UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

Bruno Kuchkarian

Caracterização molecular de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. recuperados de amostras de água de reúso.

São Paulo

Abril 2021

Caracterização molecular de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. recuperados de amostras de água de reúso.

Bruno Kuchkarian

Versão Revisada

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

Área de Concentração: Saúde Pública

Orientadora: Drª. Maria Tereza Pepe Razzolini

São Paulo

Abril 2021

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Denise de Fátima Dutra Kuchkarian e Pedro Dikran Kuchkarian, aos meus irmãos João Vítor Kuchkarian e Pedro Dikran Kuchkarian Jr. e à minha companheira Amanda Paula Tavares Feitoza. O apoio de vocês foi, é e continuará sendo a grande força motriz que me motiva a seguir em frente e a sempre querer chegar mais longe.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Pedro Dikran Kuchkarian e Denise de Fátima Dutra Kuchkarian, por tudo o que me ensinaram nesta vida, por todo o apoio, por todo o amor e carinho. Amo vocês.

Aos meus irmãos Pedro Dikran Kuchkarian Jr. e João Vítor Kuchkarian, pelo companheirismo, pelos animes assistidos e pelas partidas de jogos online, pela amizade e pelo carinho.

Á minha avó Elisabeth Kuchkarian, por todo o apoio e por todo o carinho que sempre me deu.

Aos meus falecidos avós, João Dutra Sobrinho, Eliza Helena Dutra e Pedro Kuchkarian.

À minha companheira Amanda Paula Tavares Feitoza, por todo amor, amizade, apoio e sorrisos. Por todos os momentos maravilhosos que me proporciona.

À minha orientadora Profª Dra. Maria Tereza Pepe Razzolini, pela orientação, pelos conselhos, pela compreensão, pelo apoio e pela oportunidade. Sou eternamente grato por ter sido tão bem acolhido na FSP-USP.

Ao meu grande amigo Msc. Ronan Rocha Coelho, por todo o apoio.

À Dra. Milena Dropa, por toda a ajuda, amizade e apoio no laboratório de biologia molecular. Aprendi muito, agradeço imensamente.

À Dra. Ronalda Araújo, pelos conselhos, pela paciência e pelo auxílio quando mais precisei.

À Dra. Miriam Lopes da Silva por todo o auxílio com a parte prática no laboratório de biologia molecular. Agradeço imensamente pela ajuda com a análise dos dados moleculares.

À Dra. Solange Rocha Martone pela amizade, pela ajuda sempre que precisei e por todos os conselhos.

À Dra. Francisca Alzira dos Santos Peternella, pela amizade, pelo carinho e pelos puxões de orelha. Sei que mereci.

Aos meus grandes amigos Pedro, Thiago, Kim, Diego, Paulo, Alex, Ricardo, Carlos, Marco, Nelson, Kadu, Maurício e Daniel.

Às minhas colegas e amigas do departamento de saúde ambiental, em especial para Giovanna Santiago, Msc. Bruna Breternitz e Msc. Geyse aparecida.

Aos colegas e amigos do departamento de entomologia da FSP-USP.

À Dra. Veridiana Karmann Bastos, por todo o apoio, amizade e companheirismo. Uma pessoa maravilhosa com quem pude contar nos momentos mais difíceis. Agradeço ainda pelas imagens cedidas para a ilustração das ETEs.

Ao bom amigo e colega temporário de departamento Dr. Lucas Ariel Totaro Garcia, pelo companheirismo e pela enorme disponibilidade em me ajudar no que fosse preciso.

Aos integrantes do grupo de pesquisa NARA – Núcleo de Pesquisas em avaliação de riscos ambientais.

Aos amigos Mateus Amaral, Amanda de Jesus e Mariane Helen, por toda a amizade durante estes anos do mestrado e por todo o companheirismo que tanto ajudou em minha caminhada.

À comunidade Armênia e ao apoio recebido durante minha graduação pela fundação Calouste Gulbenkian.

Aos meus Padrinhos Mônica e Gregório, aos meus tios e tias, primos e primas pelo carinho e pela proximidade que sempre tiveram.

Ao meu priminho Davi por toda a alegria que me proporciona.

Ao amigo Dr. Henrique Ribeiro Angelo. Seu apoio foi essencial para a conclusão deste trabalho.

À todos os membros da banca avaliadora, pela disponibilidade e pelas contribuições que terão muito a acrescentar a este trabalho.

Ao conselho nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), pelo fomento à pesquisa e por proporcionar condições para que trabalhos como este sejam feitos.

RESUMO

KUCHKARIAN, B. Caracterização molecular de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. recuperados de amostras de água de reúso. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2020.

O aumento da demanda de recursos hídricos causado pelo crescimento da população mundial, pela necessidade de produção de alimentos e utilização na indústria é uma realidade. Como enfrentamento a este cenário de segurança hídrica, existe uma crescente tendência mundial de uso de águas recicladas para fins que demandam águas de menor qualidade, poupando assim recursos hídricos e o meio ambiente. O presente estudo teve como objetivo identificar as espécies *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium meleagridis* e *Giardia duodenalis* (em seus assemblages A e B) nas águas de reúso provenientes das duas ETEs localizadas na cidade de São Paulo. Para a identificação das espécies *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium meleagridis* e *Cryptosporidium hominis* foram realizadas análise por regiões do gene 18S rRNA, com os primers descritos por ARAUJO (2018), onde foram detectadas em 5,76% (3/52) das amostras de água de reúso analisadas pelo método real-time PCR (qPCR). A espécie *Giardia duodenalis* foi identificada através de um fragmento do gene *Gdh*, com os primers descritos por (CACCIO *et al*, 2008) e foi detectada em 11,53% (6/52) das amostras de água de reúso analisadas. Após a identificação das amostras via qPCR, foi realizado o nested PCR para que os fragmentos de DNA identificados pudessem ser sequenciados, onde confirmamos a presença das espécies de *Cryptosporidium* spp. anteriormente citadas, porém as amostras de *Giardia* spp. não apresentaram resultados positivos no sequenciamento, não sendo possível a identificação dos assemblages. Este trabalho subsidia, com dados de presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nas águas de reúso produzida por duas ETEs da cidade de São Paulo, a elaboração de uma regulamentação adequada para o uso deste recurso em ambiente urbano com o intuito de se proteger a saúde da população exposta, em especial das populações mais vulneráveis e de se reduzir o risco de infecção pelo contato ocupacional.

Palavras-Chave: *Cryptosporidium*, *Giardia* spp., água de reúso, molecular.

ABSTRACT

KUCHKARIAN, B. Molecular characterization of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. recovered from recycled water samples. [Dissertation]. São Paulo, School of Public Health, University of São Paulo, 2020.

The increasing demand for water resources caused by the growth of the world's population, the food production and use in industry is a reality. With this water crisis scenario, there is a growing worldwide trend towards the use of recycled water for purposes that demand lower water quality, thus saving water resources and the environment. In a previous study, we identified the presence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in reuse waters from two wastewater treatment plants (WWTPs) in the city of São Paulo (called stations "A" and "B") using the USEPA 1693/2014 method. The present study aimed to identify the species *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium meleagridis* and *Giardia duodenalis* (in their assemblages A and B) in the reuse waters from the WWTPs in the city of São Paulo. Different molecular analyzes were carried out to identify the species found in the WWTPs. The species *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium meleagridis* and *Cryptosporidium hominis* were identified by regions of their 18S rRNA gene, with the primers described by ARAUJO (2018), and were detected in 5.76% (3/52) of the reuse water samples analyzed by real-time PCR (qPCR) method. The species *Giardia duodenalis* was identified through a fragment of the Gdh gene, with the primers described by (CACCIO *et al.*, 2008) was detected in 11.53% (6/52) of the analyzed water samples. After identifying the samples via qPCR, the nested PCR was performed so that the identified DNA fragments could be sequenced, where we confirmed the presence of the previously mentioned *Cryptosporidium* spp., however the *Giardia* spp. samples did not show positive results in the sequencing, being not possible the identification of assemblages. This work subsidizes, with data on the presence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in the two studied WWTPs in the city of São Paulo, the elaboration of an adequate regulation for the use of this resource in an urban environment, protecting the health of the exposed population, especially the most vulnerable populations and reducing the risk of infection by occupational use.

Keywords: *Giardia* spp., *Cryptosporidium*, recycled water, molecular.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10

1.1 EPIDEMIOLOGIA DE GIARDÍASE E CRIPTOSPORIDIOSE 13

1.2 OCORRÊNCIA DE *Giardia* spp. E *Cryptosporidium* 14

1.3 LEGISLAÇÃO 16

1.3.1 Legislação brasileira 16

1.3.2 Legislação internacional 18

2. OBJETIVOS 21

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 21

3. MÉTODOS 22

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS 22

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA 23

3.2.1 Estação de tratamento de esgoto "A" 23

3.2.2 Estação de tratamento de esgoto "B" 25

3.3 RASPAGEM DE LÂMINAS E RECUPERAÇÃO DOS CISTOS E OOCISTOS 27

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA 27

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE *Giardia* spp. E *Cryptosporidium* spp. POR qPCR 27

3.6 NESTED PCR 29

3.6.1 Identificação de *Giardia* spp. por nested PCR 29

3.6.2 Identificação de *Cryptosporidium* spp. por nested PCR 30

3.7 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS 32

4. RESULTADOS 33

4.1 *Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium hominis e Cryptosporidium meleagridis* 33

4.2 *Giardia duodenalis* 38

5. DISCUSSÃO 41

6. CONCLUSÃO 46

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 – Sequência dos pares de primers e das sondas utilizadas para a caracterização molecular de *C. parvum, C. hominis, C. meleagridis* e para a caracterização molecular de *Giardia duodenalis* 28

Quadro 2 – Sequência dos pares de primers utilizados para a identificação molecular de *Giardia* spp. por Nested PCR (CACCIO *et al.,* 2008) e para a identificação molecular de *Cryptosporidium* spp. por Nested PCR (SILVA *et al*., 2013; XIAO *et al*., 1999) 31

Tabela 1 – Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo método USEPA 1693/2014 e identificação de espécies por Real time PCR das amostras da ETE "A" 34

Tabela 2 – Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo método USEPA 1693/2014 e identificação de espécies por Real time PCR das amostras da ETE "B".....35

Tabela 3 – Resultados do sequenciamento das amostras positivas por qPCR para as espécies de *Cryptosporidium* spp. selecionadas.....37

Tabela 4 – Concentração de cistos de *Giardia* spp. pelo método USEPA 1693/2014 e identificação de espécies por Real time PCR das amostras da ETE "A".....39

Tabela 5 – Concentração de cistos de *Giardia* spp. pelo método USEPA 1693/2014 e identificação de espécies por Real time PCR das amostras da ETE "B".....40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de tratamento da ETE "A" esquematizado. 24

Figura 2 – Processo de tratamento da ETE "B" esquematizado 26

Figura 3 – Fluxograma dos processos utilizados para a análise das amostras.....32

Figura 4 – Resultado do qPCR para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água de reúso provenientes da ETE "B".....33

Figura 5 – Resultado do qPCR para detecção de *Giardia* spp. em amostras de água de reúso provenientes da ETE "A".....38

Figura 6 – Resultado do qPCR para detecção de *Giardia* spp. em amostras de água de reúso provenientes da ETE "B".....38

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda de recursos hídricos causado pelo crescimento da população mundial, pela necessidade de produção de alimentos e utilização na indústria é uma realidade. Estima-se que 4 bilhões de pessoas sofram por escassez hídrica grave ao menos um mês a cada ano (MEKONNEN & HOEKSTRA, 2016). Segundo BUREK *et al.* (2016) até 2050 a demanda mundial de água deve crescer de 20 a 30% tendo como base o ano de 2010. Como enfrentamento a este cenário de crise hídrica, existe uma crescente tendência mundial de uso de águas recicladas para fins que demandam de águas de menor qualidade, poupando assim recursos hídricos e o meio ambiente. A crise hídrica é uma ameaça a humanidade e seu enfrentamento requer diversas estratégias de gestão, como o uso de águas recicladas, dentre elas as águas de reúso oriundas de estações de tratamento de esgoto (WHO, 2006; USEPA, 2012; WWAP, 2017).

