.

A qualidade dos recursos hídricos deve ser motivo de preocupação de todas as esferas (governos, indústria e consumidores), fazendo-se assegurar que os estoques de água sejam seguros, de boa qualidade, disponíveis em quantidades adequadas e principalmente para salvaguardar a saúde de toda sociedade¹².

1.2 Protozoários em água

A água pode atuar como uma eficiente fonte veiculadora de patógenos em razão da sua grande capacidade de dispersão, do seu uso abrangente e por ser de consumo fundamental para a manutenção da vida. Nos corpos d'água são encontrados microrganismos dentre eles vírus, algas, protozoários, helmintos e bactérias sendo que alguns são patogênicos¹³⁻¹⁵.

Os protozoários transmitidos pela água afetam as populações, principalmente nos surtos. Nos últimos anos, diferentes fatores foram relacionados ao surgimento e disseminação de patógenos emergentes, como aumento da contaminação de água potável e alimentos (DTA); aumento de pessoas suscetíveis; e globalização^{16,17}. Além disso, a alta morbidade e mortalidade das populações causadas por esses fatores têm sido relevantes nos últimos anos, por causarem importantes perdas econômicas. Assim, essa condição deve ser controlada pela investigação das causas e melhoria da qualidade e segurança da água potável, com vistas a saúde coletiva^{18,19}.

As doenças de transmissão hídrica (principalmente as diarreicas) constituem uma das mais graves ameaças para a saúde da população infantil, particularmente na América Latina e Caribe. Este grupo de doenças encontra-se entre as cinco causas principais de óbito nos indivíduos de um a cinco anos de idade²⁰. Cabe ressaltar que o amplo espectro de hospedeiros juntamente com o elevado número de (oo)cistos eliminados durante o curso clínico das parasitoses²¹, asseguram o alto nível de contaminação ambiental favorecendo as chances de que a transmissão hídrica ocorra.

Sabe-se que os processos convencionais de tratamento da água não são totalmente eficientes para certos parasitos, como os protozoários deste estudo, que possuem (oo)cistos resistentes aos processos de cloração, aumento de temperatura e outras condições adversas ambientais, permanecendo viáveis por muito tempo no ambiente²²⁻²⁴.

Segundo Karanis *et al.*²⁵, nos últimos anos foram descritos 325 surtos de veiculação hídrica causados por protozoários nos EUA; na Europa ocorreram 277 surtos, em 16 países, associados com água de consumo humano e águas de recreação, sendo que *Cryptosporidium* e *Giardia* contabilizaram a maioria dos eventos epidêmicos, gerando um grande impacto ao saneamento, e, consequentes agravos à saúde pública.

Devido à relevância destas parasitoses para a saúde pública, em 2004 a criptosporidiose e a giardiose foram incluídas na lista “Iniciativa das Doenças Negligenciadas”, da Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), implicadas como fatores que restringem o desenvolvimento e a melhoria socioeconômica de diversos países²⁶.

1.3 *Giardia* spp.

Mundialmente, é o parasito intestinal mais comumente identificado nos exames fecais, parasitando humanos, mas também outros mamíferos, pássaros, répteis e anfíbios. *Giardia* spp. é um dos protozoários mais comuns e conhecidos cientificamente, principalmente por causar episódios de diarreias. Atualmente, seis espécies de *Giardia* spp. estão descritas e aceitas pela comunidade científica, classificadas pela morfologia dos trofozoítos e / ou cistos, incluindo *Giardia agilis* em anfíbios, *Giardia ardeae* e *Giardia psittaci* em pássaros, *Giardia microti* e *Giardia muris* em roedores e *Giardia duodenalis* (sinonímia: *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*) em mamíferos²⁷. Em relação à surtos epidêmicos no Brasil, a literatura relata episódios isolados, principalmente em ambientes fechados, como instituições de ensino e ambientes familiares.

É um protozoário flagelado e binucleado do filo Sarcomastigophora, ordem Diplomonadida, descrito por Antony Van Leeuwenhoek há mais de 300 anos²⁸. É um patógeno cosmopolita e causador de gastroenterite no ser humano bem como nos animais domésticos, ocasionando um espectro clínico diverso, desde infecção

assintomática até quadros severos de diarreia persistente^{29,30}. As infecções por *Giardia* em humanos são causadas principalmente pelos subtipos A e B³¹ que apresentam fatores de virulência diferentes.

Giardia possui dois estágios em seu ciclo de vida, a fase reprodutiva, trofozoitos, e a fase resistente, os cistos. O cisto é ovoide e mede, em média, 9-12 µm de comprimento e é liberado nas fezes. A dose infectante para *Giardia* está entre 10 e 100 cistos e o período de incubação em humanos é de 1 a 2 semanas, logo após surgem sintomas como náuseas, vômitos, diarreia, flatulência, cólicas abdominais, mal-estar, esteatorréia (fezes gordurosas) e perda de peso. Os sintomas podem ocorrer e persistir durante 2-4 semanas³². É comum que cerca de 60% dos indivíduos infectados sejam assintomáticos ou apresentem sintomas inespecíficos³³⁻³⁵. Entretanto, alguns indivíduos apresentam a forma crônica da parasitose, com perda de peso e má absorção de nutrientes (carboidratos, lipídios, açúcares e vitaminas). As crianças são as mais afetadas, pois a infecção crônica é uma importante causa de *déficit* do desenvolvimento físico e cognitivo^{29,36}.

Giardia spp. apresenta potencial de risco à saúde pública, pois seus cistos são resistentes ao cloro, embora sejam menos resistentes que *Cryptosporidium* spp., sendo ambos mais resistentes que as bactérias, sobrevivendo aos níveis rotineiramente utilizados para o tratamento da água³⁵.

A taxonomia do gênero ainda é controversa, pois é difícil a distinção entre as espécies por compartilharem características morfológicas comuns, porém, estudos moleculares mostraram que existem pelo menos sete genótipos hospedeiro-específicos, dentre os quais somente sub-genótipos dos grupos A e B foram encontrados em humanos e animais^{26,37,38}.

A aquisição desta protozoose ocorre pela via fecal-oral, por meio do contato direto com fezes contendo cistos, mediante a ingestão de água ou alimentos contaminados, ou pelo contato pessoa-a-pessoa (comum em ambientes de creches,

escolas maternas e berçários) ou indiretamente, por contato com objetos ou superfícies contaminadas (Figura 1)^{38,39}.

O primeiro surto documentado de giardíase ocorreu em Aspen, Colorado, EUA, em 1965 / 1966, e o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC)⁹² iniciou a vigilância da água a partir de 1971. Entre 1979 e 1988, *Giardia* foi o organismo mais implicado em surtos de veiculação hídrica nos EUA³³.

Figura 1- Ciclo de vida *Giardia* spp. Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention*⁹².

1.4 *Cryptosporidium* spp.

Até recentemente, *Cryptosporidium* spp. era classificado como um parasito coccídeo³⁸, no entanto, após considerações sobre um provável “elo perdido” com as gregarinas primitivas, foi reclassificado. Dados microscópicos, moleculares, e bioquímicos indicaram que *Cryptosporidium* spp. se difere de outros apicomplexos, pois perdeu o apicoplasto (como os colpodelídeos e outras gregarinas)⁴⁰, e apresentou alterações genômicas⁴¹⁻⁴³. Estes fatos serviram de base para a transferência formal de *Cryptosporidium* da subclasse Coccidia, classe Coccidiomorpha para uma nova subclasse, Cryptogregarina, dentro da classe Gregarinomorpha⁴⁴.

Atualmente, o gênero *Cryptosporidium* é o único membro da subclasse cryptogregarina descrito como compreendendo parasitos epicelulares de vertebrados que possuem uma organela alimentadora do tipo gregarina, mas sem apicoplastos⁴⁴. A reclassificação do *Cryptosporidium* spp. está regulamentada de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN).

Numerosos vertebrados, tais como mamíferos, aves, reptéis, peixes e anfíbios, são seus hospedeiros. Atualmente, estão descritas 31 espécies, porém nem todas são reconhecidas como patogênicas para humanos, sendo *C. parvum* e *C. hominis* as mais relatadas em surtos epidêmicos. Dentre as relacionadas a acometimentos em humanos, 20 espécies já tiveram seus genótipos identificados em amostras clínicas. Além disso, foram descritos mais de 40 genótipos em outros hospedeiros vertebrados^{45,46}. Segundo Xiao⁴⁷, em alguns países, *Cryptosporidium meleagridis*, comum em aves, é tão prevalente em humanos quanto *Cryptosporidium parvum*.

Outras espécies de *Cryptosporidium* foram isoladas em amostras clínicas de pacientes imunocomprometidos como *C. canis*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. suis*.⁴⁸ *C. hominis* é a espécie mais comum na América do Norte, América do Sul, Austrália e África, enquanto que *C. parvum* é o mais prevalente na Europa⁴⁷.

A criptosporidiose se caracteriza por provocar, nos pacientes acometidos, quadros de diarreia de severidade diversa, podendo causar morbidades em seus hospedeiros, principalmente em indivíduos imunocomprometidos⁴⁹.

Dentre as diversas formas de transmissão da criptosporidiose, deve-se levar em consideração a dispersão dos oocistos por aerossol em ambientes fechados e a veiculação por água e alimentos contaminados⁵⁰, sendo o mecanismo de transmissão influenciado pelo nível de contaminação ambiental, sobrevivência do oocisto às condições do meio⁵¹, e resistência do oocisto aos tratamentos convencionais da água⁵², seja a cloração, a ozonização ou a incompleta remoção dos oocistos pelos métodos de filtração.

Cryptosporidium spp. possui diversas formas dependendo da fase do ciclo biológico. Os oocistos, formas de resistência, são esféricos ou elípticos, com parede lisa e dupla, e medem de 3,0 a 8,5 µm de diâmetro, e sua remoção por filtração se torna muito difícil devido à sua capacidade de compressibilidade, os quais durante a etapa de filtração, passam a se comportar como partículas de 2,0 a 4,0 µm^{53,54}. Acredita-se que a dose infectante desse protozoário seja baixa, como demonstra a literatura, onde em um isolado de *C. parvum*, por exemplo, a dose de 10 oocistos foi suficiente para causar infecção²³.

Algumas características do ciclo de vida de *Cryptosporidium* aumentam a possibilidade da sua transmissão pela água, pois são monóxenos, ou seja, completam seu ciclo de vida dentro de um único hospedeiro, que excreta uma quantidade elevada de estágios infectantes nas fezes (Figura 2). Além disso, pode ocorrer a transmissão zoonótica, sendo os reservatórios potenciais para infecção favorecendo a contaminação ambiental, os oocistos infectantes são resistentes no meio ambiente e muito pequenos, resistentes à maioria dos desinfetantes utilizados na indústria.

Cryptosporidium emergiu como uma ameaça nos anos 80, particularmente nos EUA e no Reino Unido. Este protozoário parasito causou o maior surto de gastroenterite

ocorrido num país desenvolvido, em Milwaukee, Wisconsin, EUA, em 1993 onde 403.000 pessoas foram atingidas³⁷.

Figura 2 - Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention⁹².

1.5 *Toxoplasma gondii*

A importância da toxoplasmose está associada ao fato de ser uma infecção cosmopolita altamente difundida. Afeta cerca de um terço da população mundial, sendo descritas prevalências de 15% a 85%. Os índices variam entre as diferentes populações de acordo com o nível sócio econômico, áreas geográficas, fatores climáticos, hábitos culturais e idade. Dentre os acometidos pela toxoplasmose, ressalta-se fetos e crianças, constituindo uma infecção oportunista que se manifesta com gravidade sempre que o indivíduo venha a sofrer imunodeficiência⁵⁵⁻⁵⁸. Medidas de prevenção como educação

sanitária e hábitos básicos de higiene, como lavar muito bem frutas e verduras, ingerir água filtrada, não ingerir carne crua ou mal cozida, são condutas fundamentais no controle dessa zoonose⁵⁹.

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório e infecta uma ampla gama de vertebrados de sangue quente (mamíferos e aves) como hospedeiros intermediários, nos quais o ciclo assexuado é realizado, com formação de cistos teciduais nas células. Os felinos são os hospedeiros definitivos do protozoário, cujo ciclo sexual culmina com a produção de oocistos eliminados nas fezes contaminando o meio ambiente⁶⁰⁻⁶².

Em crianças, a prevalência é relativamente baixa, aumentando de acordo com a idade, devido à exposição a fatores de risco durante a vida⁵⁸. Entretanto, em algumas áreas brasileiras, observou-se que 60% das crianças entre seis a oito anos possuíam anticorpos anti-*T. gondii* relacionados à ingestão de oocistos em ambiente altamente contaminado^{63,64}. Estes dados corroboram com estudos na América Central e do Sul, onde a alta prevalência de infecção por *T. gondii* é devido aos elevados níveis de contaminação ambiental⁶⁴.

Os gatos domésticos são a principal fonte de contaminação devido à ampla distribuição da espécie e grande liberação de oocistos. A disseminação ambiental do agente é possível, uma vez que um gato pode excretar milhões de oocistos após ingerir no mínimo um bradizoíto, ou um cisto tecidual^{55,65,66}.

A importância epidemiológica dos oocistos é constatada pelo fato de que apesar da ampla distribuição de *T. gondii* na maior parte do mundo, as infecções por esse parasito são virtualmente ausentes em ilhotas e atóis que nunca foram habitados por gatos, como observado por Wallace em 1969⁵⁸.

T. gondii apresenta uma morfologia múltipla, dependendo do hábitat e do estado evolutivo. As principais formas infectantes que o parasito apresenta durante o ciclo evolutivo são: taquizoítos, bradizoítos e oocistos. As três formas apresentam organelas citoplasmáticas características do Filo Apicomplexa, que constituem o complexo apical

formado por conóide, anel polar, microtúbulos sub-películas, roptrias, micronemas e grânulos densos ⁶⁷.

Os taquizoítos (tachos= rápido em grego) assim conhecidos por sua forma livre e proliferativa multiplicam-se rapidamente em células nucleadas dos hospedeiros intermediários e definitivos durante a fase aguda da infecção (Figura 3)⁶⁸. Esta forma é encontrada na maioria das células, tecidos e líquidos biológicos do hospedeiro. Os bradizoítos, formas assexuadas e com metabolismo lento, estão localizados dentro do cisto tecidual, especialmente durante a fase crônica da infecção, chegando a permanecer por um longo período nos tecidos do hospedeiro. Essa forma apresenta-se com maior frequência no cérebro, na retina e nos músculos esqueléticos e cardíacos⁶⁹.

Os cistos teciduais apresentam tamanho variável podendo atingir 10 a 100 µm, sendo que os cistos jovens são frequentemente pequenos, contendo somente dois bradizoítos em seu interior, enquanto os mais velhos podem conter milhares deles. O tamanho dos cistos também podem variar de acordo com a sua localização, sendo os encontrados no cérebro, geralmente, menores do que os localizados no músculo esquelético⁶⁸.

O oocisto, outra forma evolutiva do parasito, está relacionado ao seu ciclo sexuado enteroepitelial em felinos, sendo liberado pelas fezes deste hospedeiro. Os oocistos apresentam grande resistência ao meio ambiente e, quando esporulado, contêm dois esporocistos com o total de 8 esporozoítos no seu interior que podem permanecer viáveis no solo e contaminar alimentos⁷⁰. A esporulação ocorre fora do hospedeiro, dentro de 1 a 5 dias após a excreção, dependendo da aeração e temperatura^{60,68,62}. Os oocistos esporulados são sub-esféricos a elipsoidais e contêm dois esporocistos elipsoidais. Nesta fase, os oocistos são viáveis por pelo menos um ano, resistindo à temperatura entre 20 °C e 37,5 °C. Eles sobrevivem e permanecem infectados por 12 a 18 meses em condições ambientais ideais, como umidade, temperatura e local de sombreamento. Em condições laboratoriais, oocistos esporulados podem permanecer infectantes a 35 °C por 32 dias, a

40 °C por 9 dias e a 45 °C por 1 dia. Eles sobrevivem em armazenamento a 4 °C por 54 meses e congelados a -10 °C por 106 dias^{71,72}.

As principais rotas de transmissão de *T. gondii* incluem a transplacentária, da mãe ao feto durante a primeira infecção; a ingestão de cistos em tecidos animais infectados; e a ingestão de oocistos presentes na água, no solo ou em alimentos contaminados^{58,73}.

Figura 3 · Ciclo de vida de *T. gondii* e formas de transmissão da toxoplasmose humana e animal.

Apesar da toxoplasmose congênita ser um grave problema de saúde, outras importantes implicações clínicas estão incluídas, como neurológicas, oculares e psiquiátricas, como esquizofrenia e transtorno bipolar⁷⁴⁻⁷⁹.

Os surtos de *T. gondii* são relacionados em diferentes regiões do mundo com água contaminada por oocistos, que podem persistir por longos períodos, sendo altamente resistentes aos diversos processos de inativação química^{4,80-82}.

O maior surto epidêmico de toxoplasmose humana relatado na literatura ocorreu no Brasil, na cidade de Santa Isabel do Ivaí no Estado do Paraná, por veiculação hídrica. A disseminação de oocistos de *T. gondii* ocorreu em uma estação de tratamento de água, sendo que pela primeira vez, oocistos de *T. gondii* foram isolados de amostras de água⁸⁰. No ano de 2018, a cidade de Santa Maria /RS relatou mais de 600 casos de toxoplasmose relacionada ao consumo de água de distribuição municipal, porém os oocistos não foram detectados. A importância da transmissão via oocistos é reforçada por meio de relatos de surtos epidêmicos e infecções em vegetarianos estritos⁸³, descartando a possibilidade de transmissão pelo consumo de carne crua por estes acometidos. Outros estudos também relacionaram surtos de toxoplasmose à contaminação por oocistos em água de consumo nos Estados Unidos e Canadá^{84,85}, sendo que a contaminação ambiental via oocisto é mais restrita a locais com alta concentração de felinos⁸⁶.