Esta tendência de reúso está alinhada à agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU, 2015), onde foram estabelecidos os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) com a finalidade de dar sequência aos Objetivos do Milênio (ODM) que foram estabelecidos no ano de 2000 e concluídos em 2015, cujo objetivo era promover uma sociedade mais igualitária, proteger o meio ambiente, a saúde e o bem-estar das populações. Como principais pontos dos ODS relacionados à gestão hídrica, destacam-se a preocupação com a qualidade e disponibilidade das águas utilizadas no abastecimento público, preservação dos recursos hídricos em geral, combate a doenças veiculadas pela água, riscos para a saúde humana (com ênfase aos grupos mais vulneráveis; crianças, imunodeficientes e idosos) e melhorias na gestão, conservação, recuperação e uso sustentável de ecossistemas terrestres e de água doce. Três destes objetivos (ODS) destacam-se quando discutimos o reúso de águas, são eles: Objetivo #6 - Assegurar a disponibilidade e gestão sustentável da água e saneamento para todas e todos, Objetivo #12 - Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis e, Objetivo #15 - Proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres (e de águas doces interiores), gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, deter e reverter a degradação da terra e deter a perda de biodiversidade (ONU, 2015).

A água de reúso é uma fonte sustentável de nutrientes, de energia e de matéria orgânica, que traz benefícios com implicações positivas na produção de alimentos e de

energia, proteção do meio-ambiente e mitigação das mudanças climáticas. No contexto de uma economia circular as águas de reúso são um valioso recurso para um desenvolvimento econômico equilibrado, para a proteção de recursos naturais e sustentabilidade ambiental (WWAP, 2017). Como enfrentamento colocado pelos ODS, existe um crescente interesse pela utilização de águas de reúso em diversos setores da sociedade. Este recurso é uma alternativa atrativa devido aos seus benefícios ambientais e econômicos para fins que não demandam de água de alta qualidade, como: irrigações paisagísticas, lavagens de vias públicas, processos industriais, uso na agricultura, descargas de sanitários e recarga de águas subterrâneas (OLIVEIRA, 2012; POHL & LENZ, 2017).

De acordo com ASANO (2007), águas de reúso são águas residuais que passaram por vários processos de tratamento para atender a critérios específicos de qualidade da água com a intenção de serem usados de maneira benéfica. O termo água reciclada é usado como sinônimo de água recuperada. ASANO também define a reutilização da água como "*tratamento ou processamento de águas residuais para torná-lo reutilizável com confiabilidade de tratamento definível e atendendo a critérios apropriados de qualidade da água*".

A reutilização de água tem também uma grande e crescente importância nos sistemas de abastecimento de água, com o objetivo de alcançar um uso eficiente dos recursos hídricos, garantir a proteção da saúde humana e ambiental e melhorar a gestão da água de forma sistemática. Mais alguns benefícios do reúso de água são: redução do consumo de energia associada à produção, tratamento e distribuição de água; aumento de benefícios ambientais como a redução do despejo de nutrientes e patógenos para as águas receptoras; menor exploração dos recursos hídricos; economia de recursos naturais e economia financeira (USEPA, 2012; WINPENNY; HEINZ; KOO-OSHIMA, 2010).

Segundo a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 2012), a água de reúso (ou água reciclada) é obtida pela reutilização de águas residuais (esgoto urbano e efluentes industriais) previamente tratadas, e a utilização deste recurso em meio urbano pode ser dividida de duas formas: uso onde a população tem acesso (áreas residenciais, campos de esportes, jardins de escolas públicas, parques, etc.) e, portanto, a água recuperada recebe tratamento e desinfecção diferenciados para obtenção de maior qualidade; e para ambientes de acesso restrito, fora do alcance da população em geral,

onde a qualidade da água de reúso pode ser mais flexível. O tratamento de águas residuais pode ser adaptado para atender aos requisitos de qualidade necessários para cada uso individual (MEDEIROS *et al*. 2012). No entanto, o tratamento adotado deve, especialmente, atingir qualidade sanitária suficiente no intuito de proteger a saúde das populações expostas a essas águas já que é reconhecida a ocorrência de patógenos neste recurso. Dentre os parasitas mais encontrados nos recursos hídricos, destacamos aqui os protozoários parasitas *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., bastante frequentes em corpos d'água, e que são responsáveis por casos de doenças gastrointestinais em todo o globo (KARANIS *et al*., 2007; HATAM *et al.,* 2015; EFSTRATIOU *et al*., 2017). Estes parasitas são abundantes no meio ambiente, com presença global e, possuem relevância em saúde pública pois suas formas císticas são resistentes a tratamentos convencionais de água, como a cloração (especialmente *Cryptosporidium* spp.), além de possuírem alta infectividade e persistência, podendo sobreviver em reservatórios de água por longos períodos em suas formas císticas (NISHI *et al*., 2012; NASSER, 2016; SANTOS & DANIEL, 2017). Um único indivíduo contaminado por *Giardia* spp. ou *Cryptosporidium* spp. pode disseminar grandes quantidades de cistos e/ou oocistos no ambiente, impactando a saúde humana e configurando-se em um desafio em Saúde Pública, já que a infecção pode se dar com baixas doses de cistos e oocistos (WHO, 2011; WHO, 2014). A OMS (2006) apud WESTRELL (2004) aponta que a taxa de excreção de *Cryptosporidium* spp. é de 10^{7-8} /g de fezes e *Giardia* spp. é de 10^{5-8}/g de fezes, tornando um indivíduo contaminado capaz de disseminar grandes quantidades de cistos e oocistos no meio ambiente, o que pode ser um agravante em casos de esgotamento ausente ou insuficiente.

De acordo com PUTIGNANI & MENICHELLA (2010), a ingestão de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em pequenas doses (de 10 a 30 oocistos), já é suficiente para causar infecção em pessoas consideradas saudáveis. Os oocistos são também persistentes, podendo ser excretados até 50 dias após o término dos sintomas da diarreia. A ingestão dos cistos de *Giardia* spp. para o homem é de apenas 10 cistos, mas os indivíduos infectados podem excretar até 900 milhões de cistos por dia em suas fezes (OPAS, 2003).

O presente estudo traz dados sobre a presença das espécies de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. mais comuns na infecção humana presentes em águas de reúso da cidade de São Paulo - SP. Estas informações são de relevante contribuição para o debate sobre regulamentações de uso e redução de riscos aos expostos.

1.1 EPIDEMIOLOGIA DE GIARDÍASE e CRIPTOSPORIDIOSE

Existe uma grande variedade de espécies de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. no ambiente, mas apenas algumas destas foram identificadas como prejudiciais à saúde humana. A transmissão destes parasitas ocorre por via fecal-oral por uma grande variedade de mecanismos; de pessoa para pessoa, através de contato com animais, pelo consumo de água e pela ingestão de alimentos contaminados (FAYER, 2000; EFSTRATIOU *et al.*, 2017).

Até o momento, as espécies mais comuns conhecidas de *Cryptosporidium* spp. que podem causar doenças em seres humanos, são: *Cryptosporidium hominis* (subtipo 1b), *Cryptosporidium parvum*(subtipo IIa) *e Cryptosporidium meleagridis*. Outras espécies de *Cryptosporidium*, como *C. muris*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. suis*, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. xiaoi*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus*, *C. tyzzeri*, *C. viatorum*, *C. scrofarum* e *C. erinacei* (RYAN, 2014) são responsáveis por números muito reduzidos de infecções em pessoas saudáveis, tendo sido identificados em imunodeprimidos, crianças e idosos, não sendo reportados como responsáveis por surtos de criptosporidiose. Uma espécie de *Giardia* spp.: *Giardia duodenalis* (também conhecida como *G. lamblia* e *G. intestinalis*), em seus *assemblages* A e B, é responsável pela maioria de casos de infecção em seres humanos. (MORGAN-RYAN, *et al.* 2002; KARANIS, 2007; ZINTL *et al.*, 2009; FRANZÉN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2013; DAVID *et al.*, 2015; EFSTRATIOU, 2017).

BALDURSSON & KARANIS (2011) fizeram uma revisão de 199 surtos ou casos causados por protozoários parasitas no período de 2004 a 2010 na Austrália, América do Norte, Europa e Ásia. *Cryptosporidium* spp. foi relatado em 60,3% dos surtos ou casos (120), enquanto *Giardia* spp. foi relatada em 35,2% (70 surtos ou casos), evidenciando que estes parasitas são de grande relevância em saúde pública quando tratamos de doenças gastrointestinais transmitidas pela água. Foram identificados, também, os meios por onde os parasitas contaminaram os seres humanos, sendo a maioria deles causados por contaminações nas águas de abastecimento, piscinas e alimentos contaminados.

EFSTRATIOU *et al.* (2017), realizaram uma revisão de surtos ocorridos entre 2011 e 2016, onde 381 surtos de doenças parasitarias foram relatados nos EUA, Reino Unido, Austrália, Noruega, China, Suécia, Canadá, Irlanda, Nova Zelândia, Coréia e

Alemanha. A metodologia para a seleção dos artigos foi baseada em pesquisas por diversos termos relacionados a surtos de *Giardia* spp., surtos *Cryptosporidium* spp., protozoários diversos, parasitas e doenças veiculadas por meios hídricos nas bases de dados PubMed, MEDLINE e Scopus. O protozoário *Cryptosporidium* spp. foi relatado em 239 surtos (63%) e *Giardia* spp. em 142 surtos (37%), evidenciando a necessidade de se monitorar estes protozoários parasitas em águas que podem entrar em contato direto ou indireto com seres humanos. De acordo com estes autores, estima-se que a prevalência humana de criptosporidiose seja de 3 a 5%, e de giardíase de 10% da população mundial (sintomáticos ou não).

HAMILTON *et al*. (2018) fizeram um levantamento de 46 estudos realizados entre 1987 e 2014 sobre a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em águas de reúso em 20 países. Diversas metodologias de análise foram utilizadas nestes estudos, como microscopia de fluorescência, microscopia comum, qPCR, PCR, e LSC (*laser scanning cytometry*) dentre outras. Neste estudo, 431 de 1059 (41%) amostras de água de reúso foram consideradas positivas para a presença de *Cryptosporidium* spp., e 676 de 1.111 (61%) foram consideradas positivas para a presença de *Giardia* spp.

1.2 OCORRÊNCIA DE *Giardia* spp. E *Cryptosporidium*

Diversos estudos sobre detecção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em águas de reúso têm sido realizados. DI GIOVANNI *et al.* (2006) realizaram um estudo que se tornou um marco sobre a transmissão de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. pela utilização de águas de reúso. O foco da pesquisa foi o reúso de águas provenientes de ETEs na agricultura. A recuperação dos parasitas foi realizada de acordo com o método 1623 (USEPA, 2003) e, para a identificação molecular das espécies, utilizaram a "*Polymerase Chain Reaction*" ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). De acordo com os dados obtidos, foram encontradas as seguintes espécies: *Cryptosporidium parvum*; *Cryptosporidium hominis* e *Giardia duodenalis* (genótipos A2 e A3) nas amostras analisadas, indicando que os tratamentos nestas ETEs não foram suficientes para eliminar estes organismos.

Na Espanha, utilizando a técnica de PCR, CASTRO-HERMIDA *et al.* (2008) também realizaram um estudo para identificar *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium*

spp. presentes em águas após tratamento secundário e terciário (com irradiação ultravioleta) provenientes de 12 ETEs. Para a caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. foi selecionado o gene 18 SSU RNA, e para identificação de *Giardia duodenalis,* o gene *β-giardina.* Os autores concluíram que mesmo após o processo de tratamento, cistos e oocistos ainda estavam presentes nas águas analisadas, independentemente do tratamento utilizado.

Em um estudo realizado por DUNGENI e MOMBA (2010) em Gauteng, na África do Sul, foi investigada a presença de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de reúso após tratamento em quatro ETEs. O método utilizado para identificar *Cryptosporidium parvum* em seu Genótipo I e *Giardia lamblia* em seu assemblage "A" foi a PCR. A taxa de remoção destes organismos para as quatro ETEs referente a *Cryptosporidium* spp. variou de 67,40% a 98,26% e para *Giardia* spp. a remoção variou de 86,81% a 99,96%, indicando a presença dos patógenos, mesmo após tratamento, no produto final de todas as ETEs.

SANTOS *et al.* (2011) avaliaram o processo para eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em águas de reúso provenientes de uma ETE que utiliza o sistema de lodo ativado, em Campinas-SP, com o método de desinfecção por irradiação UV. Foram analisadas 53 amostras sem desinfecção por luz ultravioleta (UV) e 38 amostras tratadas com luz UV. Detectaram-se cistos de *Giardia* spp. em 96,2% das amostras sem o tratamento UV e em 94,7% das amostras tratadas com UV. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em cerca de 2,6% das amostras de reúso com tratamento UV. Estes dados vão ao encontro de resultados semelhantes na literatura, indicando a presença destes parasitas em águas tratadas mesmo com o sistema de lodo ativado combinado com irradiação UV.

Em um estudo realizado por RAZZOLINI *et al*. (2020), amostras de água de reúso de duas ETEs na região metropolitana de São Paulo foram analisadas para a detecção e quantificação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. Nas análises em microscopia de fluorescência, 35,8% das amostras estavam contaminadas com *Giardia* spp., em concentrações variando do limite de detecção <0,03 a 16,0 cistos/L, e 30,2% das amostras estavam contaminadas com *Cryptosporidium* spp., em concentrações variando do limite de detecção de <0,03 a 25,8 oocistos/L.

Baseada nas informações que evidenciam a ocorrência de *Giardia* spp. e de *Cryptosporidium* spp. que causam doenças aos seres humanos em águas de reúso, esta pesquisa contribui com dados de ocorrência de espécies de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. de interesse em saúde pública nas águas de reúso geradas em duas ETEs na região metropolitana de São Paulo, fomentando a discussão e o debate para a elaboração de políticas públicas e uma legislação adequada para a reutilização segura da água.

1.3 LEGISLAÇÃO

1.3.1 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

No Brasil, de forma geral, não existe lei federal ou qualquer normatização técnica para o uso seguro das águas de reúso, não sendo abordado na lei 9433/1997 que trata da Política Nacional de Recursos Hídricos (BRASIL, 1997). Entretanto, a resolução Nº54/2005 do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH), estabeleceu modalidades e critérios gerais para a prática de reúso direto não potável da água, não citando padrões físico-químicos e microbiológicos, porém dando algumas diretrizes de uso bastante específicas e restritivas, uma vez que não se conhece a qualidade das águas de reúso utilizadas em todo o território nacional (CNRH, 2005). Já no município de São Paulo, a lei nº 16174 de 22 de abril de 2015, estabeleceu critérios para a utilização da água de reúso proveniente do tratamento do efluente final das Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e da recuperação de água de chuva, para aplicações urbanas, que não necessitem de água potável em obras e serviços. Não são citados padrões físicos, químicos e biológicos para o uso da água (SÃO PAULO, 2015). Os usos discriminados na lei 16174/2015 são: I - Lavagem de ruas, calçadas, praças públicas, monumentos, túneis, pátios e estacionamentos de próprios municipais e outros logradouros; II - Lavagem de lagos e fontes ornamentais; III - Desobstrução/limpeza de galerias de águas pluviais, bueiros, bocas de lobo e piscinões; IV - Lavagem de caminhões e carretas de lixo e pátios de transbordo de resíduos sólidos urbanos (RSU) e postos de entrega voluntária (PEVs); V - Umectação de ajuste para umidade ótima na terraplenagem; VI - Cura e água de mistura de concreto não estrutural; VII - Lamas de lubrificação em métodos de construção não destrutivos como perfurações unidirecionais; VIII - Emulsão para lubrificação de rolos compressores em serviços de pavimentação asfáltica; IX - Umidificação de pavimento para aumentar a umidade relativa do ar em logradouros em que sua redução

na estiagem se tornou problema para a saúde pública; X - Lavagem de fachadas e jateamento para sua recuperação e envidraçamento, em havendo condições que evitem a dispersão de névoa ou isolamento adequado para o tráfego de transeuntes; XI - Operações de rescaldo após incêndios, realizadas por bombeiros.

No âmbito do Estado de São Paulo, a Secretaria da Saúde (SES), Secretaria do Meio Ambiente (SMA) e a Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos do Estado de São Paulo (SSRH) se uniram para a criação da resolução Nº 01 de 28 de junho de 2017 (SÃO PAULO, 2017). Em seu artigo 3º, esta resolução trata do uso direto não potável da água de reúso proveniente de ETEs. Foram definidas também as diversas modalidades para o uso deste recurso, como irrigação paisagística, lavagem de logradouros, combate a incêndios dentre outros usos.

Ainda nesta resolução, em seu artigo 6º, é citado que para a garantia do padrão de qualidade, o produtor da água de reúso deve "monitorar sua qualidade via análises laboratoriais que empreguem métodos de análises especificados em Normas Técnicas de Instituições Nacionais e Internacionais reconhecidas" onde cita a necessidade de uma análise mensal para a identificação de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. para águas com restrição moderada. São descritos como indicadores biológicos para águas de reúso com restrição moderada: Coliformes Termotolerantes (Não detectável), *E. coli* (<120 UFC/100 mL) e ovos de helmintos (<1 ovo/L).

Em fevereiro de 2020 foi publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo uma nova resolução conjunta SES/SIMA (Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente) devido a necessidade de revisão e reformulação da anteriormente citada resolução Nº 01 de 28 de junho de 2017. A resolução Conjunta SES/SIMA – 1, de 13/2/2020 "Disciplina o reúso direto não potável da água, para fins urbanos, proveniente de Estações de Tratamento de Esgoto Sanitário e dá providências correlatas" (SÃO PAULO, 2020). Nesta resolução, para as águas de classe "B" (reúso restrito não potável), não são mencionados padrões de presença ou ausência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Já para as águas de classe "A" (reúso irrestrito não potável), a quantidade de (oo) cistos presentes por litro de água deve ser considerada não detectável.

Esta nova resolução representa um avanço bastante considerável para a tratativa do reúso de águas no Estado, incluindo a obrigatoriedade da caracterização

microbiológica das águas recicladas, contemplando, dentre outros microrganismos, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. de acordo com seu Artigo 12º, §2º.

1.3.2 LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL

A Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu em 1973, com a intenção de proteger a saúde das pessoas e zelar pela saúde pública das comunidades que convivem com o reúso de águas, seu primeiro guia sobre utilização de águas recicladas para agricultura e aquicultura, chamado "*Reuse of effluents: Methods of wastewater treatment and health safeguards*" (WHO, 1973). Alguns anos depois, em 1989, lançou uma atualização deste trabalho, chamado "*Health guidelines for the use of Wastewater in agriculture and aquaculture*" (OMS, 1989). Estes guias foram adotados por vários países para manter suas práticas de reúso seguras e proteger a saúde da população exposta. Com o aumento da prática de reúso, alguns problemas referentes a infecção pela utilização deste recurso foram sendo notados. O volume mais recente, "*Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater - Volume 4*" (2006) dá diretrizes para o uso seguro das águas de reúso, fornecendo informações sobre a avaliação e o gerenciamento de riscos associados a riscos microbianos. Inclui também procedimentos mínimos e metas específicas para a proteção da saúde dos envolvidos, citando inclusive métodos de redução dos patógenos mais encontrados nestes recursos, assim como *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

Países como o México, Espanha, Austrália e Estados Unidos da América têm regulamentações diferentes para o reúso de água. No México, a utilização da água de reúso para fins que tem contato direto com seres humanos, como uso recreacional, lavagem de carros e irrigação de áreas paisagísticas tem seu controle de qualidade baseado em indicadores, tendo como limite de coliformes termotolerantes ≤240 NMP/100 mL e limite para ovos de helmintos ≤1 ovo/L. Já para uso indireto ou ocasional, como irrigação de campos de golfe e recarga de hidrantes, os indicadores de qualidade da água para coliformes termotolerantes são de ≤1.000 NMP/100 mL e para ovos de helmintos de ≤5 ovos/L, não tendo valores máximos descritos para (oo)cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (MÉXICO, 1997).

Na Espanha, segundo o Decreto Real 1620/2007 que regulamenta diferentes usos das águas, a água de reúso é utilizada para serviços como irrigação de áreas paisagísticas, lavagem de ruas, lavagem de carros e combate a incêndios. A legislação espanhola também se utiliza de indicadores, sem análises específicas para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., com limites para *E. coli* de ≤200UFC/100 mL e para ovos de helmintos de ≤1 ovo/10L (ESPANHA, 2007).

Nos Estados Unidos da América a reutilização das águas é bem documentada e regulamentada e diversa entre os estados americanos. Os padrões de qualidade para o uso deste recurso diferem entre seus estados, bem como os requisitos para o que é considerado um tratamento adequado (USEPA, 2012).