1.6 *Cyclospora cayetanensis*

Cyclospora cayetanensis é um protozoário coccídeo unicelular. Sua transmissão ocorre pela via fecal-oral, quando uma pessoa infectada contamina o meio ambiente. Os oocistos esporulam e se tornam infecciosos, podendo contaminar a água, vegetais e outros alimentos^{87,88}. O parasito tem um ciclo de vida intracelular obrigatório dentro do epitélio do trato gastrointestinal, onde ocorre a reprodução tanto assexuada quanto a sexuada^{88,89}.

Indivíduos infectados com *C. cayetanensis* excretam oocistos não esporulados em suas fezes. Esses oocistos levam de 7 a 15 dias para esporular em condições ideais (23 a 27 °C), e se tornam infectantes (Figura 4)⁹⁰. *C. cayetanensis* possui, em média, 7,7 a 9,9 µm de diâmetro. Os oocistos possuem sua parede com duas camadas e um corpo polar. Quando esporulados, oocistos possuem dois esporocistos com dois esporozoítos⁹¹.

Figura 4 - Ciclo de vida *Cyclospora cayetanensis*. Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention*⁹².

C. cayetanensis tem os humanos como únicos hospedeiros conhecidos. O parasito pode causar sintomas que variam significativamente dependendo da idade e condição do hospedeiro. Infecta o intestino delgado e comumente causa diarreia aquosa, perda de apetite, perda de peso, inchaço abdominal e cólicas, aumento da flatulência, náusea, fadiga e febre baixa. Em alguns casos, os pacientes apresentam vômitos, dores musculares, perda substancial de peso e diarreia que pode ser prolongada. O período de incubação é em média de 1 semana, com doença que dura até 6 semanas; infecções assintomáticas, recidivas e sequela pós-resolução crônica podem ocorrer^{89,92,93}.

A representação clínica pode ser diferente em áreas de endemidade, onde as infecções assintomáticas são mais frequentes, podendo ser conferida imunidade às

pessoas em comunidades expostas ao protozoário. A documentação dos surtos demonstram que pessoas de todas as idades podem ser infectadas, no entanto, crianças mais jovens e idosos podem apresentar sintomas clínicos mais graves^{94,95}.

Foram estudados casos clínicos de diarreia na região de Java Oriental na Indonésia, comparando um grupo de residentes estrangeiros com nativos. O estudo mostrou que 13% dos adultos estrangeiros foram acometidos por *C. cayetanensis*, ressaltando a capacidade de migração do protozoário para áreas indenes⁹⁶.

No Brasil, em 1999, ocorreu o surto descrito

1.7 Métodos de isolamento e identificação de protozoários

A análise de protozoários em água traz uma série de desafios científicos e tecnológicos, uma vez que as metodologias reconhecidas internacionalmente são de alta especificidade. Observa-se que a inserção desse tipo de metodologia na rotina de laboratórios certificadores da potabilidade da água ainda é incipiente no Brasil⁹⁷. A detecção desses parasitos em amostras ambientais e em alimentos requer métodos mais complexos, envolvendo concentração e purificação.

A legislação brasileira para monitoramento de águas de superfície, sejam estas potáveis ou de mananciais, destinadas ao consumo humano é a Portaria de Consolidação nº5 de 28/10/2017 do Ministério da Saúde (MS)⁶, que preconiza o método 1623.1 da USEPA (Agencia de Proteção Ambiental Americana) para isolamento e identificação de cistos e oocistos de protozoários. Este método foi desenvolvido para o controle de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. somente, não abrangendo outros protozoários. O método é baseado em estudos de recuperação de cistos e oocistos, necessitando de avaliação continua de seu desempenho. Por se tratar de um método que necessita de equipamentos e insumos de alto custo, os laboratórios que não disporem desta estrutura,

poderão se adequar com alterações necessárias, principalmente para atendimento a surtos epidêmicos. Segundo Weintraub⁹⁸ esta metodologia apresenta limitações como, por exemplo, a recuperação variável dos inóculos, a não avaliação da viabilidade e infectividade dos cistos e oocistos e a não classificação das espécies dos protozoários. No entanto, alguns autores afirmam que mesmo diante dessas restrições, o método 1623.1, é ainda uma técnica adequada para detecção de protozoários em amostras de água, sobretudo se for utilizado juntamente com técnicas de biologia molecular, como a PCR convencional (cPCR) ou a PCR em tempo real (qPCR). Embora tenha uma taxa de recuperação relativamente baixa, a faixa de variação é estável, além de ser uma técnica bastante difundida na literatura, o que possibilita comparação de dados e busca de melhorias que minimizem as dificuldades atribuídas ao método^{13,99}.

Embora tenha um número significativo de estudos sobre a giardiose e criptosporidiose no Brasil, a epidemiologia molecular desses parasitos ainda é pouco explorada. O exame dos (oo)cistos na microscopia óptica é valiosa para o diagnóstico e a determinação da intensidade da infecção, sendo fundamental a avaliação morfométrica e morfológica. Porém, o exame microscópico deve ser complementado pela biologia molecular que permite a classificação da espécie do parasito.

Devido ao fato dos protozoários de veiculação hídrica apresentarem hospedeiros e ciclo de transmissão múltiplos, juntamente com variação genética entre espécies e entre genótipos; é de fundamental importância sua caracterização molecular nos isolados. Esta caracterização é fundamental para o conhecimento da sua origem, avaliando epidemiologicamente de modo a prevenir e controlar surtos em humanos e animais¹⁰⁰.

No Estado de São Paulo, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (Cetesb) fez o monitoramento de mananciais do Estado, com a metodologia da USEPA, e detectou a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em rios utilizados para captação de água destinada ao consumo humano e recreação. Foram analisadas 162 amostras de água para determinação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* entre outros

patógenos. Considerando os 28 mananciais estudados detectou-se a ocorrência de *Giardia* em 57% e *Cryptosporidium* em 29% dos mananciais¹⁰¹.

Em relação à pesquisa de oocistos de *T. gondii* e *Cyclospora cayetanensis* em água, os dados são escassos na literatura, evidenciando a necessidade de estabelecer metodologia analítica oficial, aplicável no monitoramento da qualidade da água destinada ao consumo humano.

1.8 Pesquisa molecular de protozoários em água

Embora a microscopia e os métodos imunológicos sejam reconhecidos para a detecção de protozoários em amostras clínicas, a recente aplicação de técnicas moleculares, que são altamente sensíveis e específicas, tem possibilitado a caracterização genética e auxiliado na taxonomia e epidemiologia dos protozoários^{102,103}.

Os métodos moleculares têm sido fundamentais para os estudos de genética de populações e tem acumulado avanços importantes, principalmente na disposição de técnicas cada vez mais precisas para o exame de segmentos de DNA¹⁰⁴. Porém as diferentes metodologias empregadas para a pesquisa de protozoários patogênicos em água estão sujeitas a limitações devido aos altos custos e a necessária de importação dos insumos imprescindíveis. Outro fator importante é a necessidade de recursos humanos especializados para sua correta execução¹⁰⁵.

A escolha da metodologia de detecção de protozoários em água deve levar em consideração o propósito da análise, as vantagens e desvantagens de cada metodologia, o tipo de amostra de água e sua qualidade físico-química e microbiológica, assim como a prática desenvolvida pelo laboratório na execução da análise parasitológica, além dos custos implicados¹⁰⁵.

Estudos moleculares têm se tornado imprescindíveis para um melhor esclarecimento da taxonomia e epidemiologia de protozoários de veiculação hídrica, e são amplamente utilizados devido às vantagens de alta sensibilidade, especificidade e velocidade diagnóstica¹⁰⁶.

1.9 Estudo da viabilidade de oocistos de *T. gondii*

Apesar do uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) ter contribuído significativamente para o diagnóstico da toxoplasmose, a complexidade da detecção dos oocistos em amostras de água relacionadas a surtos epidêmicos ainda é um desafio. Neste sentido, os estudos de viabilidade de oocistos se fazem ainda mais complexos, principalmente pela carência de pesquisas relatadas na literatura⁸¹.

A diferenciação de oocistos viáveis de não viáveis em amostras de água não está estabelecida, sendo um estudo relevante para auxiliar na elucidação de surtos epidêmicos, apontando e confirmando prováveis fontes de contaminação.

Em raros estudos de viabilidade de oocistos de *T.gondii* descritos na literatura, o iodeto de propídio foi aplicado como corante vital, com leitura em microscopia de fluorescência, sendo comparado a estudos de viabilidade com outros corantes. O uso dos corantes vitais azul de tripano e vermelho neutro, como marcadores de integridade de membrana, possibilitam verificar a possível viabilidade dos oocistos e apresenta vantagem por permitir a leitura em microscopia de campo claro.

Recentemente, estudos de viabilidade celular tem sido realizados por biologia molecular, com a utilização de corantes intercalantes de ácido nucleico. Dentre eles, o propídio monoazida (PMA) tem sido combinado com a qPCR. Este ensaio baseia-se na integridade da membrana das células, avaliando a permeabilidade do corante. As células com membranas integras não permitem a ligação do PMA com o DNA, diferentemente as

membranas celulares comprometidas que são permeáveis possibilitando que o PMA se ligue ao material genético impedindo sua amplificação durante a qPCR (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de funcionamento do corante PMA. Fonte: <https://www.researchgate.net/figure/Diagram-showing-the-recently-described-Biotium-Hayward-California-USA-procedure> com adaptações.

O PMA uma vez dentro das células com membrana comprometida se intercala entre os ácidos nucleicos e, após a fotoativação se liga ao DNA com a ação do grupo azida, componente do reagente. O complexo formado é insolúvel e estável, impedindo a amplificação do DNA das células mortas ou inviáveis. Consequentemente, o sinal emitido pela sonda marcada da qPCR é reduzido, pois apenas as células que estiverem viáveis e que não se intercalarem com o reagente irão amplificar¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Os estudos de viabilidade de oocistos de *T. gondii* com uso de PMA como intercalante celular são promissores e servirão de base para estudos futuros de outros protozoários.

1.10 JUSTIFICATIVA

A qualidade da água, destinada ao consumo humano, requer estratégias de políticas públicas por parte dos órgãos relacionados à saúde e meio ambiente. Infecções parasitárias, principalmente as de veiculação hídrica, acometem indivíduos no mundo todo, consideradas cosmopolitas.

As fontes de água doce utilizadas pelo homem, na forma de poços, rios, riachos e lagos, sofrem um contínuo e crescente processo de degradação em função do despejo de esgotos, de fezes de animais (silvestres e de produção), além dos efluentes resultantes das atividades industriais.

Dentre os parasitos de veiculação hídrica, os protozoários *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *T. gondii* e *C. cayetanensis* são comumente relacionados a surtos epidêmicos e seu estudo e monitoramento são dificultados pelas condições intrínsecas das amostras de água, que podem apresentar resíduos e partículas que dificultam a pesquisa destes patógenos.

A análise de protozoários em água traz uma série de desafios científicos e tecnológicos, uma vez que as metodologias reconhecidas internacionalmente são de alta especificidade e complexidade. O método 1623.1 proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e preconizado pela Portaria de Consolidação nº5 de 28/10/2017 do Ministério da Saúde (MS) para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em água para consumo humano é reconhecido internacionalmente. Este método inclui etapas de concentração, separação imunomagnética e microscopia de imunofluorescência. Entretanto, para sua implantação e implementação são necessários investimentos econômicos consideráveis, levando em conta o alto custo dos insumos e equipamentos, dificultando seu emprego em laboratórios.

No Brasil, o controle de protozoários por técnicas específicas e sensíveis ainda é pouco difundido, necessitando de maiores estudos de detecção destes organismos. Este fato pode estar relacionado às dificuldades na concentração, visualização e padronização das metodologias.

Durante um surto epidêmico faz-se necessária ação conjunta entre os órgãos de vigilância e o laboratório de saúde pública, com vistas a tomada de decisão e controle imediato da fonte de infecção.

Este estudo visa padronizar e implantar métodos microscópicos e moleculares na pesquisa e monitoramento destes agentes em água para consumo humano, principalmente em amostras relacionadas a surtos epidêmicos, atendendo a legislação para monitoramento da qualidade das águas para consumo humano. E adicionalmente, estudar a viabilidade de oocistos de *T. gondii* como modelo para a implementação e expansão para outros protozoários.

2 OBJETIVO GERAL

Padronizar métodos microscópicos e moleculares (cPCR e/ou qPCR) para detecção de protozoários em água para consumo humano.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar um método de concentração por filtração para isolar cistos e/ou oocistos de protozoários de amostras de água para consumo humano;
- b) Determinar um método de extração de DNA de protozoários em água destinada ao consumo humano;
- c) Padronizar métodos moleculares para detecção de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *T. gondii* em água contaminada;
- d) Avaliar a viabilidade de oocistos de *Toxoplasma gondii* pelo tratamento com corantes vitais e intercalante celular;
- e) Avaliar a detecção de *Cyclospora cayetanensis* em amostras de água por PCR;
- f) Analisar amostras de água envolvidas em surtos epidêmicos, coletadas pelas Vigilâncias Sanitárias de diferentes regiões do Brasil;
- g) Monitorar a presença dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água de solução alternativa em escolas rurais do município de Itatiba/SP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

3.1.1 Obtenção e purificação de cistos/oocistos (*Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp)

Para as padronizações das metodologias propostas foram utilizados oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. isolados de fezes humanas, obtidos de 3 amostras com resultados positivos para ambos os parasitos, pelo método microscópico com coloração de *Kinyoun*. As amostras foram encaminhadas para análise ao Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz e se tratava de investigação de surto epidêmico em instituição de ensino infantil da cidade de Rafard/SP.

Para obtenção de uma suspensão de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., a purificação dos protozoários foi realizada utilizando-se aproximadamente 15 g de cada amostra de fezes. As fezes foram diluídas em 30 mL de água destilada, seguida de filtração em gaze de 13 fios por cm² dobrada em quatro. Cada solução foi centrifugada (3 vezes) a 2.400 g/10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento re-suspenso em solução saturada de sacarose (açúcar comercial - 1.200 g / mL)¹¹⁰ seguido de centrifugação a 400 g por 20 minutos, a 4 °C¹¹¹. Cerca de 4 mL da camada superior foi transferida para um novo tubo de 15 mL e submetida a 3 lavagens com água destilada (4.700 g por 5 minutos). Os sobrenadantes das etapas de lavagem foram removidos cuidadosamente com auxílio de pipeta plastica e os sedimentos contendo os cistos e oocistos foram suspensos em 3 mL de água destilada. Uma alíquota de 2 mL foi armazenada a 4 °C e o restante mantido sob congelamento a – 20 °C até o momento do uso¹¹².

As suspensões de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. utilizadas como controles positivos foram repostas sempre que necessário durante os experimentos.

3.1.2 Quantificação de cistos/oocistos (*Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.)

Os cistos de *Giardia* spp. foram quantificados por microscopia de campo claro com coloração de Lugol. Alíquotas de 10 µL foram gotejadas na Câmara de Neubauer para a contagem dos cistos. Foram realizadas 3 contagens de cada amostra, sob aumento de 400 X em microscópio óptico marca Zeiss®, modelo Primo Star.

A solução purificada, de oocistos de *Cryptosporidium* spp., foi quantificada com aplicação do corante fluorogênico DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, Sigma Chemicals®), devido ao reduzido tamanho do protozoário. Foi aplicada em Câmara de Neubauer 10 µL da solução contendo os oocistos e adicionado volume semelhante de DAPI¹¹⁴. As lâminas foram mantidas sob abrigo da luz por 10 minutos, em câmara úmida. Os oocistos foram visualizados em microscópio Zeiss®, com filtro de excitação de 365-400 nm; filtro de barreira: 395 nm, em campo escuro, considerando a média das leituras em triplicata.

Os oocistos purificados, mantidos refrigerados, foram utilizados para contaminação das amostras de água e como controles positivos nas análises moleculares.

3.1.3 Extração de DNA

As padronizações de extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram realizadas testando-se os protocolos descritos em seguida.

Para cada protocolo foram utilizados 100 µL da suspensão de cistos e oocistos e 100 µL de água destilada.

3.1.3.1 Kit fezes QIAamp DNA Stool - Qiagen

A suspensão contendo *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foi diluída em 1,4 mL de tampão ASL, constante no kit, com posterior aquecimento a 95 °C/5 minutos. Após resfriamento foi adicionado à preparação uma pastilha de Inhibit EX® em cada amostra. A extração foi realizada segundo o protocolo proposto pelo fabricante. Ao final, o DNA eluído foi armazenado a -20 °C até o momento do uso.

3.1.3.2 Rompimento mecânico com uso de miçangas

A pesquisa da eficácia do rompimento mecânico dos parasitos, com uso de miçangas, comumente realizada em protocolos de extração de DNA de fungos, foi realizada em microtubos de fundo chato contendo 100 µL de suspensão de oocistos e cistos. Cada amostra recebeu 10 miçangas e 200 µL de tampão TE (tampão de eluição) constante no kit de extração. Os tubos foram agitados no aparelho Tissuelyser LT Qiagen® por 5 min. a 50 oscilações por segundo e em seguida, procedeu-se a extração conforme o protocolo descrito nas instruções do kit QIAamp DNA Mini Kit -Qiagen®.

A ruptura, por miçangas, dos oocistos/cistos foi verificada pela técnica de imunofluorescência com auxílio do Kit comercial Merifluor®. Um volume de 10 µL da solução de parasitos foi adicionado ao kit em lâminas previamente preparadas. Em cada reação foram adicionados os controles positivo e negativo (que acompanham o kit). A adição do reagente de detecção, as incubações, lavagens das lâminas e montagem,

seguiram instruções do fabricante. As leituras foram realizadas no microscópio óptico Zeiss, modelo AxioScan, em filtro de excitação de 450 a 490 nm e filtro de barreira de 520 nm para imunofluorescência em campo escuro.

3.1.3.3 Fervura

Os protozoários foram submetidos ao processo de fervura para avaliar a eficiência na extração do material genético. A suspensão contendo cistos/oocistos foi submetida à temperatura de 100°C em chapa aquecedora, para lise celular. Alíquotas (200µL) das amostras foram acondicionadas em placas de isopor imersas em água por 15 minutos. Após o resfriamento dos tubos, seguiu a extração usando kit comercial QIAamp DNA Mini Kit -Qiagen®, seguindo as etapas do protocolo do fabricante.