Na Flórida, para utilização irrestrita das águas de reúso, o índice de coliformes termotolerantes deve estar 75% das vezes abaixo do limite de detecção, tendo seu limite de 25 NMP/100mL. A regulação ainda exige tratamento secundário, filtração e desinfecção. Além disso, no estado da Flórida, o monitoramento da qualidade das águas de reúso se dá por meio de indicadores (coliformes termotolerantes). O monitoramento de *Giardia* spp. e de *Cryptosporidium* spp. baseia-se na capacidade de remoção da planta de tratamento, cuja avaliação realiza-se a cada 2 anos para ETEs que operam volumes ≥1 milhão de galões por dia e a cada 5 anos para ETEs que operam volumes <1 milhão de galões por dia (USEPA, 2012). Nos EUA, o estado da Flórida é o que mais recicla esgoto doméstico, tendo seu uso sendo majoritariamente para agricultura, irrigação de campos de golfe e recarga de águas subterrâneas (DUONG & SAPHORES, 2015).

Ainda nos EUA, no estado do Arizona o requisito para o reúso da água é o tratamento secundário, consistindo de filtração e desinfecção. O indicador utilizado para medir a qualidade da água é a concentração dos coliformes termotolerantes, que não devem ser detectáveis nas últimas quatro das sete amostras avaliadas, tendo como valor máximo de 23NMP/100 mL (USEPA, 2012). É sabido que apenas o tratamento secundário com filtração e desinfecção simples não é suficiente para uma remoção eficiente de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., tornando esta prática pouco ou nada efetiva na eliminação dos mesmos.

Na Califórnia, existem regulações a respeito do uso de águas recicladas desde 1918, onde existem cerca de 482 estações de tratamento de esgoto doméstico que

produzem águas recuperadas para uso em indústria, agricultura e locais de acesso público (ANGELAKIS & GIKAS, 2014; DUONG & SAPHORES, 2015). A legislação da qualidade da água de reúso nesse estado faz uso de indicadores, os quais não podem exceder a concentração de coliformes totais de 2,2NMP/100 mL como média nas amostras dos últimos sete dias consecutivos, e que o número de coliformes totais não exceda 23NMP/100 mL em mais de uma amostra em qualquer período de 30 dias. Proíbe-se o uso do recurso que exceder 240NMP/100 mL coliformes termotolerantes. A legislação exige também o tratamento terciário para a utilização destas águas (USEPA, 2012).

Na Austrália, existe um manual para a gestão de águas recicladas, produzido pelo "*Environment Protection And Heritage Council*" e pelo "*Natural Resource Management Ministerial Council*" (2008) que dispõem de informações a respeito de diferentes tipos de tratamentos com a finalidade de reduzir contaminantes físicos, químicos e microbiológicos presentes nos efluentes, como por exemplo, o tratamento primário, tratamento secundário, filtração em sistema de membranas, osmose reversa, luz UV, cloração e detenção em lagoas, dentre outros. Um dos métodos citados, que inclui tratamento secundário com detenção em lagoas por 20 dias apresenta, de acordo com o guia, uma redução de 5 logs para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.. Demonstrou-se que houve redução de 2.000 oocistos/L de *Cryptosporidium* spp. e de 20.000 cistos/L de *Giardia* spp. nas amostras não tratadas houve redução para <1 cisto/50L de *Giardia* spp. e <1 oocisto/50L de *Cryptosporidium* spp. após este tratamento, sendo uma forma bastante eficiente na remoção destes parasitas.

Como podemos observar na literatura e nas legislações ao redor do mundo, existem diversos tipos de tratamento de esgotos, com as mais variadas técnicas, tendo estas enormes diferenças de custos e eficiências para remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. além de outros patógenos. O intuito do presente estudo não é comparar técnicas de desinfecção ou analisar metodologias, mas sim buscar compreender a qualidade da água de reúso utilizada na cidade de São Paulo e buscar expor os possíveis riscos à saúde da população exposta e para os trabalhadores que lidam com este recurso que vem sendo negligenciado quanto sua qualidade microbiológica (em especial para os parasitas intestinais) nas legislações sobre uso de águas recicladas em São Paulo e no Brasil.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi a caracterização molecular de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água de reúso provenientes de duas estações de tratamento de esgoto (ETEs) da Cidade de São Paulo, bem como se verificar a ocorrência de espécies que podem trazer possíveis riscos à saúde da população exposta.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sequenciar as amostras positivas para a identificação de espécies de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.
- Contribuir com os dados e resultados obtidos na criação e/ou melhoria de políticas públicas de reúso de água urbano.

3. MÉTODOS

3.1 Obtenção das Amostras

A caracterização molecular de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foi realizada em material recuperado de amostras de águas de reúso de duas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) localizadas na cidade de São Paulo. Essas amostras foram obtidas durante a execução do projeto de pesquisa intitulado "Pesquisa da ocorrência de oocistos de *Toxoplasma gondii*, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água de reúso" (FAPESP 2015/05882-7). A recuperação do material foi realizada de acordo com o método 1693 de 2014: "*Cryptosporidium* spp. *and Giardia* spp. *indisinfected Wastewater by Concentration/IMS/IFA*" (Anexo) da United States Environmental Protection Agency (USEPA).

Ao todo, foram coletadas cinquenta e duas amostras de água de reúso entre março de 2016 a março de 2017, sendo vinte e sete amostras na ETE "A" e vinte e cinco amostras na ETE "B". O volume de coleta foi de trinta litros por amostra, por meio de frascos de polietileno previamente limpos e esterilizados.

As lâminas utilizadas para a contagem dos parasitas pelo método USEPA1693/2014 foram raspadas, seu conteúdo foi coletado e seu DNA foi extraído com um kit de extração (*QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*). Este produto (DNA extraído) foi utilizado para a caracterização molecular de *Giardia duodenalis* e de *Cryptosporidium* spp. *C. parvum, C. hominis e C. meleagridis.* pelo método de Real-Time PCR (qPCR). O DNA foi utilizado para a realização do Nested PCR, as amostras positivas foram purificadas (*Wizard SV gel and PCR Clean-UP system*) e posteriormente sequenciadas. Todas as etapas analíticas são descritas no anexo.

Todas as lâminas foram analisadas de forma sistemática (Anexo), com movimentos verticais e horizontais, cobrindo toda a extensão do poço da amostra em microscopia, com epifluorescência e em aumento de 200x de acordo com o método USEPA 1693/2014. A análise foi realizada mediante ensaio de imunofluorescência (IFA) com coloração DAPI e microscopia interferencial de contraste de fase (D.I.C.). Foram analisados também os poços com os controles negativo e positivo. Todas as lâminas, independentemente da identificação ou não dos cistos e oocistos, foram raspadas a fim de se recuperar o material genético para a caracterização molecular de *Giardia duodenalis* e

de *Cryptosporidium* spp., com a finalidade de identificar as espécies de importância em saúde pública presentes nas amostras de águas de reúso produzidas na Cidade de São Paulo e destinadas ao reúso urbano

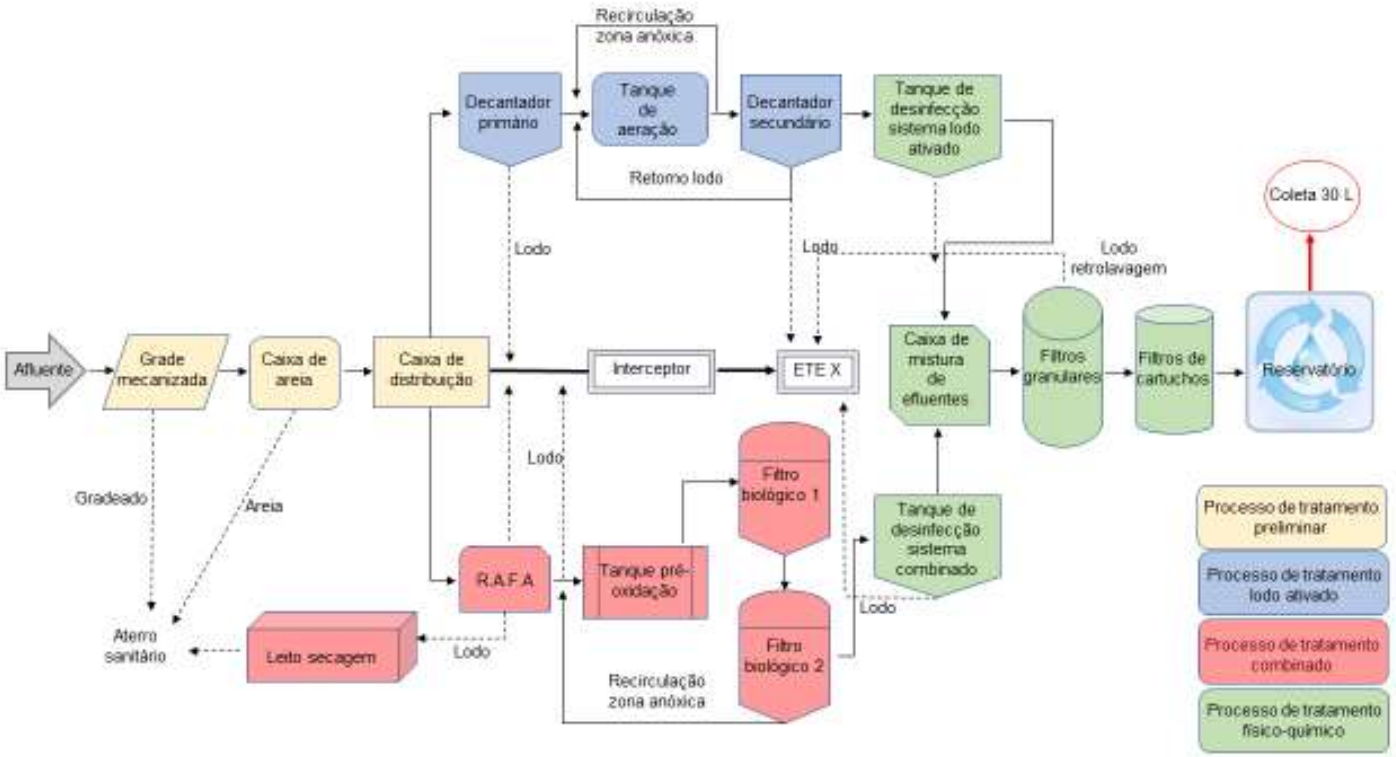
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA

3.2.1 Estação de tratamento de esgoto (ETE) "A"

A Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) "A" possui capacidade de produção de mais de 100 milhões de litros de água de reúso por mês. O processo de tratamento preliminar desta ETE é realizado com grades mecanizadas, caixas de areia e caixas de distribuição. Em seguida, é realizado o processo de tratamento por lodo ativado utilizando um decantador primário, tanques de aeração e um decantador secundário, seguidos do tanque de desinfecção para o sistema de lodo ativado. Em paralelo, o processo de tratamento combinado utiliza o Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (RAFA ou Reator UASB), tanques de pré-oxidação e filtros biológicos, seguidos do tanque de desinfecção do sistema combinado (Figura 1).

O processo de tratamento físico-químico consiste no uso dos tanques de desinfecção, na caixa de mistura de efluentes contendo os produtos do tratamento combinado com o produto do tratamento por lodo ativado, seguido de filtros granulares e filtros de cartuchos. Após a filtração, a água de reúso é armazenada em reservatórios e está pronta para uso.