3.1.3.4 Concentrações de Proteinase K.

Alíquotas de 200µL das soluções de cistos/oocistos dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foram tratadas com as concentrações de 20µL, 40µL e 60µL de Proteinase K, em diferentes períodos de incubação. Nesta etapa da padronização da extração de DNA, o tempo de incubação foi de 01, 03 e 18 horas para cada concentração da enzima, com agitação de 500 oscilações por minuto.

Após o término das incubações seguiu-se as extrações de DNA conforme o protocolo do fabricante do kit QIAamp DNA Mini Kit -Qiagen®. As concentrações de DNA e a pureza foram determinadas pela relação da DO de 260 e 280 nm em NanoDrop® Thermo Scientific™ ND1000. Para uso nas cPCR e qPCR, as amostras foram diluídas com água ultra-pura até a concentração de 100 ng/µL.

3.1.4 cPCR

As PCRs foram realizadas utilizando um kit comercial (GoTaq®Green Master Mix - Promega). Cada 12,5 µL do “mix” contendo 1 unidade de Taq DNA polimerase em 10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂ e 200 mM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando-se 5 µL do DNA alvo e 10 pmol de cada iniciador, em um volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas utilizando o termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em um sistema eletroforético horizontal em gel de agarose a 1,2% tampão TBE 1x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de-EDTA, pH 8.0), contendo brometo de etídio a 0,5 g / mL. Em todos os géis foram adicionados o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb e as corridas foram realizadas a 100 Volts por 1 h (fonte PS 1006, Apelex, França). As amostras foram visualizadas e fotografadas em um transiluminador Gene Genius (Programa Gel Capture Pro, versão 4.5.3) de ultravioleta a um comprimento de onda de 302 nm.

Tabela 1 - Descrição dos iniciadores moleculares para cPCR utilizados neste estudo.

Protozoário	cPCR			
	Iniciadores moleculares	Sequência 5' – 3'	Produto esperado (pb)	Referência
<i>T. gondii</i>	B22(F)/B23(R)	AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAG TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAAC	115	Burg <i>et al.</i> ¹¹³
<i>Cryptosporidium</i> spp	CPB(F)/CPB(R) (R18s)	AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG TAAGGTGCTGAAGG AGTAAGG	171	Johnson <i>et al.</i> ¹¹⁴
	BCowp(F)/BCowp(R) (par/ooc)	ACCGCTTCTCAACAACCATCTTGTCTC CGCACCTGTTCCCACTCAATGTAAACCC	769	Spano <i>et al.</i> ¹¹⁵
	CryIAL1(F)/CryIAL2(F)/ CryIAL3(R)	TACCTACGTATGTTGAAACTCCG AGGATACGAAATATCAGGAAAGC TGTATATCCTGGTGGGCAGACC	703/531	O autor
	GG(F)/GG(R) (p. giardina)	AAGTGCCTCAACGAGCAGCT TCGATGGTCACAAAGCACTAA	171	Mahbubani <i>et al.</i> ¹¹⁶
<i>Giardia</i> spp	G7(F)/G376(F)/ G759(R)	AAGCCCGACGACCTCACCCGCA GTGC CCATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA GTCGTCTCGAAGATCCAGGGCGGCCTC	753/384	Cacciò e Ryan ¹¹⁷

Tabela 2 - Descrição dos iniciadores moleculares para qPCR utilizados neste estudo.

Protozoário	qPCR			
	Iniciadores moleculares	Sequência 5' – 3'	Sonda	Referência
<i>T. gondii</i>	B1	GAAAGCCATGAGGCACTCCA TTCACCCGGACCGTTTAGC	FAM: CGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGATACA	Belaz <i>et al</i> ¹¹⁸
	REP-529	AGAGACACCGGAATGCGATCT TTCGTCCAAGCCTCCGACT	FAM: TCGTGGTGATGGCGGAGAGAATTGA	Belaz <i>et al</i> ¹¹⁸
<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>C. parvum</i>		ATGACGGGTAACGGGGAAT CCAATTACAAAACCAAAAAGTCC AAGGTTGAGGAACATGGTCGAC	CY5: CGCGCCTGCCTTCCTTAGATG FAM:ATTTATCTCTTCGTAGCGGCG	Jothikumar <i>et al</i> ¹¹⁹
<i>C. hominis</i>		ACTTTTTGTTTGTTTTACGCCG AATGTGGTAGTTGCGGTTGAA	FAM:ATTTATTAATTTATCTCTTACTTCGT	
<i>C. cayetanensis</i>	Cyclo	TAGTAACCGAACGGATCGCATT AATGCCACGTAGGCCAATA	FAM:CCGGCGATAGATCATTCAAGTTTCTGACC	Murphy <i>et al</i> ¹²⁰

3.1.4.1 *Giardia* spp.

A cPCR para determinação de *Giardia* spp. foi realizada utilizando-se iniciadores moleculares previamente descritos por Mahbubani *et al.*¹¹⁶ e Cacciò e Ryan¹¹⁷ (Tabela 1).

Primeiramente, foi testado o conjunto de iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) GG(F)/GG(R)¹¹⁶ que amplifica um fragmento de 171 pb do gene responsável pela produção da proteína giardina. As condições da ciclagem seguiram o proposto pelo autor: um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Em seguida, foram testados os pares de iniciadores moleculares descritos previamente por Cacciò e Ryan (2008)¹¹⁷, nas condições padronizadas para amostras de fezes. Na primeira PCR foi utilizado o iniciador G7(F) / G759(R) (Tabela 1) e, na segunda reação (nested PCR), o iniciador G376(F) / G759(R). Ambas as reações (PCR e *nested* PCR) foram realizadas segundo a programação: um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C / 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C / 30s, anelamento a 65 °C / 30s, extensão a 72 °C / 1 min e uma extensão final a 72 °C / 7 min. Os fragmentos esperados foram de 753 pb e 384 pb, respectivamente.

Após testar os iniciadores moleculares separadamente, na PCR e nested PCR conforme descrito pelos autores, uma semi-nested PCR em tubo único foi padronizada, com a aplicação dos iniciadores moleculares de ambos os autores^{116,117}. Os iniciadores moleculares G7(F) (0,1µL), GG (F) (0,5 µL) e o G759(R) (0,5 µL) foram utilizados de acordo com o esquema descrito na Figura 6, em uma reação de 25 µL. A amplificação foi realizada inicialmente com 20 ciclos dos iniciadores G7(F) e G759(R) com temperatura de 65 °C para anelamento. Seguiu-se um intervalo de 4 °C por 2 min. e foram adicionados 35 ciclos a 58°C para anelamento dos iniciadores GG (F) (0,5 µL) e G759(R). As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems® modelo Veriti segundo o esquema descrito na Tabela 3.

Figura 6 - Esquema da semi-nested PCR em tubo único para detecção de *Giardia* spp. evidenciando as quantidades e disposições dos iniciadores moleculares na reação.

Tabela 3 - Programa de amplificação da semi-nested PCR em tubo único para *Giardia* spp., com as respectivas temperaturas do 1º e 2º ciclos.

1º Ciclo	94°C/5min	20X (94°C/30s; 65°C/30s; 72°C/30s)	72°C/2min	4°C/5min
2º Ciclo		35X (94°C/30s; 58°C/30s; 72°C/45s)	72°C/5min	4°C/ ∞

3.1.4.2 *Cryptosporidium* spp.

A detecção de *Cryptosporidium* spp. por cPCR foi realizada utilizando-se diferentes iniciadores moleculares descritos na literatura. O primeiro par de iniciadores testado foi o CPB(F)/CPB(R), que amplifica um fragmento de 171 pb da região ribossomal 18s¹¹⁴. O segundo foi o BCowp (F) / BCowp (R)¹¹⁵ que amplifica um fragmento de 769 pb de uma região específica do gene da parede de oocisto (Tabela 1).

A seguir, um novo conjunto de iniciadores moleculares foi desenhado, denominados CryIAL1(F) / CryIAL2(F) / CryIAL3(R) (Tabela 1), que amplificam um fragmento do mesmo gene da parede de oocisto de *Cryptosporidium* spp.. As reações (volume final de 25 µL) foram realizadas de acordo com o esquema descrito na Figura 7.

Foram utilizados 0,1 µL, 0,5 µL e 0,5 µL dos iniciadores moleculares CryIAL1(F), CryIAL2(F) e CryIAL3(R) respectivamente. As amplificações foram realizadas no termociclador Applied Biosystems® modelo Veriti segundo o esquema descrito na Tabela 4.

Foi adicionada uma etapa inicial composta de 20 ciclos para que ocorresse o anelamento dos iniciadores CryIAL1(F) e CryIAL3(R) em temperatura de 61 °C, após esta etapa, seguiu-se um intervalo de 4 °C por 2 min. e foram adicionados 35 ciclos a 56°C para anelamento dos iniciadores CryIAL2(F) e CryIAL3(R).

Figura 7 - Esquema da semi-nested PCR em tubo único para *Cryptosporidium* spp. evidenciando as quantidades e disposições dos iniciadores moleculares na reação.

Tabela 4 - Programa de amplificação da semi-nested PCR em tubo único para *Cryptosporidium* spp.

1º Ciclo	94°C/5min	20X (94°C/30s; 61°C/30s; 72°C/30s)	72°C/2min	4°C/5min
2º Ciclo		35X (94°C/30s; 56°C/30s; 72°C/45s)	72°C/5min	4°C/ ∞

Para avaliar a identidade dos iniciadores, deste estudo, o fragmento resultante do par CryIAL2 (F) e CryIAL3 (R) foi sequenciado em equipamento ABI 3130XL. Na reação foram utilizados 2 µL de BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit e 2 µL de Save Money (Tris-HCl 0,2 mM e MgCl₂ 5 mM), 0,3 µL (3pM) de cada iniciador molecular, 5,2 µL água e 0,5 µL de amostra.

As sequências de nucleotídeos, correspondentes à região da proteína denominada “cowp”, da parede do oocisto, foram analisadas e editadas com o programa *SeqMan* do pacote *Expert Analysis Software* (DNASTAR, Inc., EUA) e alinhadas com outras seqüências provenientes de isolados de *Cryptosporidium* spp. (AF266273, AF262266, XM661099, XM_627569,, AB089292, AF266272, AF266266, AF266268, AB514045, AF266269, AB514060, DQ388389, KJ506848, AB469366, AF266270, EU877640, disponíveis no GenBank. Para o alinhamento utilizou-se o programa Clustal W do BioEdit versão 7.0.9 (1997-2007, Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA).

3.1.4.2.1 qPCR para diferenciar *C. parvum* e *C. hominis*.

Para diferenciar as duas espécies prevalentes em amostras de água foi testada uma qPCR, como descrito anteriormente para detecção do protozoário em fezes, por Jothikumar *et al*, 2008¹¹⁹. Os iniciadores amplificam uma sequência da região 18S rRNA de *C. parvum* e *C. hominis*. Essa diferenciação ocorre com o uso de sondas marcadas com fluoróforos específicos descritos na Tabela 5

A reação foi composta por duas “mix”, sendo a primeira para a detecção de *Cryptosporidium* spp. e *C. parvum* e a segunda para *C. hominis*. Os detalhes da reação estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - qPCR para diferenciação de *C. parvum* e *C. hominis*.

	1ª reação*	2ª reação**
MasterMix- qPCR®	12,5 µL	12,5 µL
Água	3,5 µL	4,7 µL
JVA(F)	0,5 µL	-
JVA(R)	0,5 µL	-
JVAG(F)	0,5 µL	0,5 µL
JVAG(R)	0,5 µL	0,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	-	0,8 µL
JVAP18sTaqMan (sonda)	1 µL	-
JVAPG2 CpTaqMan (sonda)	1 µL	-
JVAPG1 CHTaqMan (sonda)	-	1 µL
DNA	5 µL	5 µL
Total	25 µL	25 µL

* *Cryptosporidium* spp. e *C. parvum*; ** *C. hominis*

3.2 *Toxoplasma gondii*

3.2.1 Obtenção e purificação de oocistos

Oocistos de *T. gondii* isolados de fezes de felinos (gatos domésticos) experimentalmente infectados com a cepa Br1 foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os oocistos foram purificados de fezes e mantidos em ácido sulfúrico na concentração de $8,7 \times 10^2$ / mL.

Para a remoção do ácido sulfúrico, a solução contendo oocistos foi lavada 3 vezes com água destilada (4700 g por 5 minutos). No intervalo de cada centrifugação

procedeu-se uma etapa de agitação vigorosa em equipamento de agitação vórtex, marca GoLab,[®] por 30 segundos, para dispersão nos portozoários.

Para os ensaios de viabilidade com corantes vitais e propídio monoazida (PMA) foram utilizados oocistos de *T. gondii* da cepa Br1, gentilmente cedidos pelo Centro de Ciências Agrárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina/Paraná, Brasil. A purificação e concentração dos oocistos foram realizadas por flutuação em sacarose^{110,111}.

Os oocistos purificados foram quantificados com aplicação do corante fluorogênico DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, Sigma Chemicals[®]), devido ao reduzido tamanho do protozoário. Foi aplicada em Câmara de Neubauer 10 µL da solução contendo os oocistos e adicionado volume semelhante de DAPI¹¹⁴. As lâminas foram mantidas sob abrigo da luz por 10 minutos, em câmara úmida. Os oocistos foram visualizados em microscópio Zeiss[®], com filtro de excitação de 365-400 nm; filtro de barreira: 395 nm, em campo escuro, considerando a média das leituras em triplicata.

Foram utilizados para contaminação das amostras de água, extrações de DNA, controle positivo, para construção da curva padrão na qPCR, viabilidade com corantes e com intercalante celular (PMA).

3.2.2 Extração de DNA

As extrações de DNA dos oocistos foram realizadas com o protocolo descrito no item 3.1.3.4, com 40 µL de Proteinase K a cada 10 µL da solução de oocistos e 190 µL de água destilada, seguida por incubação por 18 horas. Após este período seguiu-se com as etapas posteriores conforme o protocolo do fabricante.

3.2.3 PCR

3.2.3.1 cPCR

A cPCR foi aplicada nos estudos moleculares de recuperação e na verificação de provável aderência dos oocistos de *T. gondii* em recipientes utilizados para o envio de amostras de água.

O iniciador molecular utilizado na cPCR foi o B22(F)/B23(R) (Tabela 1), que amplifica uma sequência de 115pb de uma região específica do gene B1 de *T. gondii* (Tabela1).

Foram adicionados controles positivos (DNA extraído de oocistos) e controle negativo, onde foi utilizada água ultrapura em substituição ao DNA.

3.2.3.2 qPCR

Para a realização da curva padrão de oocistos por qPCR foram utilizados dois marcadores moleculares (Tabela 02) e realizados como descrito anteriormente por Camilo *et al.*¹²¹. O primeiro foi o B1, que amplifica um fragmento de 71 pb do gene B1 e o segundo, o REP-529, que amplifica uma sequência de 112 pb, altamente repetitiva de REP-529 (GenBank AF487550)¹¹⁹. As reações foram realizadas no equipamento ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) em volume final de 20 µL por reação. DNA teste (3 µL na concentração de até 100 ng/µL), o DNA controle (5 ng/µL) e o DNA para a curva padrão (3 µL para cada ponto) foram adicionados à mistura que continha 10 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e os marcadores moleculares (1.25 µL do “Assay Mix” contendo 18 µM de cada marcador molecular e 5 µM da sonda). Em todas as reações foram adicionados um controle positivo, a partir de DNA extraído de oocistos, e

um controle negativo onde foi utilizada água ultrapura. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50 °C por 2 min, um ciclo a 95 °C por 10 min e em seguida foram realizados 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e a 60 °C por 1 min.

3.2.4 Curva padrão de oocistos de *T. gondii*

A curva padrão foi construída a partir de uma solução de oocistos, diluídos em série a partir de 100 µL com base 10, em tampão AE (tampão de diluição do kit de extração) conforme esquema ilustrado na Figura 8. Foram testados os marcadores moleculares B1 e REP-529. A metodologia foi realizada conforme descrita no item acima (3.2.3.2).

Figura 8 - Esquema da diluição seriada da solução contendo oocistos de *T. gondii* para quantificação pela qPCR, partindo de uma concentração de 10^6 oocistos por mL.

3.2.5 Avaliação da viabilidade de oocistos de *T. gondii* por microscopia e análise molecular

Os experimentos foram realizados utilizando-se duas alíquotas de oocistos diluídos em água destilada (500 µL). Uma incubada a 25° C por 30 minutos e a segunda incubada a 100° C por 30 minutos, para inviabilização dos oocistos. Em seguida, ambas foram estocadas a 4 °C até os experimentos de coloração e fotoativação.

3.2.5.1 Corantes vitais

A viabilidade de oocistos de *T. gondii* nas alíquotas incubadas a 25° C e 100° C foi avaliada por dois corantes vitais. As alíquotas foram tratados com azul de tripano a 0,4% (v/v) e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos.

O segundo corante foi o vermelho neutro, as amostras foram incubadas (v/v) em câmara escura por 3 horas para a impregnação do mesmo nos oocistos.

Um volume de 20 µL de cada solução de oocistos corados foi adicionado em lâminas de vidro cobertas com lamínulas e analisadas com aumento de 400 vezes em microscópio ótico Zeiss ®.

3.2.5.2 Tratamento com (propídio monoazida) PMA™ - intercalante celular

Para pesquisa molecular da viabilidade, oocistos de *T. gondii* foram tratados com o intercalante de células PMA. Foram testadas 3 alíquotas. A primeira foi constituída de oocistos incubados a 25 °C (180 µL). A segunda, oocistos incubados a 100 °C (180 µL). A terceira foi constituída de uma mistura das alíquotas de oocistos viáveis (90 µL) e inviáveis (90 µL). Em cada alíquota (180 µL) foram adicionados 20 µL de solução PMA a 2 mM (Biotium Inc., Hayward, WI, EUA) para obter uma concentração final de 200 µM, segundo o protocolo do fabricante.

As soluções foram mantidas em câmara escura por 30 minutos¹¹⁶, seguida do processo de fotoativação. Os tubos foram acondicionados em um saco plástico contendo gelo fragmentado (cama de gelo) e mantidos a uma distância de aproximadamente 15 cm para exposição em luz branca por um período de 30 minutos para a fotoativação do corante. Uma lâmpada alógena de 500 W foi direcionada aos tubos conforme instruções do fabricante (Figura 9). Como controle (sem PMA), 3 alíquotas semelhantes receberam 20 µL de água ultrapura. Em seguida, as alíquotas foram usadas para extração de DNA e qPCR¹⁰⁹.

Figura 9 - Esquema representativo da fotoativação das amostras contendo oocistos antes e após o aquecimento, tratadas com PMA sob cama de gelo e incidência de luz por lâmpada alógena de 500 W.

3.3 Contaminação experimental dos recipientes e filtração de amostras de água

Amostras de água destilada, acondicionadas em recipientes utilizados para o envio de amostras, foram contaminadas experimentalmente para avaliar a recuperação e aderência dos protozoários *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *T. gondii*.

As contaminações foram realizadas em 3 galões plásticos de 20 L e 3 garrafas plásticas de 1,5 L. Previamente os recipientes foram higienizados com solução detergente contendo Tween 80 a 1%. A seguir, procedeu-se uma lavagem com solução de hipoclorito de sódio a 2,5% e 3 lavagens com água filtrada (em movimentos circulares).

Os recipientes foram preenchidos com água destilada (obtidas de destilador marca Marte®) e cada frasco foi contaminado com 1000, 100 e 10 cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *T. gondii*. As amostras foram homogeneizadas com movimentos circulares e posteriormente filtradas em membranas de ésteres de celulose de porosidade nominal 0,45 µm (Millipore®).

As amostras de água acondicionadas nos galões de 20 L foram filtradas em sistema de mangueiras acopladas em recipiente fechado, sob pressão 0,7 kgf/cm², com auxílio de bomba a vácuo, marca Fanem®, utilizando membranas de 142 mm de diâmetro.

As amostras de água acondicionadas nas garrafas de 1,5 L foram filtradas em sistema de filtração direta, em porta filtro da marca Millipore®, diretamente acoplado na bomba a vácuo, marca Fanem®, em membranas de 47 mm de diâmetro.

Para a verificação da possível aderência dos parasitos nas embalagens, e no sistema de filtração fechado foi adicionada uma etapa de lavagem dos galões (1 L cada, totalizando 3 L) e das garrafas (100 mL cada, totalizando 300 mL). A seguir, foi recolhido o raspado da membrana para a realização da PCR.

Após cada filtração, o sistema fechado de mangueiras foi autoclavado por 30 minutos a 120Kgf/cm² de pressão. Semelhante aos recipientes foi verificada a possível aderência dos parasitos no sistema de filtração fechado, com a análise de amostras filtradas e ensaiadas antes e após a autoclavagem, passando pelo sistema 1 L de água destilada após cada filtração, totalizando 3 L.

Após filtração, as membranas de 142 mm de diâmetro foram transferidas para placas de Petri de 145 mm de diâmetro, estéreis previamente identificadas e as membranas de 47 mm de diâmetro foram transferidas para placas de Petri de 50mm de diâmetro.

3.4 Recuperação dos protozoários

As membranas acondicionadas em placas de Petri, contendo os recuperados da filtração foram raspadas com auxílio de raspador de células (cell scrape - Kasvi®). Durante a raspagem foram adicionados 5 mL de água destilada para a lavagem da membrana. O produto foi coletado com pipeta Pasteur e transferido para tubos de 15 mL. Em seguida, as membranas foram lavadas com mais 5 mL de água destilada e o líquido foi recolhido para posterior extração de DNA e PCR. A pesquisa microscópica foi realizada segundo o item 3.1.2.

3.5 *Cyclospora cayetanensis*

3.5.1 Obtenção de DNA

Foram utilizadas amostras de DNA extraído de oocistos de *C. cayetanensis*, que foram gentilmente cedidos pelo laboratório de referência internacional, *Laboratory*

Identification of Parasites of Public Health Concern (DPDx) - Centers for Disease Control and Prevention (CDC) – Atlanta/Geórgia-EUA. As amostras foram mantidas sob congelamento a – 20 °C no Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

3.5.2 qPCR

As reações para detecção de *C. cayetanensis* foram realizadas como previamente descrito por Murphy *et al.*¹²⁰. Os iniciadores moleculares e a sonda (Cyclo250 F; Cyclo350R e a sonda Cyclo281T) estão descritos na Tabela 2.

As reações foram realizadas no equipamento ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) em volume final de 20 µL por reação. DNA controle (5 ng/µL na concentração de até 100 ng/µL) foram adicionados à solução contendo 10 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e os marcadores moleculares (1.25 µL de Assay Mix contendo 18 µM de cada marcador molecular e 5 µM da sonda). Em todas as reações foram adicionados um controle positivo e um controle negativo (água ultrapura).

As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50 °C por 2 min., seguida de um ciclo a 95 °C por 5 minutos. Após a etapa inicial foram realizados 45 ciclos a 95 °C por 30 segundos e a 67 °C por 30 segundos.

3.6 Aplicação das metodologias para determinação de protozoários em amostras de surtos epidêmicos

Após as padronizações, as metodologias para determinação dos protozoários de veiculação hídrica foram testadas em amostras de águas encaminhadas para o Núcleo de Morfologia e Microscopia do Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz/SP. Foram ensaiadas amostras de água advindas de surtos epidêmicos nacionais ocorridos no

período entre 2017 a setembro de 2019. As coletas das amostras foram realizadas pelas Vigilâncias sanitária e epidemiológica locais, provenientes de reservatórios municipais, soluções alternativas de água para consumo humano e também amostras de água mineral. Foram investigadas nestas amostras a presença de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *T. gondii*, conforme a suspeita clínica dos respectivos surtos. A filtração, purificação e recuperação dos eluatos foram semelhantes à padronização inicial, como descrito no item 3.1.1.

A Figura 10 mostra a origem dos 33 surtos de veiculação hídrica atendidos durante 2017 a 2019, sendo 6 originários de outros estados (Paraná, Rio Grande do Norte, Bahia, Rio Grande do Sul, Pará e Pernambuco) e o restante (27) distribuídos pelo estado de São Paulo.

A Figura 11 mostra a distribuição de protozoários relacionados aos 33 surtos e com a suspeita dos acometimentos clínicos e o consumo da água. Os surtos denominados como indefinidos foram relacionados a diarreia, sendo pesquisados comumente os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

Em relação à quantidade de amostra de água ensaiada, no total dos 33 surtos foram pesquisados protozoários em 69 amostras, sendo predominantemente amostras de água filtrada, conforme Figura 12. Além destes surtos, foram analisadas mais 26 amostras do município de Cascavel/PR.

Figura 10 - Distribuição geográfica dos surtos atendidos entre os anos de 2017 a 2019 para os respectivos protozoários envolvidos nos surtos epidêmicos, destacando os acometimentos no estado de São Paulo.

Figura 11 - Distribuição no número de surtos com suspeita dos protozoários decorrentes de achados clínicos, totalizando 33 surtos de veiculação hídrica.

Figura 12 - Discriminação do número de amostras ensaiadas pelos diferentes tipos de água, na pesquisa dos protozoários patogênicos de veiculação hídrica.

3.6.1 Pesquisa de protozoários patogênicos em surto de veiculação hídrica do município de Cascavel/PR

Entidades públicas do município de Cascavel/PR solicitaram, junto ao Instituto Adolfo Lutz, apoio técnico/científico para auxílio na elucidação do surto decorrente de diarreia que ocorreu entre os meses de dezembro de 2018 a março de 2019.

Após investigação pela vigilância epidemiológica local constatou-se a ocorrência de um surto de diarreia aguda no município de Cascavel, identificado pelas Unidades Sentinelas (US) no Monitoramento de Doenças Diarréicas Agudas (MDDA).

Após a detecção de *Cryptosporidium* spp., isolado em amostras biológicas, e pela dispersão dos casos por diversos bairros da cidade, aventou-se a hipótese do surto

ter sido ocorrido por veiculação hídrica. A água poderia ser a principal fonte em comum, dada a transmissibilidade e aumento de casos.

Foram encaminhadas 26 amostras de água que foram processadas como descrito nas padronizações.

Após a filtração e eluição das membranas, a pesquisa de parasitos foi avaliada por microscopia (coloração de Kynion) e PCR. As amostras coletadas pela Vigilância Sanitária Municipal estão descritas na Figura 13.

ETA: Estação de Tratamento de Água

Figura 13 - Distribuição da origem das amostras envolvidas em surto epidêmico, coletadas em diferentes pontos da cidade de Cascavel/PR.

3.7 Pesquisa de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de água de escolas rurais do município de Itatiba/SP

No período de 12 meses, entre julho de 2016 a maio de 2017, a vigilância sanitária do município de Itatiba/SP realizou coletas de amostras de água nas 4 estações

do ano (outono, inverno, primavera e verão), em 10 escolas rurais que utilizam a solução alternativa coletiva (SAC) como fonte de água, totalizando 40 amostras.

As amostras foram enviadas ao Núcleo de Morfologia e Microscopia do Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz em galões de 20 L previamente higienizados e processadas de acordo com o descrito acima. Após filtração e eluição do material retido, seguiu-se com a pesquisa de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. por PCR.

3.8 Análise dos dados

A análise da curva padrão e os cálculos de regressão linear foram feitos por modelos matemáticos do programa estatístico Graph Pad Prism 6.0.

3.9 Aspectos éticos e de biossegurança

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (anexo A) e pelo Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (anexo B).

Todas as etapas deste trabalho foram desenvolvidas dentro das normas de biossegurança do Instituto Adolfo Lutz, incluindo uso de EPI's e o descarte e desinfecção correta de todo o material e fômites utilizados para a execução do mesmo.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. para contaminação das amostras

A quantificação dos cistos de *Giardia* spp. (Figura 14A), obtidos de amostras de fezes e analisadas por microscopia em campo claro (item 3.2.1) resultou em um valor de 1.1×10^4 cistos/mL (média da triplicata). Oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Figura 14B) foram quantificados após a média de triplicata (10 μ L) e a quantidade obtida foi de 8×10^3 oocistos / mL. Os cistos/oocistos foram diluídos para o uso nas contaminações dos recipientes de armazenamento testados neste estudo, conforme Tabela 6.

Figura 14 - (A) cistos de *Giardia* spp. após a coloração com Lugol (aumento de 400 vezes); (B) oocistos de *Cryptosporidium* spp. após coloração por DAPI (aumento de 1000 vezes).

Tabela 6 - Volume do inóculo relacionado ao número de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. adicionados experimentalmente nas amostras de água acondicionadas em galões de 20L e garrafas plásticas de 1,5L.

Parasito	Concentração	Número de oocistos/volume do inóculo		
		1000	100	10
	----mL----	----- µL -----		
<i>Giardia</i> spp.	$1,1 \times 10^4$	91	9,1	1
<i>Cryptosporidium</i> spp.	8×10^3	125	12,5	1,3

4.1.1 Extrações de DNA

A Tabela 7 mostra os resultados dos protocolos de extração de DNA de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. O tratamento com proteinase K foi o método mais efetivo para a quebra dos cistos/oocistos.

Em relação aos kits de extração utilizados, resultados falso-negativos foram vistos nas amostras extraídas com o kit para fezes. Estes resultados mostram a importância do pré-tratamento dessas matrizes complexas antes da extração de DNA, para uma maior sensibilidade e especificidade da PCR. O protocolo eleito para a extração dos protozoários em amostras de água foi a proteinase K em concentração de 40 µL e incubação por 18 horas.

Tabela 7 - Comparação dos resultados das PCRs após aplicação de diferentes protocolos de extração de DNA, para os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp..

Protocolo	PCR	
	<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.
Kit fezes	Negativo	Negativo
Quebra mecânica	Negativo	Negativo
Fervura	Positivo	Negativo
*PK 20 µL – 1 h	Negativo	Negativo
*PK 20 µL – 3 h	Negativo	Negativo
*PK 20 µL – 18 h	Negativo	Negativo
*PK 40 µL – 1 h	Negativo	Negativo
*PK 40 µL – 3 h	Positivo	Negativo
*PK 40 µL – 18 h	Positivo	Positivo
*PK 60 µL – 1 h	Negativo	Negativo
*PK 60 µL – 3 h	Positivo	Negativo
*PK 60 µL – 18 h	Positivo	Positivo

*PK: proteinase K

Em relação à quebra mecânica com uso de miçangas plásticas, a Figura 15 mostra cistos de *Giardia* spp. antes do tratamento (Figura 15A) e após tratamento (Figura 15B e 15C), seguido de agitação mecânica. Com auxílio da microscopia por imunofluorescência observou-se que as membranas dos cistos de *Giardia* spp. não se romperam, apresentaram-se somente disformes. Este fato pôde ser considerado quando obtivemos PCR negativa (Tabela 07), denotando resistência dos cistos ao rompimento mecânico, procedimento não suficiente para a liberação do DNA.

Figura 15 - Comparação da morfologia dos cistos de *Giardia* spp. antes e após tratamento com miçangas plásticas e agitação. (A) cistos com membranas preservadas antes do tratamento, (B) cistos com membranas disformes após tratamento, e (C) detalhe da membrana disforme após tratamento, e (C) detalhe da membrana disforme. A e B, aumento de 400 vezes; e C, de 1000 vezes.

4.1.2 cPCR

4.1.2.1 *Giardia* spp.

A cPCR utilizando os iniciadores moleculares GG(F) / GG(R), que amplifica uma região de 171 pb do gene responsável pela produção da proteína giardina, apresentou resultados inespecíficos. Mesmo testando diferentes ciclagens, os produtos de PCR não foram de acordo com o esperado na padronização para fezes segundo a literatura. Mahbubani *et al.*¹¹⁶.

Os iniciadores moleculares G7(F) / G376(F) / G759(R) apresentaram resultados inconclusivos, quando a reação foi realizada nas condições descritas pelos autores¹¹⁷. Os testes realizados com diferentes concentrações de iniciadores G7(F) / G376(F) / G759(R) e programação modificada, gerou somente bandas inespecíficas.

Diante destes resultados, a padronização da semi-nested PCR em tubo único para *Giardia* spp. foi realizada com a combinação dos iniciadores moleculares segundo

Mahbubani *et al.*¹¹⁶ (GG(F) e Cacciò *et al.*¹¹⁷ (G7(F) e G759(R) em quantidades padronizadas e resultou em um fragmento de 149pb (Figura 16).

Figura 16 - Produto amplificado de 149 pb na semi-nested PCR em tubo único para *Giardia* spp. em gel de agarose 2%.

4.1.2.2 *Cryptosporidium* spp.

Os resultados para *Cryptosporidium* spp. foram inconclusivos, utilizando os iniciadores descritos na literatura, (Tabela 8) por outro lado, a semi-nested PCR em tubo único, utilizando os iniciadores moleculares CryIAL1(F) / CryIAL2(F) / CryIAL3(R), foi eficiente na detecção dos oocistos. Os dados obtidos da padronização, evidenciaram amostras positivas com produto amplificado de 531 pb (Figura 17).

Tabela 8 – Resultado da cPCR utilizando diferentes marcadores moleculares para detecção de *Cryptosporidium* spp..

Protocolo	cPCR <i>Cryptosporidium</i> spp.
CPB	Negativo
Bcowp	Negativo
Semi-nested PCR em tubo único (CryIAL)	Positivo

Figura 17 - Produto amplificado de 531 pb na semi-nested PCR em tubo único para *Cryptosporidium* spp. em gel de agarose 2% com uso do conjunto de iniciadores moleculares CryIAL1(F)/ CryIAL 2(F) / CryIAL3(R).

O sequenciamento de amostras positivas, para *Cryptosporidium* spp, utilizando conjunto de iniciadores moleculares CryIAL2f e CryIAL3r revelou homologia com sequências do genoma de *Cryptosporidium* spp disponível no GenBank (Figura 18).

Figura 18 - Alinhamento das sequências de nucleótidos do fragmento amplificado de *Cryptosporidium* spp. com diferentes sequências disponíveis no GenBank. Clustal W do BioEdit versão 7.0.9 (1997-2007, Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA).

4.1.2.3 qPCR para diferenciar de *C. parvum* e *C. hominis*

Os resultados demonstraram que a qPCR foi efetiva para a diferenciar as duas espécies. A diferenciação das espécies foi realizada com a introdução de duas sondas marcadas com fluoróforos distintos (Tabela 9).

Tabela 9 - Conjunto de sondas para detecção e diferenciação de gênero e das duas espécies de *Cryptosporidium* spp..

Sonda/Corante	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>C. parvum</i>	<i>C. hominis</i>
JVA18s - CY5	Positivo	Positivo	positivo
JVAGP1 – FAM	Negativo	Negativo	positivo
JVAGP2 - FAM	Negativo	Positivo	Negativo

4.2 *T. gondii*: obtenção, purificação e quantificação de oocistos

Após lavagens sucessivas da suspensão por centrifugação, houve diminuição no número de oocistos de *T. gondii*. A contagem foi realizada após coloração com corante DAPI e foi considerada a média da triplicata (Figura 19) resultando em um total de 8.5×10^2 oocistos / mL. A solução de oocistos foi diluída para a obtenção de um inoculo contendo 1000, 100 e 10 oocistos conforme Tabela 10. Após a diluição, os inóculos foram utilizados para a contaminação das amostras de água em galões e garrafas.

Figura 19 - Oocistos de *T. gondii* após coloração por DAPI, evidenciando dois esporocistos em seu interior (aumento de 400 vezes).

Tabela 10 - Volume do inoculo relacionado ao número de oocistos de *T.gondii* adicionados experimentalmente nas amostras de água acondicionadas em galões de 20L e garrafas plásticas de 1,5L.