Figura 1. Processo de tratamento da ETE "A" esquematizado.



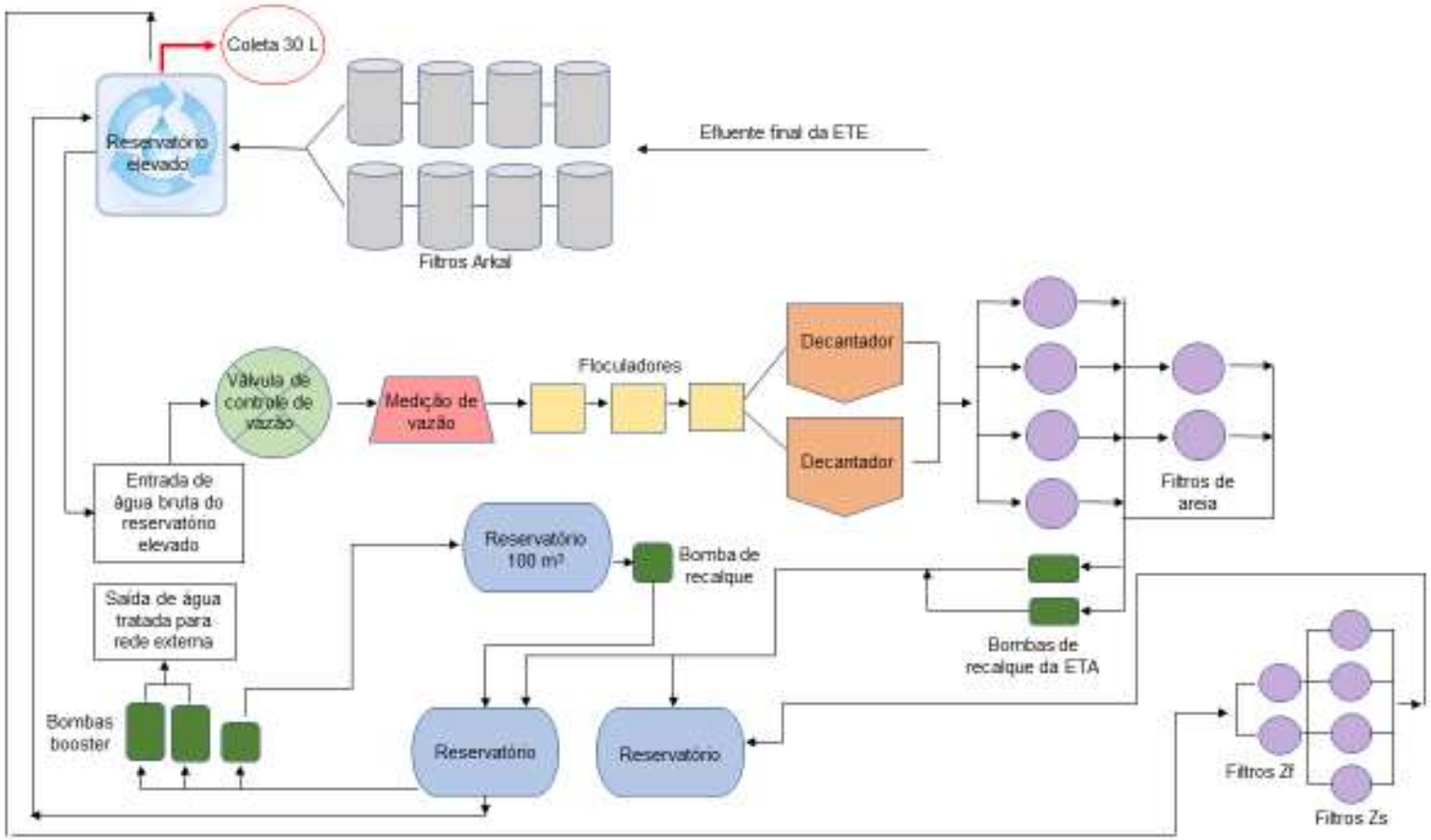
Fonte: Veridiana Karmann Bastos, não publicado.

3.2.2 Estação de tratamento de esgoto (ETE) "B"

A ETE "B" utiliza o sistema de lodo ativado por alimentação escalonada e tem uma vazão de cerca de 2,5 mil litros de água/segundo. O processo ocorre com esgoto afluente sendo distribuído ao longo de um reator, de forma a manter uma relação alimento/microrganismos constante ao longo do tanque de aeração, tendo uma eficiência de cerca e 90% de remoção de carga orgânica.

O processo consiste de tratamento secundário e tratamento terciário com coagulação utilizando policloreto de alumínio seguido de floculação, sedimentação, filtração em areia-antracito e zeólita (20 µm) e desinfecção com hipoclorito de sódio (30 minutos, com 2 a 10 ppm de cloro residual total). O esgoto tratado passa então por sistemas de filtros de discos (Filtro Arkal) para a remoção de partículas em suspensão da água, na faixa usual entre 20 a 400 µm. A água de reúso já tratada é armazenada em reservatórios (Figura 2).

Figura 2. Processo de tratamento da ETE "B" esquematizado.



Fonte: Veridiana Karmann Bastos, não publicado.

3.3 RASPAGEM DE LÂMINAS E RECUPERAÇÃO DOS CISTOS E OOCISTOS

O procedimento utilizado para a raspagem das lâminas foi descrito por BRETERNITZ (2018), adaptado de DI GIOVANNI *et al.* (2010).

O procedimento se iniciou com a remoção das lamínulas cuidadosamente com o auxílio de um bisturi. O poço da amostra e a lamínula foram lavados com PBST *anti-foam* aquecido, com o auxílio de uma pipeta. Utilizando uma alça bacteriológica de 1 µL, o poço da amostra e a lamínula foram lavados e raspados com movimentos lineares por toda a sua superfície. O conteúdo das lavagens e da raspagem foi armazenado em tubos de microcentrífuga de 2 mL. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante resultante foi desprezado e o sedimento resultante foi retirado com o auxílio de uma pipeta e armazenado em freezer para a realização da extração do DNA.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi realizada com o Kit comercial QIAamp® Fast DNA *stool mini kit* (Qiagem, Alemanha) e processada de acordo com as informações do fabricante. O kit foi conservado em temperatura de 15 a 25ºC até o momento do uso. Para a extração do DNA das amostras, foram retirados 200 µL de sedimento do tubo de microcentrífuga de 2 mL preparado previamente via raspagem e recuperação dos cistos e oocistos.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. POR qPCR

As espécies de interesse neste trabalho foram selecionadas de forma a abranger aquelas espécies mais comuns que podem trazer prejuízos de maneira direta para a saúde do ser humano. As espécies selecionadas foram: *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium meleagridis*. A identificação foi realizada a partir da detecção das regiões do gene 18S rRNA nas amostras.

Para a identificação das espécies de interesse do estudo, as amostras foram amplificadas em duplicatas. Foram realizadas amplificações dos fragmentos selecionados 18S rRNA para caracterização molecular de *Cryptosporidium*

hominis/parvum/meleagridis e 18S SSU para a caracterização molecular de *Giardia duodenalis*. Os ciclos e condições de amplificação foram os mesmos: pré-PCR por dois minutos a 50ºC, desnaturação para a ativação da enzima AmpliTaq Gold® a 95ºC por dez minutos, quarenta ciclos de quinze segundos a 95ºC para desnaturação e um minuto a 60ºC para anelamento e extensão. Para evitar falsos positivos foram testadas e analisadas as especificidades dos primers e sondas com padrões positivos para as espécies selecionadas.

Para a realização da amplificação, foram utilizados: 4,9 µL de água ultrapura, 10 µL de TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems™), 0,2 µL de cada primer específico (Forward e Reverse, totalizando 0,4 µL), 0,3 µL de sonda TaqMan-MGB (Minor Groove Binder), 2µL de IPC (Internal Positive Control) 10X-Mix, 0,4 µL de IPC DNA 50x (Applied Biosystems™) e 2µL da amostra analisada. A análise e amplificação foram realizadas com o equipamento Step One Plus – Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).

Os primers e a sonda descritos por ARAÚJO (2018) foram utilizados para detecção de *Cryptosporidium hominis, C. parvum e C. meleagridis*, como mostra o Quadro 1. A identificação de *G. duodenalis* foi feita utilizando a sonda adaptada para MGB e os *primers* descritos por YU *et al*. (2008).

Quadro 1 - Sequência dos pares de *primers* e das sondas utilizadas para a caracterização molecular de *C. parvum, C. hominis, C. meleagridis* e para a caracterização molecular de *Giardia duodenalis.*

Espécie	Sondas e primers	Sequencias 5'-3'	Posição dos Nucleotídeos
C. parvum, C. hominis e *C. meleagridis* (ARAÚJO, 2018)	S82SSU Forward	CCTAATACAGGGAGGTAGTGAC	440-461
	683SSU Reverse	CGCTATTGGAGCTGGAATTACC	587-589
	Sonda – H/P	FAM – ACAGGACTTTTTGGTTTTGTA– MGB	475-497
Giardia duodenalis (YU *et. al,* 2009)	*Primer* Forward	GACGGCTCAGGACAACGGTT	80-99
	Primer Reverse	TTGCCAGCGGTGTCCG	142-127
	Sonda - YU	FAM- CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG– MGB	105-124

3.6 NESTED PCR

O Nested PCR foi realizado com intuito de obter as bandas em gel para purificar as amostras positivas para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e sequencia-las, a fim de se identificar as espécies encontradas nas águas de reúso das duas ETEs, comparar com os resultados obtidos via qPCR e identificar os possíveis assemblages "A" e "B" para *Giardia duodenalis*. Para a caracterização de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foram realizados experimentos de Nested PCR em todas as amostras consideradas positivas para *Giardia* spp. ou *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. ou *Cryptosporidium* spp. *C. parvum, C. hominis e C. meleagridis.* respectivamente, tanto em leitura de microscopia de imunofluorescência quanto nas análises de qPCR.

3.6.1 IDENTIFICAÇÃO DE *Giardia* spp. POR NESTED PCR

O fragmento selecionado para a identificação de *Giardia* spp. tem 530pb e pertence ao gene "*glutamate dehydrogenase*" (Gdh). Os primers utilizados, tanto na primeira reação quanto na nested, e os ciclos de amplificação foram selecionados conforme CACCIO *et al.* (2008).

Nested PCR foi realizada em triplicatas. O mix de preparo para a primeira reação de amplificação de *Giardia* spp. foi preparado em 25 µL, utilizando 11,5 µL de água ultrapura livre de nucleases, 5 µL de tampão 5x GoTaq Flexi, 2 µL de MgCl2, 0,2 µL de dNTP 200 µm, 0,3 µL de cada primer (reverse e forward) selecionado para o gene de interesse (Quadro 3), 0,25 µL de GoTaq G2 Flexi DNA polimerase e 5 µL de DNA extraído dos cistos recuperados das amostras de água de reúso.