Parasito	Concentração	Número de oocistos/volume do inóculo		
		1000	100	10
		----- µL -----		
<i>T. gondii</i>	8.5 x 10 ² oocistos/mL	1180	118	11,8

4.2.1 qPCR

Na qPCR, foram testados 2 marcadores moleculares (REP529 e Gene B1). Os resultados mostraram que o limite de detecção de DNA de oocistos foi melhor utilizando-se o marcador REP529 (Figura 20A), (detectado até 10 oocistos) do que o Gene B1 (Figura 20B) (detectando até 1000 oocistos). O marcador REP529 obteve $R^2 = 0,9953$, com alta linearidade entre as variáveis¹²². O limite mínimo de detecção (em CT) foi de 39,28 (correspondendo a um oocisto). Assim, o marcador REP529 foi eleito para pesquisa de *T. gondii* em amostras de água

Figura 20 - Curva padrão de oocistos de *T. gondii* utilizando o conjunto de iniciadores REP529 (A) e Gene B1 (B) com sondas de hidrólise marcadas com o corante FAM. Os valores apresentados são do limiar do ciclo médio obtidos a partir dos resultados em triplicata de cada concentração de DNA. As análises foram feitas em diluições seriadas de 10 vezes de DNA extraído de oocistos, na concentração inicial de 50 ng/μl (1×10^6 oocistos). $R^2 = 0,9923$.

4.2.2 Investigação da viabilidade de oocistos de *T. gondii* por microscopia

A Figura 21 mostra os oocistos íntegros após incubação a 25° C por 30 minutos (Figura 21A) e oocistos com paredes rompidas após a incubação a 100° C (Figura 21B), pelo mesmo período.

Após a coloração com o azul Tripano 0,4%, os oocistos íntegros apresentaram membranas integras, sem sinais de impregnação do corante no interior (Figura 22A). Nos oocistos com paredes rompidas (Figura 22B) houve penetração do corante no interior dos mesmos. A Figura 23A mostra um oocisto inteiro corado pelo vermelho neutro, denotando a integridade da membrana. A Figura 23B mostra um oocisto inviável, sem a coloração com o vermelho neutro.

Figura 21 Imagens microscópicas, em campo claro, evidenciando oocisto de *T. gondii* purificado com membrana intacta após incubação a 25 ° C por 30 minutos (A); e oocisto após incubação a 100 ° C por 30 minutos com membrana danificada (B). Ampliação: 400 vezes.

Figura 22 - Imagens microscópicas, em campo claro, evidenciando oocisto de *T. gondii* purificado com membrana intacta após incubação a 25 °C por 30 minutos, sem a coloração pelo azul de tripano 0,4% (A); e oocisto após incubação a 100 °C por 30 minutos com membrana danificada corado com azul de tripano 0,4% (B). Ampliação: 400 vezes.

Figura 23 - Imagens microscópicas, em campo claro, evidenciando oocisto de *T. gondii* purificado com membrana intacta após incubação a 25 °C por 30 minutos, com a coloração com o vermelho neutro (A); e oocisto após incubação a 100 °C por 30 minutos com membrana danificada não corado com o vermelho neutro (B). Ampliação: 400 vezes.

4.2.3 Investigação da viabilidade de oocistos de *T. gondii* por PMA

A viabilidade dos oocistos de *T. gondii* foi avaliada por qPCR nas amostras tratadas ou não com o intercalante PMA. A Figura 24 mostra a diferença na detecção pela qPCR entre os oocistos viáveis (incubados a 25° C por 30 minutos) e não viáveis (incubados a 100° C por 30 minutos), ambos tratados e não tratados com PMA. Nos oocistos viáveis não houve diferença significativa na amplificação e detecção quando tratados com o PMA e não tratados.

Estes resultados mostraram que o intercalante celular não se ligou ao DNA das células íntegras. Em contraste, nos oocistos inviáveis houve a intercalação do corante PMA no DNA das células desestruturadas. O PMA promoveu a inibição da amplificação da qPCR.

A Figura 25 mostra os oocistos viáveis e não viáveis (em diluição seriada), quando tratados e não tratados com PMA. Uma mistura contendo oocistos viáveis e não viáveis (v/v) foi dividida em 2 alíquotas, uma tratada com PMA e outra não tratada. Ambas as alíquotas foram diluídas serialmente. A seguir, o DNA foi extraído de cada amostra e realizada a qPCR. Na concentração máxima (50 ng/μL), as amplificações foram idênticas nas amostras tratadas ou não. No entanto, quando as amostras de DNA foram diluídas foi possível notar a diferença entre oocistos viáveis e não viáveis. Nestas condições foi possível verificar a concentração de DNA ideal para diferenciar oocistos viáveis de não viáveis, com o tratamento com PMA.

Figura 24 - qPCR para detecção de oocistos de *T. gondii* utilizando o REP-529 com sonda de hidrólise marcada com o corante FAM. Os resultados representam o número de oocistos (em Log₁₀) (incubados a 25 °C ou a 100 °C) não tratados (barras brancas); e tratado com PMA (barras cinzas).

Figura 25 - qPCR para detecção de oocistos de *T. gondii* utilizando o REP-529 com sonda de hidrólise marcada com FAM. Os resultados representam o número de oocistos (em Log₁₀) e diluídos serialmente, tratados (círculos cinzas) e não tratados (círculos brancos) com PMA.

4.3 *Cyclospora cayetanensis*

Os resultados demonstram que o protocolo previamente descrito por Murphy *et al.*¹²⁰ apresentou boa sensibilidade nas amostras de DNA utilizadas como controles positivos, podendo ser aplicado em amostras de água. Na amplificação das amostras positivas apresentou CT variando de 22 a 34 e *threshold* de 0,018287.

4.4 Contaminação experimental dos recipientes e recuperação dos protozoários

Após contaminação e filtração das amostras de água, líquidos de lavagem dos recipientes e do sistema de filtração fechado, as membranas foram raspadas e os eluatos recuperados. A seguir, as amostras obtidas foram processadas para extração de DNA e PCR.

Em relação à lavagem dos recipientes usados para a contaminação foi observada a presença de DNA nos eluatos de membrana de todos os parasitos estudados, evidenciando a importância de estabelecer um protocolo de descontaminação dos recipientes para a coleta de amostras de água enviadas para análise. Não foi detectada a presença de DNA no líquido de lavagem do sistema de filtração fechado, mesmo antes da etapa de autoclavagem. Este fato pode estar relacionado a uma aderência dos parasitos nas paredes do sistema de filtração, incluindo as mangueiras. Foi estabelecido assim, o uso da desinfecção por autoclave.

As Figuras 26, 27, 28 mostram os resultados das cPCRs com as amplificações dos produtos de cada espécie analisada, nas amostras das lavagens dos recipientes e do sistema de filtração fechado.

Figura 26 - Produto amplificado de 531 pb na semi-nested PCR em tubo único para *Cryptosporidium* spp. em gel de agarose 2%. (1) 1000 oocistos em galão; (2) 100 oocistos em galão; (3) 10 oocistos em galão; (4) 1000 oocistos em garrafa; (5) 100 oocistos em garrafa; (6) 10 oocistos em garrafa; (7) lavagem galões; (8) lavagem garrafas; (9 e 10) lavagem do sistema de filtração antes e após autoclavagem; (11) água destilada.

Figura 27 - Produto amplificado de 149 pb na semi-nested PCR em tubo único para *Giardia* spp. em gel de agarose 2%. (1) 1000 cistos em galão; (2) 100 cistos em galão; (3) 10 cistos em galão; (4) 1000 cistos em garrafa; (5) 100 cistos em garrafa; (6) 10 cistos em garrafa; (7) lavagem galões; (8) lavagem garrafas; (9 e 10) lavagem do sistema de filtração antes e após autoclavagem; (11) água destilada.

Figura 28 - Produto amplificado de 115 pb na cPCR em gel de agarose 2%. (1) 1000 oocistos de *T. gondii* em galão; (2) 100 oocistos de *T. gondii* em galão; (3) 10 oocistos de *T. gondii* em galão; (4) 1000 oocistos de *T. gondii* em garrafa; (5) 100 oocistos de *T. gondii* em garrafa; (6) 10 oocistos de *T. gondii* em garrafa; (7) lavagem galões; (8) lavagem garrafas; (9 e 10) lavagem do sistema de filtração antes e após autoclavagem; (11) água destilada.

4.5 Aplicação das metodologias para determinação de protozoários em amostras de surtos epidêmicos

Em atendimento a análise de amostras de águas relacionadas a surtos por protozoários durante 2017 a maio de 2019 foram coletadas 69 amostras durante os 33 surtos. Estas amostras foram processadas seguindo as metodologias padronizadas neste trabalho e coletadas pelas Vigilâncias Sanitárias e/ou epidemiológicas dos municípios acometidos, seguindo o fluxograma abaixo (Figura 29).

Figura 29 - Fluxograma de recepção, filtração e extração de DNA para amostras de água envolvidas em surtos epidêmicos com suspeita de contaminação por protozoários.

A Figura 30 mostra o número de amostras ensaiadas e número de amostras positivas por surtos epidêmicos. Nos 33 surtos, somente em 5 (15%) foram detectados um dos parasitos pesquisados.

Figura 30 - Total de surtos epidêmicos atendidos no período de 2017 a 2019 e resultado (positivo/negativo) na detecção dos protozoários *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.* e *T. gondii* nas amostras analisadas, onde a barra azul representa as amostras negativas e a barra laranja representa as amostras positivas.

Figura 31 - Distribuição da positividade das amostras ensaiadas por protozoários investigados em surtos epidêmicos, representado em números e porcentagem.

A Figura 31 mostra o número de amostras envolvidas em surtos epidêmicos e ensaiadas para a pesquisa dos protozoários. Um total de 54% das amostras foram ensaiadas para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Do total de 69 amostras ensaiadas 9 (13%) foram positivas para os protozoários pesquisados, denotando uma baixa positividade na detecção molecular em amostras de água envolvidas em surtos epidêmicos. (Figura 32). Nas amostras onde foram pesquisados *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. simultaneamente, não houve detecção de ambos os protozoários. A baixa positividade dos protozoários nas amostras ensaiadas denota dificuldade na coleta e envio das mesmas, sendo a coleta tardia (manifestação dos sintomas) um dos principais fatores que prejudicam a elucidação correta dos surtos.

Figura 32 - Número de amostras positivas e negativas no total de amostras ensaiadas por protozoários, onde a barra azul representa as amostras negativas e a barra laranja representa as amostras positivas.

4.5.1 Pesquisa de protozoários patogênicos em surto de veiculação hídrica do município de Cascavel/PR

Os resultados das amostras envolvidas no surto epidêmico analisadas por microscopia e PCR estão plotados na Figura 33. Do total de amostras, 26 provenientes do surto epidêmico do município de Cascavel/PR, 6 (23%) amostras apresentaram protozoários de veiculação hídrica. Do total de amostras analisadas, *Cyclospora cayetanensis* foi o mais prevalente, sendo detectado em 4 amostras (15,4%). *C. hominis* foi o segundo protozoário mais detectado nas amostras, onde 3 (11,5%) foram positivas pela qPCR (Figura 33).

Somente 1 (3,8%) amostra apresentou *Giardia* spp. correspondente a água de retrolavagem de um dos filtros da estação de tratamento municipal (Tabela 11).

Figura 33 - Gráfico apresentando a positividade de amostras de água ensaiadas para pesquisa de protozoários relacionadas ao surto epidêmico da cidade de Cascavel/PR.

A Figura 34 mostra oocistos de *C. cayetanensis*, isolados das amostras de água, corados e analisados por microscopia.

Figura 34 - Resultado microscópico da pesquisa de oocistos de *C. cayetanensis* corados com fucsina (técnica de kynion) em amostras de água do surto de Cascavel/PR.

A Figura 35 mostra os resultados das amostras de água pela origem da coleta, onde foi possível observar que dentre as 4 amostras de manancial, 3 (75%) apresentaram um dos protozoários estudados. A amostra de um dos filtros de retrolavagem apresentou simultaneamente os três protozoários pesquisados, denotando uma concentração destes patógenos durante o processo de filtração da água.

Figura 33 - Resultados da detecção de protozoários nas diferentes origens de amostras, coletadas no município de Cascavel/PR, onde a barra azul representa as amostras negativas e a barra laranja representa as amostras positivas.

Tabela 11 - Resultados das análises microscópicas e moleculares das amostras de água do surto de Cascavel/PR, ensaiadas para pesquisa de protozoários de veiculação hídrica.

Local	Tipo de água	<i>Giardia</i> spp.	<i>C. hominis</i>	Microscópico		qPCR
				<i>C. cayetanensis</i>	(EAAR)	
Rio Cascavel	Não tratada	Ausência	Ausência	Presença	Presença	Ausência
ETA 3 Retrolavagem1	Não tratada	Presença	Presença	Presença	Ausência	Presença
Rio Saltinho	Não tratada	Ausência	Presença	Ausência	Ausência	Ausência
ETA 3 – Torneira	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
ETA 3 Retrolavagem 3	Não tratada	Ausência	Presença	Ausência	Ausência	Ausência
ETA 3 UT 161	Tratada	Ausência	Ausência	Presença	Presença	Presença
Torneira ETA 1	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Água retrolavagem 5	Não tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Água retrolavagem 7	Não tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Água retrolavagem 1	Não tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Reservatório ETA 1	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
UTA Gramado	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Residência 1	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Residência 2	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Residência de CCS	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

Local	Tipo de água	<i>Giardia</i> spp.	<i>C. hominis</i>	<i>C. cayetanensis</i>	Microscópico (EAAR)	qPCR
Residência de DVS	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Fonte/bica Jardim União	Solução alternativa	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Fonte Morumbi	Solução alternativa	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Rio Cascavel 2	Não tratada	Ausência	Ausência	Presença	Presença	Ausência
Rio Saltinho amostra 2	Não tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Hospital UOPECAM	Solução alternativa	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Hospital Policlínica	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
CMEI A	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
CMEI B	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
CMEI C	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
CMEI D	Tratada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

4.6 Monitoramento de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de água de escolas rurais do município de Itatiba/SP

A Tabela 12 mostra os resultados da identificação de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. encontrados nas amostras de água provenientes das escolas rurais do município de Itatiba/SP, nas 4 estações do ano. Os resultados ressaltam a ocorrência dos protozoários nas escolas 2, 3, 5, 6, 9 e 10.

Em relação à *Giardia* spp., foram detectados nas escolas 3, 6 e 9 no outono enquanto nas amostras das escolas 5 e 10 as estações onde foram detectados esse protozoário foram verão e inverno respectivamente. *Cryptosporidium* spp. foi detectado somente na amostra coletada na escola 2 durante a primavera. Nas demais amostras, não foram identificados os protozoários pesquisados.

Tabela 12 - *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água coletadas em diferentes estações do ano.

Ponto de Coleta		Inverno	Primavera	Verão	Outono
Escola 1	Poço	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
Escola 2	Reservatório	N. D.	<i>Cryptosporidium</i> spp.	N. D.	N. D.
Escola 3	Reservatório / Poço	N. D.	N. D.	N. D.	<i>Giardia</i> spp.
Escola 4	Reservatório	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
Escola 5	Reservatório / Poço	N. D.	N. D.	<i>Giardia</i> spp.	N. D.
Escola 6	Reservatório / Poço	N. D.	N. D.	N. D.	<i>Giardia</i> spp.
Escola 7	Reservatório / Poço	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
Escola 8	Reservatório / Poço	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
Escola 9	Poço	N. D.	N. D.	N. D.	<i>Giardia</i> spp.
Escola 10	Reservatório / Poço	<i>Giardia</i> spp.	N. D.	N. D.	N. D.

N.D. – Não detectado

5 DISCUSSÃO

A água pode atuar como uma eficiente fonte veiculadora de patógenos em razão da sua grande capacidade de dispersão, do seu uso abrangente e por ser fundamental para a manutenção da vida.

A qualidade da água, tanto superficial como subterrânea, destinada ao consumo humano deve estar em conformidade aos padrões recomendados pela Organização Mundial da Saúde, ou seja, garantir que as características físicas, químicas e biológicas estejam dentro dos padrões de qualidade e potabilidade¹²³.

A água é um meio pelo qual parasitos podem ser disseminados com grande velocidade e frequência. Portanto, faz-se necessário controlar ou atenuar a poluição aquática e suas implicações biológicas, pois, tais fatores representam uma séria ameaça à saúde pública, como no caso de surtos epidêmicos¹²⁴.

As condições de abastecimento de água potável, de saneamento e de higiene são fatores determinantes para a saúde da população, principalmente na transmissão de protozoários patogênicos¹²⁵. A morbidade e mortalidade causadas pelo consumo de água contaminada são relevantes e devem ser controladas com melhorias na qualidade e segurança da água potável^{18,126}.

O Brasil possui um dos maiores reservatórios potenciais de água continental, incluindo a superficial e subterrânea. O crescimento demográfico, a urbanização desordenada e o desenvolvimento industrial comprometem os recursos hídricos, tais sobrecargas resultam em deficiências do sistema de saneamento público, aumentando o risco da ocorrência de doenças de veiculação hídrica¹²⁷. A alta pluviosidade, enchentes e transbordamento de fossas sépticas, são situações críticas. Merecem especial atenção, as atividades de produção de gado leiteiro, pecuária, suínos e aves, devido ao grande volume de dejetos, fatores preocupantes na transmissão de protozoários.

Cryptosporidium spp., *C. cayetanensis* e *Giardia* spp. são transmitidos pela via fecal-oral e são responsáveis por surtos de doenças gastrointestinais associados ao consumo de água contaminada, tratadas ou não¹²⁸. Diferentes fatores contribuem para a ampla dispersão desses protozoários no ambiente, sendo uma das mais importantes a resistência dos oo(cistos), os quais são capazes de sobreviver em condições ambientais adversas. Estudos mostram que estes protozoários permanecem infectantes em águas superficiais por até seis meses, a temperatura de 20°C e após tratamento com processos de cloração¹¹.

T. gondii é outro protozoário de importância na veiculação hídrica quando se trata de surtos epidêmicos, sendo considerado um dos protozoários mais bem-sucedidos do planeta, pois acomete cerca de um terço da população mundial⁵⁶.

A toxoplasmose congênita é o principal acometimento clínico causado por *T. gondii* e está associada com comprometimentos neurológicos, oculares e psiquiátricos, como a esquizofrenia e distúrbio bipolar^{77,76,79,129,130}. Estudos recentes sugerem que *T. gondii* poderia influenciar no comportamento de roedores infectados para facilitar a sua transmissão possibilitando a realização do ciclo sexuado¹³¹. O controle de *T. gondii* no ambiente é alcançado com esforços concentrados dos setores médico, veterinário e ambiental tornando-se, assim, um exemplo paradigmático do conceito de saúde única, pois envolve o homem, os animais e o ambiente¹³¹.

O controle de protozoários preconizado pela legislação brasileira é o método 1623.1 da USEPA, baseado numa associação de diferentes técnicas, incluindo filtração automática, purificação com *beads* magnéticas e imunofluorescência. Este método foi desenvolvido para o isolamento dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. e, portanto, não abrange o diagnóstico de *C. cayetanensis* e *T. gondii*, abordados neste estudo. Modificações para cada laboratório são permitidas pela portaria, desde que a eficiência do método seja comprovada em estudos inter-laboratoriais. Em estudos de ocorrência

de protozoários em água, Young, et al⁹⁸ relataram que esta metodologia apresenta limitações e deve ser complementada pelos métodos moleculares, pois não classifica as espécies de protozoários. No entanto, alguns autores relatam que mesmo diante dessas restrições, o método 1623.1, é uma técnica adequada para detecção de protozoários em amostras de água, sobretudo se for utilizado juntamente com os métodos moleculares. O critério de aceitação estabelecido pelo método é baixo e exige reprodutibilidade, embora a taxa de recuperação seja variável (de 24% a 100%)^{13,133}. Deve-se levar em consideração o fato do método 1623.1 ter sido desenvolvido para avaliar a presença de protozoários em sistemas lênticos, ou seja, em águas paradas como as dos EUA. No Brasil, os mananciais apresentam águas agitadas, em sistemas lóticos, com presença de partículas vegetais e minerais¹³⁴. Vale ressaltar que a detecção de *T. gondii*, *C. cayetanensis* e de outros protozoários relacionados à transmissão hídrica não estão contemplados neste método, tampouco pela legislação recomendada pelo Ministério da Saúde.

Como não dispomos de equipamentos e insumos previstos no método 1623.1, padronizamos um método alternativo que atenda as demandas emergenciais e a rotina laboratorial.

As padronizações e metodologias propostas, neste trabalho, foram realizadas com controles positivos, estudos de viabilidade (*T. gondii*) e contaminações experimentais em recipientes de água (exceto *C. cayetanensis*). Uma das dificuldades foi o reduzido tamanho dos oocistos, dificultando a visualização dos mesmos pelo exame microscópico. O uso dos corantes, incluindo microscopia diferencial (DAPI), aliada ao exame morfométrico e morfológico possibilitou a visualização e contagem de *T. gondii* e *Cryptosporidium* spp.⁵³.

Ainda foi possível visualizar esporocistos de *T. gondii* e esporozoítos de *Cryptosporidium* spp., diferenciando-o de outras estruturas de aparência e tamanhos semelhantes. A contagem dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. para

preparo do inoculo pode não ter sido precisa na alíquota de 10 µL, resultados semelhantes foram descritos anteriormente ao comparar as técnicas de Acid-Fast-Trichrome e Ziehl-Neelsen modificado¹³⁴. Rigo e Franco¹³⁴ também relataram a dificuldade na distinção e contagem de oocistos de *Cryptosporium* spp. em amostras fecais.

Por outro lado, o tamanho dos cistos de *Giardia* spp. (8 a 12µm) possibilitou sua visualização em microscópio óptico em campo claro com auxílio da coloração pelo Lugol. Após a avaliação de diferentes métodos de detecção, Garcia *et al.*¹³⁵ relataram resultados semelhantes em amostras fecais, evidenciando que a coloração por Lugol é indispensável para a identificação de cistos.

A detecção dos protozoários em amostras de água é dificultada pelas condições intrínsecas e particularidades do tipo de amostra coletada para análise¹³⁶, água bruta ou água filtrada, independente de sua turbidez. Atherholt *et al.*¹³⁷ destacaram as dificuldades na detecção e na obtenção do material genético dos protozoários em amostras de água, incluindo as limitações dos métodos, podendo levar a resultados falso-negativos⁹⁷. Por este fato, faz-se necessário a padronização de um protocolo de extração que atenda a todos os protozoários deste estudo, principalmente em amostras de água envolvidas em surtos epidêmicos.

Visando a detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., diferentes métodos de pré tratamento, extração de DNA e amplificação do material genético foram avaliados.

Os protocolos de fervura, quebra mecânica e uso dos kits comerciais não foram eficientes para lise de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e posterior purificação de DNA. Por outro lado, a incubação a 100° C das amostras de *Giardia* spp. foi suficiente para extração do DNA. O uso do kit de fezes mesmo após o pré-tratamento das amostras com a adição das pastilhas InhibitEX® não foi eficiente para o rompimento dos (oo)cistos. Segundo o protocolo do fabricante, as pastilhas

InhibitEX® consistem em uma combinação de resinas que conduzem a remoção de inibidores de PCR, podendo assim, ter carregado os cistos e oocistos dos protozoários durante as centrifugações, dificultando a extração do material genético. Weiss *et al.*¹³⁸ avaliaram diferentes protocolos de extração de cistos de *G. duodenalis* e verificaram que embora este kit (QIAmp DNA Stool Mini Kit) seja amplamente utilizado, não foi eficiente nas extrações de DNA. Os autores selecionaram o uso do ultrassom e pérolas de vidro como mais eficazes no rompimento dos oo(cistos). Resultados semelhantes foram descritos por Paulino *et al.*¹³⁹ quando avaliaram diferentes protocolos de extração de DNA de *Giardia* spp., incluindo aquecimento e congelamento (95°C - 196°C), e concluíram que o rompimento dos cistos ocorreu somente após o uso de ultrassom.

A incubação de *Giardia* spp. por 3 horas e 60 µL de PK foi eficiente para amplificar o fragmento de DNA analisado, por outro lado, resultados positivos, só foram obtidos para *Cryptosporidium* spp. após 18 horas de incubação e mesmo volume de PK. Os testes realizados com 40 µL de PK e tempo de incubação por 18 horas foram positivos para os dois protozoários, sendo o indicado para detecção desses patógenos, em amostras suspeitas de surto de diarreia. Este mesmo protocolo foi adequado para extração do material genético de *T. gondii* e *C. cayetanensis*. A otimização e redução na quantidade de reagentes (40 µL de PK) é de fundamental importância em testes diagnósticos, particularmente em Laboratórios de Saúde Pública.

A análise comparativa mostrou a importância da padronização de um protocolo único para a extração de amostras de água envolvidas ou não em surtos epidêmicos. Comumente em surtos de diarreia aguda em humanos, os protozoários frequentes numa mesma amostra são *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *C. cayetanensis*. Estes múltiplos patógenos foram detectados na mesma alíquota, no surto ocorrido na cidade de Cascavel/PR (Tabela 11).

Para as amostras de *T. gondii*, as extrações de DNA dos oocistos foram realizadas com o protocolo descrito para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., com 40 µL de Proteinase K e incubação por 18 horas. Vale ressaltar que em estudos futuros de extração de DNA dos protozoários estudados pode-se considerar a aplicação de mais de uma técnica, como por exemplo, fervura associada à quebra mecânica.

Após as padronizações da extração de DNA foram testados os protocolos de PCR indicados por Johnson *et al.*¹¹⁴ e Spano *et al.*¹¹⁵ para *Cryptosporidium* spp. e de Mahbubani *et al.*¹¹⁶ e Cacciò e Ryan¹¹⁷ para *Giardia* spp.. Não houve amplificação do DNA com os iniciadores propostos por estes autores.

Resultados positivos, para detecção de *Cryptosporidium* spp., foram observados somente com protocolo proposto neste trabalho, utilizando a técnica de semi-nested PCR em tubo único e iniciadores moleculares desenhados para este estudo. Os iniciadores desenhados foram denominados “CRYIAL” e amplificam sequências específicas da parede de oocistos. Dos 703 nucleotídeos do fragmento resultante dos iniciadores CRYIAL 1 e 3, 485 fazem parte do fragmento Bcowp¹¹⁵.

A especificidade da reação foi verificada com os resultados do sequenciamento, no qual o fragmento amplificado foi homólogo com diferentes sequências de *Cryptosporidium* spp. (disponíveis no GenBank).

Semelhante a padronização da semi-nested PCR em tubo único para *Cryptosporidium* spp., iniciadores moleculares descritos na literatura^{116,117} para detecção de *Giardia* spp. foram padronizados.

Estes resultados foram promissores e evidenciaram uma PCR sensível, com potencial discriminatório. A utilização da semi-nested PCR em tubo único é vantajosa porque não exige a manipulação do produto amplificado, diferentemente da nested PCR¹⁴⁰.

Neste trabalho descrevemos a primeira reação de semi-nested PCR em tubo único para detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., para uso no diagnóstico de amostras de águas envolvidas em surtos epidêmicos.

Padronizações semelhantes foram propostas por Abath *et al.*¹⁴¹, que descreveram a semi-nested PCR em tubo único para detecção de DNA alvo a partir de célula bacteriana.

A diferenciação entre espécies é de fundamental importância para a investigação de fontes de contaminação de água ofertadas aos acometidos durante surtos. O protocolo descrito por Jothikumar *et al.*¹¹⁹ para distinção entre as espécies *C. parvum* e *C. hominis* em amostras de fezes, pode ser utilizado para identificar a origem da contaminação em amostras de água em surtos de veiculação hídrica.

Oocistos de *T. gondii* disseminados no ambiente são uma importante fonte de contaminação para humanos e animais, sendo que surtos veiculados por água foram descritos em diferentes regiões do mundo¹⁴².

Os estudos envolvendo a detecção molecular de oocistos de *T. gondii* em amostras de água são escassos¹⁴², se comparados com *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Vieira *et al.*¹⁴³ estudaram a vulnerabilidade das águas subterrâneas associadas à prevalência de toxoplasmose em seres humanos e discutiram a importância de oocistos de *T. gondii* no ambiente aquático. Hussain *et al.*¹⁴⁴, num estudo epidemiológico, associaram a alta prevalência da toxoplasmose com a presença de oocistos de *T. gondii* em alimentos, em águas de irrigação, frutas e vegetais frescos contaminados.

Camilo *et al.*¹²¹ mostraram que o limite de detecção de DNA extraído de amostras clínicas contendo taquizoítos foi eficiente com o conjunto de marcadores moleculares REP 529 na qPCR. Os resultados aqui apresentados mostraram que foi possível monitorar a qualidade da água utilizando o mesmo protocolo.

Embora diferentes estudos tenham sido feitos para investigar a infectividade de parasitos em solo e água, a viabilidade de oocistos é pouco

relatada. Esse conhecimento pode contribuir para o monitoramento eficaz da qualidade da água potável^{61,62}. A viabilidade de protozoários em amostras de água foi realizada com *T. gondii*, pela facilidade na identificação microscópica e pela disponibilidade de obtenção de oocistos de fezes de felinos. Apesar da qPCR ser uma ferramenta importante na detecção de *T. gondii* em amostras clínicas, veterinárias e ambientais¹⁴⁷, os resultados positivos não permitem determinar a viabilidade do protozoário¹⁴⁸.

Para avaliar a viabilidade, inclui-se o uso de corantes vitais para microscopia e intercalante celular PMA para qPCR. Os oocistos inviáveis foram obtidos após a incubação a 100 °C durante 30 minutos, na qual ocorreu o rompimento das paredes⁶³. Estes resultados foram observados após a coloração dos oocistos pelo azul de tripano e vermelho neutro, na qual foi possível observar por microscopia o rompimento ou não dos oocistos. A utilização dos corantes azul de tripano e vermelho neutro traz vantagens e desvantagens quando comparados. O período de incubação com o azul de tripano é curto (15 min), porém, a leitura deve ser realizada em até 10 min. Por outro lado, o tempo de incubação do vermelho neutro é de 3 horas, mas não requer leitura imediata, sendo sugerida a leitura completa em até uma hora. Boni¹⁴⁸ comparou o desempenho do azul de tripano com o iodeto de propídio em estudo de viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. concluindo que ambos apresentaram performance semelhante, porém, o iodeto de propídio requer leitura em microscopia de fluorescência. Neste sentido, os corantes utilizados neste estudo apresentam vantagem por serem facilmente visualizados em microscopia de campo claro, sem uso de equipamentos mais específicos. Vale ressaltar que para os estudos de viabilidade é imprescindível o treinamento do microscopista na identificação dos oocistos.

A filtração em sistemas de membranas foi eficiente para a detecção dos protozoários estudados. Resultados semelhantes foram descritos por Franco et

al.¹⁰⁵, quando avaliaram diferentes metodologias de concentração para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Por outro lado, os autores, ainda, verificaram que o tratamento de amostras por floculação com carbonato de cálcio não foi eficiente para a recuperação dos oo(cistos), em águas captadas para consumo humano, coletadas de rios localizados nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

O volume preconizado pela USEPA, para pesquisa de protozoários, é de 100 L. Os resultados deste estudo, utilizando volumes inferiores (1,5 L e 20 L), foram positivos, corroborando os achados de outros autores que constatarem a presença *T. gondii* em um volume de 5 L¹⁵⁴ de água destinada ao consumo humano e volume de 10 L¹⁵⁵ para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.. Estes dados demonstram que mesmo em volumes inferiores ao preconizado, é possível detectar protozoários. Ressaltamos que a detecção dos protozoários em água depende não só do volume analisado como também de sua concentração.

Segundo a Portaria de Consolidação nº 5/2017⁶, parágrafo 1º : “Quando for identificada média geométrica anual maior ou igual a 1.000 *Escherichia coli*/100mL deve-se realizar monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no(s) ponto(s) de captação de água”. Porém, a maioria dos surtos registrados em diferentes países ocorreu em água de abastecimento que apresentava os padrões bacteriológicos tradicionais com limites inferiores ao determinado e aparente normalidade operacional no processo de tratamento⁴. Nas amostras envolvidas em surtos epidêmicos, enviadas para o Centro de Alimentos, foi observada a presença de protozoários mesmo após a constatação da ausência de coliformes.

Cryptosporidium spp., *Giardia* spp., *C. cayetanensis* e *T. gondii* por serem também transmitidos por água apresentam elevada persistência ambiental e resistência à cloração. Portanto, constituem preocupação constante dos produtores de água e indústria de alimentos¹¹. Em surtos epidêmicos o monitoramento de

amostras ambientais é de extrema importância para a elucidação da origem da contaminação e medidas de controle pelas autoridades competentes¹⁰⁰.

Apesar dos esforços, principalmente com a elaboração de documentos técnicos, a elucidação de surtos epidêmicos de veiculação hídrica e alimentar ainda é um grande desafio, pois requer ação conjunta de diferentes esferas¹²³. Um dos principais documentos é o Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos, publicado pelo Ministério da Saúde¹⁵⁶.

A detecção e caracterização desses patógenos, na maioria das vezes, não são representativas, pois a água envolvida no surto não se encontra mais disponível para pesquisa. Este fato denota a importância de uma ação eficaz das vigilâncias nas tomadas de decisões frente ao surto.

De um total de 33 surtos analisados neste estudo, somente 5 (15%) apresentaram amostras positivas para pelo menos um dos protozoários pesquisados. Quanto a avaliação da positividade de amostras ensaiadas, de 69 amostras, 9 (13%) foram positivas. Estes dados denotam baixa positividade na detecção destes protozoários em amostras de água envolvidas em surtos epidêmicos. Os dados gerados neste estudo permitiram estabelecer um protocolo para amostras de águas implicadas em surtos, que envolvem recepção, filtração, microscopia, extração de DNA e PCR. Tal algoritmo poderia viabilizar a tomada de decisões das autoridades frente a surtos epidêmicos.

Amostras de água do município de Cascavel, no estado do Paraná, foram encaminhadas ao Núcleo de Morfologia e Microscopia com suspeita de *Cryptosporidium* spp.. Este protozoário foi isolado em algumas amostras de fezes dos acometidos de diarreia aguda. O surgimento de novos casos e recidivas em pacientes, adicionado a dispersão por vários bairros da cidade, suspeitou-se do surto estar ocorrendo por veiculação hídrica, por ser a fonte comum água entre os afetados. Visando a elucidação do surto, as amostras de água foram encaminhadas ao Núcleo de Morfologia e Microscopia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para a

pesquisa de protozoários. Dentre estas amostras foram incluídas águas de retrolavagem dos filtros das estações de tratamento, visando pesquisar protozoários que acidentalmente pudessem ter passado pelo sistema de tratamento e acometido a população. Do total de 26 amostras, 6 foram positivas, sendo 4 para *C. cayetanensis*, 3 para *C. hominis* e 1 para *Giardia* spp. (Figura 33).

Os protozoários *Giardia* spp., *C. cayetanensis* e *Cryptosporidium hominis*, isolados simultaneamente, em água de retrolavagem de filtro indicam uma provável concentração destes patógenos durante o processo do tratamento de água. A ocorrência *C. hominis* nestas amostras sugere contaminação do manancial com dejetos humanos (esgoto). Dentre as amostras prontas para consumo, coletadas após o tratamento, somente uma apresentou parasito, tendo sido detectado microscopicamente *C. cayetanensis*. Este protozoário foi pela primeira vez relatado em amostras fecais de um surto ocorrido em Papua Nova Guiné em 1979 por Ashford *et al.*¹⁵⁷, desde então, casos de infecção por este parasito tem sido descritos em diferentes regiões do mundo, tanto em indivíduos imunocomprometidos como em imunocompetentes⁸⁸.