As amostras em triplicatas para identificação de *Giardia* spp. foram levadas a um termociclador programado para realizar 35 ciclos a 94ºC por 30 segundos, 50ºC por 30 segundos e 72ºC por 1 minuto, tendo um "hot start" a 94ºC por 2 minutos e a extensão final a 72ºC por 7 minutos. Após isto, as triplicatas foram unidas em uma amostra apenas, e purificadas com o kit "*Wizard SV gel and PCR clean-Up system*" a fim de se obter um material puro para análise. Com este DNA purificado, foi realizada a segunda reação de amplificação utilizando os mesmos ciclos utilizados na primeira reação, os mesmos reagentes do mix da primeira reação e os primers reverse e forward da segunda reação

(Quadro 2). Por fim, as triplicatas de cada amostra foram unidas em apenas uma e reveladas em gel.

3.6.2 IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. POR NESTED PCR

Para a amplificação de fragmentos do gene selecionado 18S rDNA (611 pb), e identificação *Cryptosporidium* spp. foram utilizados os seguintes primers: SHP1 e SHP2 para a primeira reação, SHP3 (SILVA *et al*., 2013) e SSU-R3 para a segunda reação (XIAO *et al*., 1999).

O Nested PCR foi realizado em triplicatas. O mix de preparo para a primeira reação de amplificação de *Cryptosporidium* spp. foi preparado em 25 µL; utilizando 12,55 µL de água ultrapura livre de nucleases, 5 µL de tampão 5x GoTaq Flexi, 1,5 µL de MgCl2, 0,2 µL de dNTP 200 µm, 0,3 µL de cada primer (forward e reverse) selecionado para o gene de interesse (Quadro 4), 0,15 µL de GoTaq G2 Flexi DNA polimerase e 5 µL do DNA extraído dos oocistos recuperados das amostras de água de reúso.

As amostras em triplicatas para identificação de *Cryptosporidium* spp. foram levadas a um termociclador programado para realizar a amplificação a 94ºC por 3 minutos, 39 ciclos de 94ºC por 45 segundos, 56ºC por 45 segundos, 72ºC por 1 minuto, seguido da extensão final a 72ºC por 7 minutos. Após isto, as triplicatas foram unidas em uma amostra apenas, e purificadas com o kit "Wizard SV gel and PCR Clean-Up system" a fim de se obter um DNA puro para análise. Com o DNA purificado, foi realizada a segunda reação de amplificação utilizando os mesmos ciclos utilizados na primeira reação, os mesmos reagentes do mix da primeira reação e os primers reverse e forward da segunda reação (Quadro 2). Por fim, as triplicatas de cada amostra foram unidas em apenas uma e reveladas em gel.

O gel de PCR foi preparado em concentração de 1,5%. Os tamanhos das bandas foram estimados a partir do *Marker* DNA *Ladder* (Thermo Scientific, Lithuania, EU), sendo utilizado 1µL de *Marker* para cada 5µL da amostra resultante da segunda reação do nested PCR. Foi colocado 2µL de *loading* nas primeiras linhas de cada gel como padrão para se identificar o tamanho das bandas encontradas. Cada gel foi preparado também com controles positivo e negativo. As amostras positivas de acordo com o tamanho dos pares de base selecionadas foram purificadas para o sequenciamento.

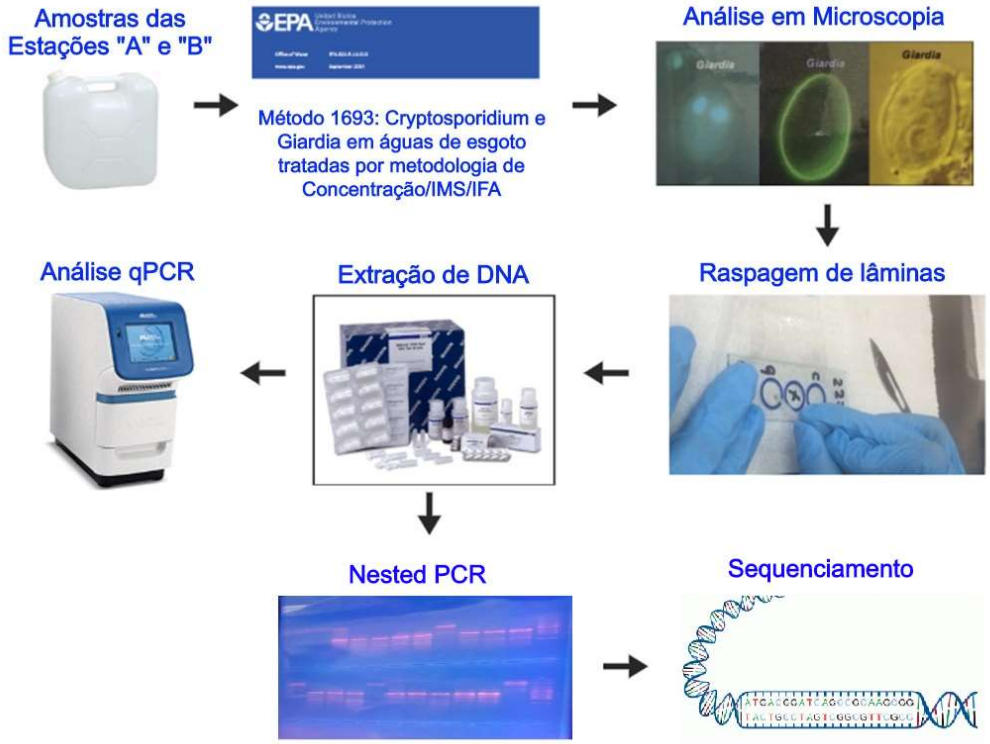
Quadro 2 - Sequências dos pares de *primers* utilizados para a identificação molecular de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Por Nested PCR.

Espécie	Sondas e primers	Sequencia 5'-3'	Produto do PCR
Cryptosporidium spp. (SILVA *et al.*, 2013; XIAO *et al*. 1999)	*SHP3*	5' – ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACA– 3'	864 pb
	SSU-R3	5' –AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA– 3'	
	SHP1	5' – ACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTAT– 3'	1353 pb
	SHP2	5' – TTCTCATAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG– 3'	
Giardia spp. (CACCIO *et al.* 2008)	*Gdh1*	5' –TTCCGTRTYCAGTACAACTC– 3'	750 pb
	Gdh2	5' –ACCTCGTTCTGRGTGGCGCA– 3'	
	Gdh3	5' –ATGACYGAGCTYCAGAGGCACGT– 3'	530 pb
	Gdh4	5' –GTGGCGCARGGCATGATGCA– 3'	

3.7 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS

As amostras positivas que apresentaram a banda esperada no PCR para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. das duas ETEs foram purificadas com o kit "*Wizard SV gel and PCR Clean-UP system*" e enviadas à um laboratório terceirizado para sequenciamento juntamente dos primers "reverse" e "forward" da segunda reação do Nested PCR. Os resultados obtidos do sequenciamento foram analisados via BLAST E BIOEDIT para a confirmação de resultado e identificação de espécies possivelmente diferentes das listadas como prioridade neste estudo. O Fluxograma é apresentado a seguir (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma dos processos utilizados para a análise das amostras



Fonte: Autor.

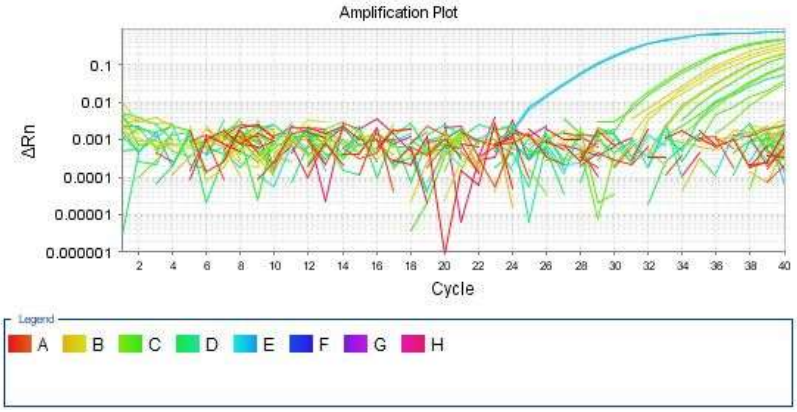
4. RESULTADOS

4.1 *Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium hominis e Cryptosporidium meleagridis*

O material genético das amostras foi analisado via qPCR. As espécies *C. parvum*, *C. meleagridis* e *C. hominis* foram detectadas em 5,76% (3/52) das amostras de água de reúso. As espécies de interesse em Saúde Pública de *Cryptosporidium* spp. não foram detectadas na ETE "A" (tabela 1) , indicando que os oocistos detectados em microscopia eram de outras espécies.

Na ETE "B" a frequência de ocorrência foi de 12% (3/25), sendo amplificadas em três das 25 amostras analisadas (figura 4, tabela 2). Quando comparadas aos resultados obtidos por microscopia apenas uma das três amostras amplificadas na ETE "B" (identificação "04/17") identificou-se como *Cryptosporidium* spp. *parvum, C. hominis*, *C. meleagridis*, indicando que os oocistos detectados em microscopia seriam provenientes de outras espécies de *Cryptosporidium*. As tabelas 1 e 2 mostram os resultados obtidos da concentração de *Cryptosporidium* spp., por microscopia e pela amplificação do gene 18S rRNA utilizado para a confirmação da presença das espécies *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium meleagridis* e *Cryptosporidium hominis.*

Figura 4 – Resultado do qPCR para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água de reúso provenientes da ETE "B".



Fonte: Autor

Tabela 1 – Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo método USEPA 1693/2014 e identificação de espécies por Real time PCR das amostras da ETE "A".

Identificação de Amostras	Quantificação de Oocistos por Litro.	Identificação por Real Time PCR (ARAUJO, 2018).
ETE "A"	***Cryptosporidium* spp.**	***Cryptosporidium* spp. *C. parvum, C. hominis e C. meleagridis.***
02/16	< LD	-
04/16	< LD	-
05/16	< LD	-
07/16	< LD	-
13/16	< LD	-
16/16	**0,10**	-
19/16	< LD	-
37/16	< LD	-
54/16	**0,03**	-
71/16	**25,80**	-
88/16	< LD	-
105/16	< LD	-
122/16	< LD	-
139/16	< LD	-
156/16	**0,40**	-
173/16	< LD	-
175/16	< LD	-
207/16	< LD	-
209/16	< LD	-
241/16	< LD	-
259/16	< LD	-
01/17	< LD	-
03/17	**0,03**	-
05/17	**0,03**	-
07/17	< LD	-
11/17	**0,43**	-
31/17	< LD	-

LD – Limite de detecção

Tabela 2 – Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo método USEPA 1693/2014 e identificação de espécies por Real time PCR das amostras da ETE "B".