Zini *et al.*,¹⁵⁸ descreveram o primeiro surto de *C. cayetanensis* no Brasil, no período de 08/10/1999 a 09/02/2000. O surto ocorreu na cidade de General Salgado/SP, uma cidade com pouco mais de 10 mil habitantes. Na ocasião foram relatados 275 casos, sendo detectados os oocistos em 66,6% das amostras de fezes analisadas. Devido ao número de casos e dispersão dos acometidos, foi sugerido que a água poderia ser a fonte de contaminação, não sendo confirmada uma vez que a pesquisa do parasito não foi realizada nas amostras de água. Por outro lado, no surto ocorrido na cidade de Antonina/PR, foi identificado *C. cayetanensis* em amostras clínicas. Em novembro de 2001, 600 casos de diarreia foram reportados, associados ao consumo de água municipal contaminada, decorrente do rompimento da tubulação de distribuição da cidade. Apesar do

parasito não ter sido investigado na água, as evidências sugerem contaminação por via hídrica, devido ao número expressivo de acometidos¹⁵⁹.

Visando à aplicação de técnicas que contribuam com a detecção de parasitos em águas de consumo, avaliamos a eficiência dos protocolos padronizados de extração e de PCR para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.. Amostras de água de poço e reservatório de 10 escolas rurais do município de Itatiba/SP foram coletadas nas 4 estações do ano. Do total de 40 amostras, 6 foram positivas, sendo detectados em 5 destas, cistos de *Giardia* spp. e em uma oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Nestas escolas, a água era utilizada para o preparo de refeições, sucos, higienização de utensílios e instalações, além do consumo direto por meio de bebedouros. Estes achados denotam a importância de monitorar a qualidade da água oferecida nas escolas principalmente, considerando que crianças podem ser mais suscetíveis às infecções alimentares e por via hídrica¹⁶⁰. Embora tenha um número significativo de estudos sobre a detecção desses protozoários em amostras de água, a ocorrência em águas coletadas em poços é pouco explorada. Barçante *et al.*¹⁶¹ analisaram 414 poços domiciliares no município de Lagoa Santa no Estado de Minas Gerais e detectaram *G. intestinalis* em 14,04% das amostras, associando os achados com más condições estruturais dos reservatórios.

A análise de protozoários em água traz uma série de desafios científicos e tecnológicos, uma vez que as metodologias reconhecidas internacionalmente são de alta complexidade.

No Brasil, a pesquisa de protozoários em água por técnicas específicas e sensíveis ainda é pouco difundida, considerando a especificidade e custo das técnicas, aliado as dificuldades na detecção e possível presença de interferentes nas matrizes.

Os resultados deste estudo são promissores e as metodologias padronizadas podem ser introduzidas na rotina laboratorial para a pesquisa de

protozoários. A inserção de metodologias específicas na rede de laboratórios de Saúde Pública possibilitará identificar a origem dos surtos epidêmicos, bem como, monitorar a qualidade da água disponível para a população.

6 CONCLUSÕES

- a) O método de concentração por filtração em membrana, a recuperação dos eluatos por raspagem e a purificação das amostras por diferença de densidade (sacarose), permitiram a detecção dos protozoários nas contaminações experimentais;
- b) Os resultados dos estudos de viabilidade dos oocistos de *T. gondii* denotam que o tratamento com corantes vitais permitiu diferenciar oocistos viáveis de não viáveis, mensurando as condições das membranas. A viabilidade dos oocistos de *T. gondii* pela qPCR, nas amostras tratadas ou não com o intercalante celular PMA, permitiu diferenciar os oocistos viáveis dos não viáveis;
- c) Para a detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, o desenho de iniciadores moleculares específicos e a padronização da semi-nested PCR em tubo único, possibilitou a detecção do DNA do parasito nas diferentes matrizes de água. A semi-nested PCR em tubo único ainda não havia sido relatada na literatura científica, sendo promissora para a detecção deste protozoário;
- d) Os resultados para *Giardia* spp. quando aplicados protocolos previamente descritos na literatura, não foram eficientes para a detecção do protozoário

em amostras de água, sendo realizada a padronização da semi-nested PCR em tubo único, que permitiu a detecção molecular em análises experimentais, bem como, em amostras envolvidas em surtos epidêmicos;

- e) Para a detecção molecular de oocistos de *T. gondii* em amostras de água, os protocolos previamente descritos na literatura foram eficientes, sendo eleito o REP 529 (qPCR) como o mais sensível, pela capacidade de detectar menor número de oocistos;
- f) *C. cayetanensis* foi detectado por qPCR com protocolo previamente descrito na literatura. Este fato pôde ser assegurado com a evidência do protozoário no surto de veiculação hídrica na cidade de Cascavel/PR, onde foi aplicado o protocolo de purificação das amostras e detecção microscópica e molecular;
- g) As padronizações de filtração, purificação, e detecção permitiram identificar os protozoários em amostras de água envolvidas em surtos epidêmicos, coletadas pelas Vigilâncias Sanitárias de diferentes regiões do Brasil, bem como monitorar amostras de água de solução alternativa em escolas rurais do município de Itatiba/SP.
- h) Entre os diferentes protocolos testados para extração de DNA, o uso do kit comercial para extração de tecidos foi eficiente para a amplificação do material genético dos protozoários estudados, porém, a quantidade de proteinase K e o tempo de incubação das amostras foram alterados para 40 µL do reagente e incubação por 18 horas;

- i) Os métodos microscópicos, com auxílio de corantes e moleculares padronizados mostraram-se eficientes para detecção e caracterização dos protozoários estudados;

REFERÊNCIAS

1. Plutzer J, Karanis P. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Res.* 2016;101:318-32.
2. World Health Organization 2012. Consultation on the Development of a Strategy on water Quality and Health. Geneva: WHO;2012. [acessado em 16 de julho de 2019]. Disponível em: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/ Acesso em: 16/07/2019.
3. Checkley W, White AC, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen XM, *et al.* A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infect Dis.* 2015;15:85-94.
4. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks an update 2004–2010. *Water Res.* 2011;45:6603-14.
5. Bartram J, Cairncross S. Hygiene, Sanitation, and Water: Forgotten Foundations of Health. *PLoS Med.* 2010;7: e1000367.
6. Brasil, Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação nº5 de 28/09/2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Anexo XX do Controle e da Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e seu padrão de potabilidade (Origem: PRT MS/GM 2914/2011). Diário Oficial da União, Brasília; 28 set. 2017.
7. Dowbor L, Tagnin RA, organizadores. Administrando a água como se fosse importante: gestão ambiental e sustentabilidade. São Paulo: Senac, 2005.
8. Almeida JC, Martins FD, Ferreira Neto JM, Santos MM, Garcia JL, Navarro IT, *et al.* Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2015;24:303-8.
9. Xiao L. Overview of *Cryptosporidium* presentations at the 10th international workshops on opportunistic protists. *Eukaryotic Cell.* 2009;8:429-36.
10. Dillingham R, Lima A, Guerrant, R. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection.* 2002;4:1059-66.
11. Kumar T, Majid MA, Onichandran S, Jaturas H, Andiappan H, Salibay CC, *et al.* Presence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water samples from

Southeast Asia: towards an integrated water detection system. *Infect Dis Poverty*. 2016;5:3.

12. Franco RM. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde Pública. *Rev Panam Infectol*. 2007;9:36-43.

13. Lopes AM. Avaliação da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp. e sua associação com indicadores bacteriológicos e turbidez na represa de vargem das flores - MG [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.

14. Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:595-612.

15. Benedict KM, Reses H, Vigar M, David M. Roth MS, Roberts VA, *et al*. Surveillance for Waterborne disease outbreaks associated with drinking water – United States, 2013-2014. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2017;66:1216-21.

16. Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J, *et al*. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathog*. 2015;4:307-34.

17. Tauxe RV. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg Infect Dis*. 1997;3:425-34.

18. Pandey PK, Kass PH, Soupir ML, Biswas S, Singh VP. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. *AMB Express*. 2014;4:51.

19. World Health Organization 2014. Progress on drinking water and sanitation/ 2014. Geneva: WHO;2012. [acessado em 12 de fevereiro de 2019]. Disponível em: [www.searo.who.int/.../progress-on-drinking-water-2014\(9789241507240_eng\).pdf](http://www.searo.who.int/.../progress-on-drinking-water-2014(9789241507240_eng).pdf).

20. Geldreich EE. La amenaza mundial de los agentes patógenos transmitidos por el agua. *Ing Sanit Amb*. 1997;30:44-57.

21. Medema GJ, Schijven JF. Modeling the sewage discharge and dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. *Water Res*. 2001;35:4307-16.

22. Rose JB, Huffman DE, Gennaccaro A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol Rev*. 2002;26:113-23.

23. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol*. 2000;30:1305-22.

24. Sheffield HG, Bjorvatn B. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. Am J Trop Med Hyg. 1977;26:23-30.
25. 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.
26. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Diseases Initiative". Trends Parasitol. 2006;22:203-8.
27. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2011;24:110-40.
28. Thompson RC. Giardiasis as an emerging infectious disease and its zoonotic potential. Int J Parasitol. 2000;30:1259-67.
29. Pickering LK, Engelkirk PG. *Giardia lamblia*. Pediatr Clin North Am. 1998;35:565-77.
30. Adam RD. The Biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev. 1991;55:706-32.
31. Jerlström-Hultqvist J, Ankarklev J, Svärd SG. Is human giardiasis caused by two different *Giardia* species? Gut Microb. 2010;1:379-82.
32. Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Pan American Health Org. 2003.
33. Dawson D. Foodborne protozoan parasites. Int J Food Microbiol. 2005;103:207-37.
34. Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. Am J Hyg. 1954;59:209-20.
35. Katz DE, Heisey-Grove D, Beach M, Dicker RC, Matyas BT. Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. Epidemiol Infect. 2006;134:935-41.
36. Ortega YR, Adam RD. *Giardia*: overview and update. Clin Infect Dis. 1997;25:545-50.
37. Monis PT, Thompson RC. *Cryptosporidium* and *Giardia* – zoonoses: fact or fiction? Inf Gen Evol. 2003;3:233-44.

38. Thompson RC. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol.* 2004;126:15-35.
39. Xiao L, Fayer R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol.* 2008;38:1239-55.
40. Lim L, McFadden GI. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos. Trans. R Soc Lond B Biol Sci.* 2010;365:749-63.
41. Zhu G, Keithly JS, Philippe H. What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50:1673-81.
42. Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, *et al.* Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Scienc.* 2004;304:441-5.
43. Xu P, Widmer G, Wang Y, Ozaki LS, Alves JM, Serrano MG, *et al.* The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature.* 2004;431:1107-12.
44. Cavalier-Smith T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *Eur J Protistol.* 2014;50:472-95.
45. Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitol.* 2014;141:1667-85.
46. Ryan U, Paparini A, Monis P, Hijjawi N. It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implication for the water industry? *Water Res.* 2016;105:305-13.
47. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: update. *Exp Parasitol.* 2010;124:80-89.
48. Fayer R. Taxonomic considerations regarding the species and genotypes of *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol.* 2010;124:90-7.
49. Lobo ML, Xiao L, Antunes F, Matos O. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Lett Appl Microbiol.* 2009;48:732-7.

50. Smith JL. *Cryptosporidium* and *Giardia* as agents of foodborne disease. J Food Prot. 1993;56:451-61.
51. Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. Survival of *Cryptosporidium* parvum oocysts under various environmental pressures. App Environ Microbiol. 1992;58:3494-500.
52. Korich DG, Mead JR, Madore MS, Sinclair NA, Sterling CR. Effect of ozone, chlorine dioxide, chlorine and monochloroamine on *Cryptosporidium* oocysts viability. App Environ Microbiol. 1990;56:1423-28.
53. Pereira JT, Soccol VT, Costa EA, Osaki SC, Paulino RC. *Cryptosporidium* spp.: para controlar é necessário conhecer. Rev Saúde e Ambiente. 2009;10:13-25.
54. Heller L, Bastos RK, Vieira MB, Bevilacqua PD, De Brito LL, Mota SM *et al.* Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. Epidemiol Serv Saúde. 2004;13:79-92.
55. Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002;8:634-40.
56. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004;363:1965-76.
57. Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. Int J Parasitol. 2008;38:1359-70.
58. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30:1217-58.
59. Germano PM, Germano MI. Toxoplasmose. In: Germano PML, Germano MIS, Higiene e vigilância sanitária de alimentos. 2011;4:440-8.
60. Frenkel JK. Toxoplasma in anda round us. Biosci J. 1973;23:343-52.
61. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 1998;28:1019-24.
62. Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 2009;39:859-946.
63. Bahia-Oliveira LM, Jones J, Azevedo-Silva J, Alves CF, Oréface F, Addiss DG. Highly endemic waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. Emerg Infect Dis. 2003;9:55-62.

64. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev. 2005;6:41-61.
65. Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J Protozool. 1972;19:155–77.
66. Dubey JP. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. J Parasitol. 2001;87:215–9.
67. Kawazoe U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linard PM, organizadores. Parasitologia humana, 9^a.ed. São Paulo: Editora Atheneu; 1995. p. 174-200.
68. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998;11:267–99.
69. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker CJ, editores. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 918-1041.
70. Freyre A, Dubey JP, Smith DD, Frenkel JK. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infection in cats. J Parasitol. 1989;75:750-5.
71. Dubey JP. *Toxoplasma gondii*, In Baron SR, editor. Medical Microbiology, 4th ed. Galveston:University of Texas; 1996. Capítulo 84.
72. Petersen E, Vesco G, Villari S, Buffolano W. What do we know about risk factors for infection in humans with *Toxoplasma gondii* and how can we prevent infections? Zoonoses Pub Health. 2010;57:8-17.
73. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. Parasitol. 2012;10:1-50.
74. Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnancy: Results of a Prospective Case-Control Study in Norway. Am J Epidemiol. 1996;144:405–12.
75. Pereira-Chioccolla VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. Future Microbiol. 2009;4:1363-79.

76. Fabiani S, Pinto B, Bonuccelli U, Bruschi F. Neurobiological studies on the relationship between toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases. *J Neurol Sci.* 2015;15:3-8.
77. Ngoungou EB, Bhalla D, Nzoghe A, Darde ML, Preux PM. Toxoplasmosis and epilepsy - systematic review and meta analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:1-10.
78. Murata FH, Ferreira MN, Camargo NS, Santos GS, Spegiorin LC, Silveira-Carvalho AP, *et al.* Frequency of anti- *Toxoplasma gondii* IgA, IgM, and IgG antibodies in high-risk pregnancies, in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49:512-4.
79. Fuglewicz AJ, Piotrowski P, Stodolak A. Relationship between toxoplasmosis and schizophrenia. A review *Adv Clin Exp Med.* 2017;26:1031-6.
80. De Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, *et al.* Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:326-9.
81. Meireles LR, Ekman CC, Andrade HF, Luna EJ. Human toxoplasmosis outbreaks and the agent infecting form findings from a systematic review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57:369-76.
82. Galvani AT, Christ AP, Padula JA, Barbosa MR, de Araújo RS, Sato MI, *et al.* Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in surface water samples in São Paulo, Brazil. *Par Res.* 2019;118:6631-40.
83. Hall SM, Pandit A, Golwilkar A, Williams TS. How do Jains get *Toxoplasma* infection? *Lancet.* 1999;354:486-7.
84. Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac Renton JL, Bell A, Eng SB, *et al.* Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet.* 1997;350:173-7.
85. Dubey JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* 2004;126:57–72.
86. Afonso E, Lemoine M, Pouille ML, Ravat MC, Romand S, Thulliez P, *et al.* Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. *Int J Parasitol.* 2008;38:1017–23.
87. Mansfield LS, Gajadhar AA. *Cyclospora cayetanensis*, a food- and waterborne coccidian parasite. *Vet Parasitol.* 2004;126:73-90.

88. Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH, Cama VA, Díaz F. *Cyclospora* species: a new protozoan pathogen of humans. *N Engl J Med*. 1993;328:1308-12.
89. Ortega YR, Nagle R, Gilman RH, Watanabe J, Miyagui J, Quispe H, *et al*. Pathologic and clinical findings in patients with cyclosporiasis and a description of intracellular parasite life-cycle stages. *J Infect Dis*. 1997;176:1584-9.
90. Eberhard ML, Ortega YR, Hanes DE, Nace EK, Do RQ, Robl MG, *et al*. Attempts to establish experimental *Cyclospora cayetanensis* infection in laboratory animals. *J Parasitol*. 2000;86:577-82.
91. Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. *J Parasitol*. 1994;80:625-29.
92. CDC, 1998. Incidence of foodborne illnesses—FoodNet, 1997. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 47, 782–786.
93. Brennan MK, MacPherson DW, Palmer J, Keystone JS. Cyclosporiasis: a new cause of diarrhea. *Can Med Assoc J*. 1996;155:1293-6.
94. Behera B, Mirdha BR, Makharia GK, Bhatnagar S, Dattagupta S, Samantaray JC. Parasites in patients with malabsorption syndrome: a clinical study in children and adults. *Dig Dis Sci*. 2008;53:672-9.
95. Connor BA, Reidy J, Soave R. Cyclosporiasis: clinical and histopathologic correlates. *Clin Infect Dis*. 1999;28:1216–22.
96. Fryauff DJ, Krippner R, Prodjodipuro P, Ewald C, Kawengian S, Pegelow K, *et al*. *Cyclospora cayetanensis* among expatriate and indigenous populations of West Java, Indonesia. *Emerg Infect Dis*. 1999;5:585-8.
97. Fregonesi BM, Sampaio CF, Ragazzi MF, Tonani KA, Segura-Muñoz SI. *Cryptosporidium* e *Giardia*: desafios em águas de abastecimento público. *O Mundo da Saúde*. 2012;36:602-9.
98. Weintraub JM. Improving *Cryptosporidium* testing methods: a public health perspective. *J Water Health*. 2006;4:23-6.
99. McCuin RM, Clancy JL. Modifications to United States Environmental protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* cysts in Water. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:267-74.

100. Meirelles MV. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. Rev Bras Parasitol Vet. 2010;19:197-204.
101. Hachich EM, Galvani AT, Padula JÁ, Menegon N, Sato MI. Importância do controle dos parasitos patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas captadas para consumo humano. In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e ambiental; 2000; Porto Alegre-RS.
102. Andrews RH, Monis PT, Ey PL, Mayrhofer G. Comparação dos níveis de variação genética intra-específica dentro de *Giardia muris* e *Giardia intestinalis*. Int J Parasitol. 1998;28:1179-85.
103. Thompson RC, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. Adv Parasitol. 2004;58:69-137.
104. Marques DK. Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros. Corumbá: EMBRAPA; 2002.
105. Franco RM, Hachich EM, Sato MI, Naveira RM, Silva EC, Campos MM, *et al.* Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. Epidemiol Serv Saúde. 2012;21:233-42.
106. Xagorarakis I, Kuo DH, Wong K, Wong M, Rose JB. Occurrence of Human Adenoviruses at Two Recreational Beaches of the Great Lakes. Appl Environ Microbiol. 2007;73:6874-7881.
107. Lee ES, Lee MH, Kim BS. Evaluation of propidium monoazide-quantitative PCR to detect viable *Mycobacterium fortuitum* after chlorine, ozone, and ultraviolet disinfection. Int J Food Microbiol. 2015;210:143–8.
108. Cattani F, Barth VC, Nasário JS, Ferreira CA, Oliveira SD. Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* group species in milk by propidium monoazide quantitative real-time PCR. J Dairy Sci. 2016;99:2617-24.
109. Rousseau A, Villena I, Dumètre A, Escotte-Binet S, Favennec L, Dubey JP, *et al.* Evaluation of propidium monoazide-based qPCR to detect viable oocysts of *Toxoplasma gondii*. Paras Res. 2019;118:999-1010.
110. Sheather L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. J Comp Pathol Therap. 1923;36:266-75.

111. Ogassawara S, Benassi S, Hagiwara MK, Larsson CE. *Isospora* spp.: estudo sobre a ocorrência na espécie felina, na cidade de São Paulo. Rev Microbiol São Paulo. 1980;11:126-30.
112. Sodre, FC, Zapata, MT, Pinto, PL. Manual de Diagnóstico Laboratorial dos Agentes Oportunistas: parasitos intestinais e *Pneumocystis jirovecii*. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
113. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1989;27:1787–1792.
114. Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. Appl Environ Microbiol. 1995;61:3849-55.
115. Spano F, Putignani L, Guida S, Crisanti A. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (Thrombospondin-Related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. Exp Parasitol. 1998;90:195-8.
116. Mahbubani MH, Bej AK, Perlin MH, Schaefer FW, Jakubowski, Atlas RM. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using Polymerase Chain Reaction and gene probes. J Clin Microbiol. 1992;30:74-8.
117. Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. Mol Biochem Parasitol. 2008;160:75-80.
118. Belaz S, Gangneux JP, Dupretz P, Guiguen C, Robert-Gangneux F. A 10-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. J Clin Microbiol. 2015;53:1294-300.
119. Jothikumar N, da Silva AJ, Moura I, Qvarnstrom Y, Hill VR. Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. J Med Microbiol. 2008;57:1099-105.
120. Murphy HR, Cinar HN, Gopinath G, Noe KE, Chatman LD, Miranda NE, *et al.* Interlaboratory validation of an improved method for detection of *Cyclospora cayetanensis* in produce using a real-time PCR assay. Food Microbiol. 2018;69:170-8.
121. Camilo LM, Pereira-Chioccia VL, Gava R, Meira-Strejevitch CS, Vidal JE, Brandão de Mattos CC, *et al.* FAMERP Toxoplasma Research Group. Molecular

diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in São Paulo. *Braz J Infect Dis*. 2017;21:638-47.

122. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, *et al*. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends Food Sci Tech*. 2014;37:115-26.

123. Brasil. Agência Nacional de Águas. Atlas Brasil: abastecimento urbano de água: panorama nacional. Brasília: ANA: Engecorps/Cobrape; 2010.

124. Franco RM, Rocha-Eberhardt R, Cantusio Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2001;43:109-11.

125. Borja PC. Política pública de saneamento básico: uma análise da recente experiência brasileira. *Saúde e Sociedade*. 2014;23:432-47.

126. World Health Organization 2010. World Health Statistics. Geneva: WHO;2010. [acessado em 3 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.who.int/whosis/whostat/2010/en/>.

127. Teixeira JC, Oliveira GS, Viali AM, Muniz SS. Estudo do impacto das deficiências de saneamento básico sobre a saúde pública no Brasil no período de 2001 a 2009. *Eng sanit Ambient*. 2014;19:87-96.

128. Júlio C, Sá C, Ferreira I, Martins S, Oleastro M, Ângelo H, *et al*. Waterborne transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* river beaches in Souther Europe (Portugal). *J Water Health*. 2012;10:484-96.

129. Pereira-Chioccia VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol*. 2009;4:1363-79.

130. Vidal JE, Diaz AV, de Oliveira AC, Dauar RF, Colombo FA, Pereira-Chioccia VL. Importance of high IgG anti-*Toxoplasma gondii* titers and PCR detection of *T. gondii* DNA in peripheral blood samples for the diagnosis of AIDS-related cerebral toxoplasmosis: a case-control study. *Braz J Infect Dis*. 2011;15:356-9.

131. Djurković-Djaković O, Dupouy-Camet J, Giessen JV, Dubey JP. Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective. *Food and Waterb Parasitol*. 2019;15:1-4.

132. Young I, Smith BA, Fazil A. A systematic review and meta - analysis of the effectis of extreme weather events and other weather - related variables on

Cryptosporidium and *Giardia* in fresh surface waters. J Water Health. 2015;13:1–17.

133. McCuin RM, Clancy JL. Modifications to United States Environmental protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* cysts in Water. Appl Environ Microbiol. 2003;69:267-74.

134. Rigo CR, Franco RM. Comparação entre os métodos de Ziehl-Neelsen modificado e Acid-Fast-Trichrome para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35:209-14.

135. Garcia JG, Simões MJ, Alvarenga VL. Avaliação de diferentes métodos no diagnóstico laboratorial de *Giardia lamblia*. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2006;27:253-8.

136. Clancy JL, Gollnitz WD, Tabib Z. Commercial laboratories: how accurate are they? J Am Water Works Assoc. 1994;86:89-97.

137. Atherholt TB, Lechevallier MW, Norton WD, Rosen JS. Effect of rainfall on *Giardia* and Crypto. J Am Water Works Assoc. 1998;90:66-80.

138. Weiss PH, Quadros RM, Milletti LC, Marques SM. Comparação de seis métodos de extração de DNA genômico de *Giardia duodenalis*. Clin Biomed Res. 2016;1:1-7.

139. Paulino RC. Detecção Molecular de *Giardia* spp. em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP. Paraná [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.

140. Lima JF, Montenegro LM, Montenegro RD, Cabral MM, Lima AS, Abath FG, *et al.* Desempenho da técnica nested PCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos. J Bras Pneumol. 2009;35:690-7.

141. Abath FG, Melo FL, Werkhauser RP, Montenegro L, Montenegro R, Schindler HC. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. BioTechniques. 2002;33:1210-14.

142. Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. Exp Parasitol. 2010;124:10–25.

143. Vieira FP, Alves MG, Martins LM, Rangel AL, Dubey JP, Hill D, *et al.* Waterborne toxoplasmosis investigated and analysed under hydrogeological assessment: new data and perspectives for further research. Mem Instituto Oswaldo Cruz. 2015;110: 929-35.

144. Hussain MA, Stitt V, Szabo EA, Nelan B. *Toxoplasma gondii* in the Food Supply. *Pathogens*. 2017;6:1-7.
145. Camilo LM, Pereira-Chioccola VL, Gava R, Meira-Strejevitch CD, Vidal JE, Brandão de Mattos CC, *et al.* Toxoplasma Research Group. Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2017;21:638-47.
146. Lass A, Pietkiewicz H, Szostakowska B, Myjak P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:1101-8.
147. La Carbona S, Dumètre A, Rousseau A, Robertson LJ, Gargala G, Escotte-Binet S, *et al.* Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. *Parasite*. 2018; 25:14.
148. Boni DM. Avaliação da viabilidade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água filtrada obtida após tratamento convencional com flotação e ozonização [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos; 2016.
149. Zeng D, Chen Z, Jiang Y, Xue F, Li B. Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens. *Front Microbiol*. 2016;7:1833.
150. Ferguson DJ, Hutchison WM, Siim JC. The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1975;83:491–505.
151. Contreras PJ, Urrutia H, Sossa K, Nocker A. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *J Microbiol Methods*. 2011;87:89–95.
152. Robert-Gangneux F, Dupretz P, Yvenou C, Quinio D, Poulain P, Guiguen C, *et al.* Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29:33–8.
153. Yang W, Lindquist HD, Cama V, Schaefer FW, Villegas E, Fayer R, *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water sample concentrates by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:3477–83.
154. Hernandez-Cortazar, Ivonne B, Acosta-Viana KY, Guzman-Marin E, Ortega-Pacheco A, Segura-Correa JC, *et al.* Presence of *Toxoplasma gondii* in Drinking

Water from an Endemic Region in Southern Mexico. Foodborne Pathog Dis. 2017;14:288-92.

155. Triviño-Valencia J, Lora F, Zuluaga RD, Gomez-Marin J. Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. Parasitol Res. 2016;115:1789-97.

156. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. Brasília 2010.

157. Ashford RW. Occurrence of an undescribed coccidian in Papua New Guinea. Ann Trop Med Parasitol. 1979;73:497-500.

158. Zini RM, Santos CC, Almeida IA, Peresi JT, Marques CC. Atuação do laboratório de Saúde Pública na elucidação do surto de diarreia causado por *Cyclospora cayetanensis* no município de General Salgado – SP. Rev IAL. 2004;63:116-21.

159. Moura JE, Penaforte C, Kerti R, Daufenbach LZ, Camargo NJ, Trevisan R, *et al.* Surto de doença diarreica aguda por *Cyclospora cayetanensis*, Antonina, Paraná. Bol Eletr Epidemiolo. 2002;3:3-5.

160. Veiga T, Paula RA, Faria T. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em unidades de alimentação escolar. Rev Univ Vale Rio Verde. 2013;11:135-44.

161. Barçante JM, Barçante TA, Narciso TP, Braz MS, Silva EC. Ocorrência de doenças veiculadas por água contaminada: um problema sanitário e ambiental. Rev Edu Amb. 2014;19:6-17.

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23/03/2016, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 089/16 intitulado: “ESTUDO DA BIODIVERSIDADE MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE PROTOZOÁRIOS PATOGÊNICOS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA” apresentado pelo Departamento de NENHUM

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Vera Lucia Pereira Chioccola

Pesquisador (a) Executante: Maria Aparecida Moraes Marciano

CEP-FMUSP, 28 de Março de 2016.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ DE SÃO PAULO.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL

São Paulo, 5 de outubro de 2015.

Projeto: CTC 29 H/ 2015

Estudo da biodiversidade molecular e morfológica dos protozoários patogênicos de veiculação hídrica.

Coordenação: PqC Maria Aparecida Moraes Marciano (aluna de doutorado) e
Dra. Vera Lucia Perelra Chioccola (orientadora)

Prezado(s) Coordenador(es),

Comunicamos que o projeto foi aprovado quanto ao Mérito Científico pelo Conselho Técnico Científico do IAL com Ciência da Direção Geral e cadastro provisório Nº CTC-IAL 29H/2015.

Salientamos que o cadastro final no CTC será emitido após o recebimento de cópia dos pareceres dos CEP (CEPIAL e/ou CEUA), quando pertinente.

Atenciosamente,

MARIA DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY
PRESIDENTE DO CTC/IAL

1ª Via: Coordenador ✓
2ª Via: Diretor de Centro
3ª Via: CTC

ANEXO C - DIPLOMA DE HONRA AO MÉRITO PELO TRABALHO APRESENTADO EM CONGRESSO.

ANEXO D - NOTA CIENTÍFICA APRESENTADA EM CONGRESSO.

USO DA PCR EM TEMPO REAL PARA ESTUDO DO LIMITE DE DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII* EM ÁGUA.

USE OF REAL - TIME PCR FOR STUDY OF THE DETECTION LIMIT OF *TOXOPLASMA GONDII* OOCYSTS IN WATER.

Maria A. M. Marciano¹; Maria L. Barbosa²; Ricardo Gava³; Cristina S. Meira Strejevitch; Vera L. Pereira-Chiocola³

¹Núcleo de Morfologia e Microscopia de Alimentos, ²Centro de Alimentos e ³Centro de Parasitologia e Micologia
Instituto Adolfo Lutz, 01246-000 São Paulo, SP, Brasil.

Introdução

O controle das doenças de transmissão hídrica e alimentar, em especial, as parasitárias são amplamente discutidas na área de Saúde Pública. Dentro deste contexto, a infecção por *Toxoplasma gondii* está diretamente relacionada às condições sanitárias e hábitos alimentares da população (Nardi et al., 2012).

A importância da toxoplasmose está associada ao fato de ser uma parasitose cosmopolita altamente difundida. Acometer fetos e crianças constituindo em uma infecção oportunista que se manifesta com gravidade sempre que o paciente venha a sofrer imunodeficiência (Hill e Dubey, 2002).

A toxoplasmose não é uma doença de notificação obrigatória, não havendo, portanto, dados epidemiológicos concretos sobre sua real prevalência no Brasil. Surto de veiculação hídrica e alimentar são pouco notificados e dificultam o registro da doença (Bahia-Oliveira et al., 2003).

Oocistos presentes no ambiente são as formas evolutivas de *T. gondii*, o qual está relacionado ao seu ciclo sexuado enteroepitelial em felinos, sendo liberado pelas fezes dos felinos. Os oocistos apresentam grande resistência ao meio ambiente e permanecem viáveis no solo por até 18 meses, podendo contaminar alimentos e água (Freyre et al., 1989; Dubey e Beattie, 1988; Hill et al., 2005).

Os dados em relação a pesquisa de oocistos de *T. gondii* em água, os dados são escassos na literatura. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar o limite de detecção de oocistos de *T. gondii* pela PCR em tempo real (qPCR) para aplicação no monitoramento do agente em amostras de água destinadas ao consumo humano.

Material e Métodos

Oocistos

Para a execução desse trabalho foram utilizados oocistos de *T. gondii* purificados de gatos experimentalmente infectados da cepa Br1 cedidos pelo

Extração do DNA

As amostras foram previamente mantidas em banho-maria por 20 minutos a 70°. A extração de DNA dos oocistos foi realizada com kit comercial (Qiagen QiAamp DNA®) de acordo com as instruções do fabricante partindo de 100 µL da solução diluída.

Quantificação por qPCR

A partir do DNA extraído dos oocistos foram realizadas as qPCR(s) utilizando 2 marcadores moleculares específicos para o Gene B1 (Gene B1) e para a região repetitiva do genoma de 529 pb (Rep529). As reações foram realizadas em triplicata e incluídos dois controles, um negativo (água) e um positivo (DNA extraído de taquizoítos de *T. gondii*).

Análise dos dados

A análise da curva padrão e os cálculos de regressão linear foram feitos por modelos matemáticos do programa estatístico Graph Pad Prism 5.0.

Resultados e Discussão

O Instituto Adolfo Lutz como laboratório de Saúde Pública tem como missão desenvolver metodologias analíticas que atendam as demandas das vigilâncias frente a agravos a saúde. O Núcleo de Morfologia e Microscopia e o Centro de Micologia e Parasitologia atuam em conjunto na pesquisa e aprimoramento de técnicas moleculares para detecção de protozoários patogênicos em água para consumo humano, dentre os quais, *T. gondii*.

O presente trabalho é parte de um projeto amplo de estudo da qualidade da água frente a presença de parasitos. Conhecer o limite de detecção e a sensibilidade das metodologias analíticas é de extrema relevância.

Nossos resultados mostram que houve amplificação exponencial das amostras diluídas seriadamente, como se pode observar na figura 3A. O marcador molecular REP529 apresentou maior eficiência em detectar os oocistos. O limite de detecção foi de 10 oocistos (figura 3B), enquanto o marcador molecular Gene B1 apresentou um limite de detecção de 100 oocistos (figura 3C). Com estes dados, as qPCR(s) foram realizadas sempre utilizando-se o marcador molecular Rep-529

ANEXO E - TRABALHO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO NA REVISTA EXPERIMENTAL PARASITOLOGY.

Manuscript Details

Manuscript number	EP_2019_283
Title	Toxoplasma gondii oocysts in water: detection of viability
Article type	Research Paper

Abstract

Water acts as an efficient source of pathogens. *T. gondii* oocysts spread in the environment are an important source of toxoplasmosis for human and animals. *T. gondii* outbreaks have been related in different world regions and most of them were correlated with contaminated water with oocysts. This study was aimed to investigate a methodology (in two steps) to support the investigation of outbreaks. The analyzes included the use of vital dyes for microscopy; and the association of real-time PCR (qPCR) and evaluation of viability of *T. gondii* oocysts in water samples. One aliquot of oocysts purified from cat stools was incubated at 25 °C, for 30 minutes and other, incubated at 100 °C, for 30 minutes. Both aliquots were analyzed by microscopy after trypan blue and neutral red staining. For molecular investigation of viable oocysts, this study opted to treated oocysts with propidium monoazide (PMA), a DNA intercalant from cells with damaged walls. Consequently, the amplification of DNA in qPCR is prevented. The oocysts staining with trypan blue and neutral red dyes were able to determine the viable or non-viable oocysts. PMA inhibited the qPCR in DNA from non-viable oocysts. These data confirm the possibility to discriminate viable and non-viable oocysts with qPCR after PMA treatment in oocysts. The association of the microscopic analysis after vital dyes; and qPCR after PMA treatment was efficient to determine *T. gondii* oocyst viability in water samples.

Keywords	Viability, Toxoplasma gondii, Oocysts, Vital Dyes, Propidium Monoazide, PMA
Corresponding Author	Vera Lucia Pereira-Chioccola
Corresponding Author's Institution	Instituto Adolfo Lutz
Order of Authors	maria mary, Rafaela Aparecida Silva, Maria Luisa Barbosa, Antônio Roberto Souza Ferreira, Vera Lucia Pereira-Chioccola

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter oocysts PMA EP.docx [Cover Letter]

Highlights oocysts PMA ExP.docx [Highlights]

Graphical abstract oocysts PMA ExP.pptx [Graphical Abstract]

Manuscript oocysts PMA EP.docx [Manuscript File]

Figures 1 2 oocysts PMA EP.pptx [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.