Identificação de Amostras	Quantificação de Oocistos por Litro.	Identificação por Real Time PCR (ARAUJO, 2018).
ETE "B"	***Cryptosporidium* spp.**	***C. parvum, C. hominis e C. meleagridis.***
06/16	**0,07**	-
08/16	**0,03**	-
14/16	< LD	-
17/16	**1,30**	-
20/16	< LD	-
38/16	< LD	-
55/16	< LD	-
72/16	< LD	-
89/16	< LD	-
106/16	< LD	-
123/16	< LD	*C. parvum, C. hominis e C. meleagridis.*
140/16	**0,10**	-
157/16	**2,30**	-
174/16	**0,03**	-
176/16	**0,03**	-
208/16	< LD	*C. parvum, C. hominis e C. meleagridis.*
210/16	< LD	-
242/16	< LD	-
260/16	< LD	-
02/17	< LD	-
04/17	**0,10**	*C. parvum, C. hominis e C. meleagridis.*
06/17	< LD	-
08/17	< LD	-
12/17	**0,03**	-
32/17	< LD	-

LD – Limite de detecção.

Portanto, para a ETE "A", os resultados da presença de *Cryptosporidium* spp. em microscopia apontaram oocistos em 25,9% (7/27) das amostras analisadas, em concentrações variando de 0,03 a 25,8 oocistos/L. Já na análise via PCR em tempo real anteriormente citada, nenhuma amostra (0/27) apresentou resultado positivo para a presença do gene selecionado para identificação de *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium meleagridis* e *Cryptosporidium hominis,* indicando que os oocistos encontrados podem ser de outras espécies ou uma possível falha de sensibilidade do qPCR.

Na ETE "B", os resultados para a presença de *Cryptosporidium* spp. em microscopia apontaram a presença de oocistos em 36% (9/25) das amostras analisadas,

em concentrações de 0,03 a 2,30 oocistos/L. Já na análise via PCR em tempo real, 12% das amostras (3/25) apresentaram resultados positivos para a presença do gene selecionado para identificação de *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium meleagridis* e *Cryptosporidium hominis,* indicando que os oocistos encontrados que não foram identificados como estes podem ser referentes a outras espécies de *Cryptosporidium* spp. ou uma possível falha de sensibilidade do qPCR.

Os resultados dos sequenciamentos das amostras de *Cryptosporidium* spp. apresentaram um "E value" dentro das faixas adequadas e uma identidade alta nas análises via BLAST e BIOEDIT, e, apesar de que as sequências encontradas tenham sido curtas e a cobertura tenha variado de 65 a 81%, todas as amostras enviadas para sequenciamento apresentaram resultados positivos para *Cryptosporidium* spp., sendo as espécies identificadas como *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* (Tabela 3).

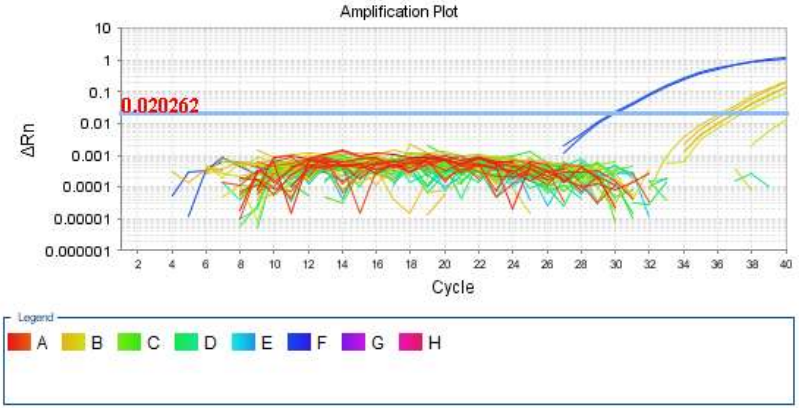
Tabela 3 – Resultados do sequenciamento das amostras positivas por qPCR para as espécies de *Cryptosporidium* spp. selecionadas.

Cepa	Primer FW	Primer RV	Comprimento de consulta (Query Length)	Descrição	Score Máximo	Score Total	Taxa de Cobertura	E value	Percentagem de Identificação	Adesão
	893 FW	894 RV								
003/17	A7 - MD 376	B11 - MD 392	722	*Cryptosporidium parvum* pequena subunidade do gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1053	1053	79%	0.0	99.65%	MF326948.1
004/17	A4 - MD 373	B8 - MD 389	832	*Cryptosporidium hominis* gene isolado de RNA ribossomal YPW1 18S, sequência parcial	1042	1042	69%	0.0	99.31%	KJ019853.1
006/16	A2 - MD 371	B6 - MD 387	773	*Cryptosporidium hominis* gene isolado de RNA ribossomal YPW1 18S, sequência parcial	1055	1055	74%	0.0	99.65%	KJ019853.1
011/17	A8 - MD 377	B12 - MD 393	805	*Cryptosporidium parvum* pequena subunidade do gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1057	1057	71%	0.0	99.65%	MF326948.1
012/17	A3 - MD 372	B7 - MD 388	762	*Cryptosporidium hominis* gene isolado de RNA ribossomal YPW1 18S, sequência parcial	1048	1048	75%	0.0	99.48%	KJ019853.1
				Cryptosporidium parvum clone B3b 18S gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1048	1048	75%	0.0	99.48%	AY204231.1
016/16	B1 - MD 382	C5 - MD 398	845	*Cryptosporidium parvum* pequena subunidade do gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1055	1055	68%	0.0	99.65%	MF326948.1
				Cryptosporidium hominis gene isolado de RNA ribossomal YPW1 18S, sequência parcial	1055	1055	68%	0.0	99.65%	KJ019853.1
017/16	A6 - MD 375	B10 - MD 391	806	*Cryptosporidium hominis* gene isolado de RNA ribossomal YPW1 18S, sequência parcial	1068	1068	71%	0.0	100.00%	KJ019853.1
				Cryptosporidium parvum clone B3b 18S gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1068	1068	71%	0.0	100.00%	AY204231.1
054/16	A11 - MD 380	C3 - MD 396	731	*Cryptosporidium parvum* pequena subunidade do gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1062	1062	79%	0.0	99.83%	MF326948.1
071/16	B3 - MD 384	C7 - MD 400	887	*Cryptosporidium parvum* pequena subunidade do gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1059	1059	65%	0.0	99.65%	MF326948.1
				Cryptosporidium hominis gene isolado de RNA ribossomal YPW1 18S, sequência parcial	1059	1059	65%	0.0	99.65%	KJ019853.1
123/16	A10 - MD 379	C2 - MD 395	713	*Cryptosporidium parvum* pequena subunidade do gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1059	1059	80%	0.0	99.83%	MF326948.1
140/16	A9 - MD 378	C1 - MD 394	712	*Cryptosporidium hominis* gene isolado de RNA ribossomal YPW1 18S, sequência parcial	1038	1038	81%	0.0	99.13%	KJ019853.1
				Cryptosporidium parvum clone B3b 18S gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1038	1038	81%	0.0	99.13%	AY204231.1
157/16	A1 - MD 370	B5 - MD 386	728	*Cryptosporidium hominis* gene isolado de RNA ribossomal YPW1 18S, sequência parcial	1048	1048	79%	0.0	99.48%	KJ019853.1
				Cryptosporidium parvum clone B3b 18S gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1048	1048	79%	0.0	99.48%	AY204231.1
156/16	B4 - MD 385	C8 - MD 401	746	*Cryptosporidium hominis* gene isolado de RNA ribossomal YPW1 18S, sequência parcial	1046	1046	77%	0.0	99.31%	KJ019853.1
				Cryptosporidium parvum clone B3b 18S gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1046	1046	77%	0.0	99.31%	AY204231.1
174/16	B2 - MD 383	C6 - MD 399	776	*Cryptosporidium parvum* pequena subunidade do gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1048	1048	74%	0.0	99.31%	MF326948.1
				Cryptosporidium hominis gene isolado de RNA ribossomal YPW1 18S, sequência parcial	1048	1048	74%	0.0	99.31%	KJ019853.1
176/16	A12 - MD 381	C4 - MD 397	734	*Cryptosporidium hominis* gene isolado de RNA ribossomal YPW1 18S, sequência parcial	1068	1068	78%	0.0	100.00%	KJ019853.1
				Cryptosporidium parvum clone B3b 18S gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1068	1068	78%	0.0	100.00%	AY204231.1
208/16	A5 - MD 374	B9 - MD 390	709	*Cryptosporidium parvum* pequena subunidade do gene de RNA ribossomal, sequência parcial	1042	1042	81%	0.0	99.31%	MF326948.1

4.2 *Giardia duodenalis*

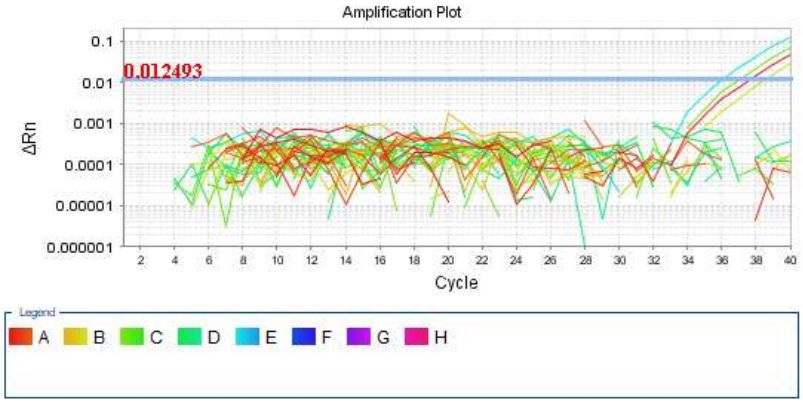
A análise do material genético das amostras foi realizada via qPCR. A espécie *Giardia duodenalis* foi detectada em 11,53% (6/52) das amostras de água de reúso. Na ETE "A" a frequência de ocorrência foi de 11,1%, sendo amplificadas 3 das 27 amostras (Figura 5) e na ETE "B" a ocorrência foi de 12%, sendo amplificadas 3 das 25 amostras (Figura 6).

Figura 5. Resultado do qPCR para detecção de *Giardia* spp. em amostras de água de reúso provenientes da ETE "A".



Fonte: Autor

Figura 6. Resultado do qPCR para detecção de *Giardia* spp. em amostras de água de reúso provenientes da ETE "B".



Fonte: Autor

As tabelas 3 e 4 mostram os resultados obtidos da concentração de *Giardia* spp., por microscopia e pela amplificação do gene 18S SSU utilizado para a confirmação da presença da espécie *G. duodenalis*.

Na ETE "A" as análises em microscopia de acordo com o método USEPA 1693/2014 apontaram a presença de 29,6% (8/27) de amostras positivas para cistos de *Giardia* spp. em faixas de concentrações de 0,03 a 16,0 cistos/L. Já os resultados para *Giardia duodenalis* via qPCR apontaram 11,1% (3/27) de amostras positivas (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração de cistos de *Giardia* spp. pelo método USEPA 1693/2014 e identificação de espécies por Real time PCR das amostras da ETE "A".

Identificação de Amostras	Quantificação de Cistos por Litro.	Identificação por Real Time PCR (YU *et al.,* 2009).
ETE "A"	***Giardia* spp.**	***Giardia duodenalis***
02/16	< LD	-
04/16	**0,03**	-
05/16	< LD	-
07/16	< LD	-
13/16	< LD	-
16/16	**1,03**	-
19/16	< LD	*Giardia duodenalis*
37/16	< LD	-
54/16	**0,60**	*Giardia duodenalis*
71/16	**16,00**	-
88/16	< LD	*Giardia duodenalis*
105/16	< LD	-
122/16	< LD	-
139/16	< LD	-
156/16	**2,40**	-
173/16	< LD	-
175/16	< LD	-
207/16	< LD	-
209/16	< LD	-
241/16	< LD	-
259/16	< LD	-
01/17	< LD	-
03/17	< LD	-
05/17	**0,33**	-
07/17	< LD	-
11/17	**0,03**	-
31/17	**0,03**	-

LD – Limite de detecção

Na ETE "B", as análises em microscopia seguindo o método USEPA 1693/2014 apontaram a presença de 44% (11/25) de amostras positivas para cistos de *Giardia* spp. em concentrações variando de 0,03 a 2,7 cistos/L. Já os resultados para *Giardia duodenalis* via qPCR apontaram 12% (3/25) de amostras positivas (Tabela 5). Todas as amostras positivas via qPCR para *Giardia duodenalis* na ETE "B" haviam sido identificadas igualmente positivas em análise de microscopia. As demais amostras positivas em microscopia, porém negativas nas análises via qPCR podem, de fato, estar contaminadas por cistos de outras espécies de *Giardia* spp.

Tabela 5 – Concentração de cistos de *Giardia* spp. pelo método USEPA 1693/2014 e identificação de espécies por Real time PCR das amostras da ETE "B".

Identificação de Amostras	Quantificação de Cistos por Litro	Identificação por Real Time PCR (YU *et al.,* 2009).
ETE "B"	***Giardia* spp.**	***Giardia duodenalis***
06/16	**0,03**	*Giardia duodenalis*
08/16	**0,03**	-
14/16	< LD	-
17/16	**0,53**	-
20/16	< LD	-
38/16	< LD	-
55/16	**0,03**	-
72/16	< LD	-
89/16	< LD	-
106/16	< LD	-
123/16	< LD	-
140/16	**0,10**	-
157/16	**2,70**	*Giardia duodenalis*
174/16	**1,10**	-
176/16	< LD	-
208/16	< LD	-
210/16	< LD	-
242/16	< LD	-
260/16	< LD	-
02/17	< LD	-
04/17	**0,13**	-
06/17	< LD	-
08/17	**1,13**	-
12/17	**0,10**	-
32/17	**0,60**	*Giardia duodenalis*

LD – Limite de detecção

Para as amostras consideradas positivas para *Giardia* spp., os resultados do sequenciamento não foram conclusivos; estas não apresentaram uma porcentagem de

cobertura suficiente ou "E value" de identidade para *Giardia* spp. pelas análises de BLAST e BIOEDIT, tendo apontado resultados que podem indicar problemas de conservação dos primers referentes ao armazenamento e transporte, ou algum problema relacionado diretamente aos primers utilizados e enviados para a realização do sequenciamento.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas ETEs "A" e "B" corroboram com outros estudos que avaliaram a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em águas de reúso de diversas estações de tratamento de esgoto pelo mundo. O estudo conduzido por HAMILTON *et al*. (2018) encontraram frequências mais elevadas de (oo)cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em águas de reúso do que as obtidas neste estudo, mostrando um padrão global de presença destes parasitas intestinais nessas águas.

Como anteriormente exposto, a literatura científica relata numerosos surtos que tem como responsáveis os parasitas *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. spp. A presença destes organismos em águas de reúso abre ao debate a questão da segurança de uso destes recursos em ambientes urbanos que podem ter contato direto ou indireto com a população local. Os resultados referentes a revisão de BALDURSSON & KARANIS (2011), PLUTZER & KARANIS (2016) e de EFSTRATIOU *et al.* (2017) deixam claro a relevância da circulação desses parasitas e seu de impacto negativo na saúde humana.

No entanto, nem todas espécies de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., de fato, causam doença nos seres humanos. Por este motivo, se faz necessário a identificação das espécies de importância em saúde pública.

Este estudo apontou a ocorrência da espécie *Giardia duodenalis* e das espécies *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium meleagridis* nas amostras de água de reúso analisadas.

LI *et al*. (2012) realizaram um estudo sobre a distribuição de genótipos e subtipos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis*, em 386 amostras dos sistemas combinados de esgotos de Shanghai, Nanjing e Wuhan e o sistema de esgotamento em Qingdao, na China. Com base na análise por PCR do gene SSU rRNA, 63 de 90 amostras

(70,0%) de Xangai, 32 de 87 amostras (36,8%) de Nanjing, 75 de 109 amostras (68,8%) de Qingdao, e 47 de 100 amostras (47,0%) de Wuhan foram positivas para *Cryptosporidium* spp. A análise pela "Técnica do polimorfismo de comprimento de fragmento" (RFLP) e o sequenciamento de DNA do PCR revelaram a presença de 14 espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp.: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. suis*, *C. cuniculus*, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. muris*, genótipo de porco II, genótipo aviário III, genótipo I de rato, genótipo IV de rato, e um novo genótipo. Dentre as principais espécies patogênicas humanas de *Cryptosporidium*, foram encontrados os *Cryptosporidium hominis* específicos para humanos e *Cryptosporidium* spp. *meleagridis* (adaptados para aves) em amostras de esgoto das quatro cidades. Estas amostras de esgoto com espécies de *Cryptosporidium* spp. de interesse na saúde humana comprovam a presença destes organismos em seres humanos e animais de convívio urbano. Como descrito na literatura, os tratamentos convencionais de esgoto não são suficientes para eliminar estes organismos em suas formas císticas de resistência, e os mesmos ainda estarão disponíveis nas águas de reúso oriundas deste tratamento. Neste caso, em esgoto, o estudo de LI *et. al.* (2012) identificaram duas espécies de *Cryptosporidium* spp. específicas para humanos em todas as quatro cidades estudadas. Uma destas espécies (*Cryptosporidium hominis*) também foi encontrada nas águas de reúso de ambas as ETEs do presente estudo, na cidade de São Paulo.

Para a análise dos genótipos e subtipos de *Giardia duodenalis* por PCR, LI *et.al*. (2012) selecionaram o gene *tpi* e identificaram uma alta ocorrência de *G. duodenalis* nas quatro cidades; 59 de 87 amostras (67,8%) em Nanjing, 69 de 100 (69%) amostras em Wuhan, 85 de 90 (94,5%) amostras em Xangai e 106 de 109 (97,2%) amostras em Qingdao foram consideradas positivas para *G. duodenalis*. Todas as amostras pertenciam aos dois genótipos conhecidos de *G. duodenalis* (assemblages A e B) de humanos. O Assemblage A foi detectado em 243 de 319 amostras (76,1%) e o Assemblage B foi encontrado em 59 amostras (18,5%). Estes dados sobre presença de *G. duodenalis* nos esgotos das quatro cidades Chinesas apontam na mesma direção dos resultados obtidos nas estações "A" e "B" em São Paulo, onde ambas apresentaram *G. duodenalis* em pelo menos três amostras analisadas via qPCR durante o período do estudo. Contudo, tivemos desafios com a utilização dos primers selecionados no ensaio de Nested PCR. Não foi possível concluir qual foi a causa, porém as amostras sequenciadas não nos permitiram a identificação dos assemblages A e B. Como hipótese, levantamos possíveis problemas de

identificação devido a bases degeneradas, pois os fragmentos enviados para o sequenciamento não apresentaram resultados positivos para as espécies de *Giardia* spp. como aconteceu no ensaio de qPCR.

Outras hipóteses possíveis para os resultados negativos no sequenciamento de *Giardia duodenalis* de ambas as estações são a degradação do material genético durante o período de armazenamento das lâminas, a baixa quantidade do gene selecionado presentes nas amostras (dificultando a amplificação na análise) e a resistência da parede celular dos cistos de *Giardia* spp. que pode ter prejudicado a extração completa do DNA. Não nos foi possível reanalisar as amostras de DNA recuperado com outros primers durante o tempo deste estudo, sendo que seguiremos com a continuidade das análises, testando novos primers, em estudos futuros.

Um outro ponto que nos chamou a atenção foi o fato de que tanto a amostra de código "19/16" quanto a "88/16" se mostraram positivas para a presença de *Giardia duodenalis* no ensaio molecular de qPCR, mesmo não tendo sido detectadas nas leituras em microscopia de fluorescência, o que aponta limitações durante a análise em microscopia, como dificuldades de leitura devido a altas cargas de matéria orgânica na lâmina, manchas que se formam eventualmente nos poços das lâminas devido ao uso dos corantes ou até mesmo falhas na coloração fluorescente dos cistos, uma vez que esta análise é muito menos sensível e específica que as análises moleculares, posteriormente utilizadas. Para *Cryptosporidium hominis, Cryptosporidium parvume Cryptosporidium meleagridis* o mesmo ocorreu no ensaio de qPCR com as amostras "208/16" e "123/16". As demais amostras positivas em microscopia, porém negativas nas análises via qPCR podem, de fato, estar contaminadas por cistos e oocistos de outras espécies de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., uma vez que os primers utilizados são bastante específicos para as espécies anteriormente listadas.

Portanto a presença de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. de espécies que se configuram como risco para a saúde humana presentes em águas de reúso em diversas ETEs detectados no presente estudo, ressalta o risco para a saúde pública e reforça a importância do controle destas. É fundamental que se conheçam as espécies presentes para que a utilização deste recurso repercuta na mitigação de problemas ambientais e em aplicações melhor regulamentadas, reduzindo a exposição da população a fatores de risco à saúde. Segundo DINGEMANS *et. al*. (2020) é necessária

a criação de bancos de dados sobre perigos, riscos, exposições e medidas preventivas para desenvolver conhecimento científico especializado e prático de maneira consistente e eficiente na área do reúso de águas. A produção de conhecimento na área e ferramentas de tomada de decisão são necessários para disseminar o conhecimento especializado, trazendo informações valiosas para a reutilização responsável da água para gestores e para as partes interessadas.

Entende-se também que a presença de parasitas como *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nestas águas pode ser um indicador da presença de outros microrganismos potencialmente prejudiciais à saúde das populações exposta. Como já citado, os requisitos mínimos na legislação brasileira não cobrem suficientemente os riscos relevantes para proteger a saúde humana e ambiental. Para apoiar o reúso responsável de água, a avaliação de casos de reutilização de água requer conhecimento especializado sobre os benefícios e riscos relativos à disponibilidade, qualidade e governança da água. Neste ponto, o presente trabalho contribui com informações relevantes a respeito dos parasitas aqui estudados, levantando possíveis desafios relacionados aos riscos e as ações de enfrentamento.

Alguns dos desafios que podem ser apontados na gestão das águas de reúso no Brasil são semelhantes aos apontados por MARYAM & BÜYÜKGÜNGÖR (2019), que levantaram dados sobre as dificuldades sobre o tema na Turquia. Apesar que as dimensões continentais do Brasil podem acentuar as dificuldades de gestão, existem algumas semelhanças tais como: dados insuficientes sobre os riscos de exposição subsidiando tomada de decisões; deficiências de dados de qualidade microbiológica; dados epidemiológicos escassos ou subnotificados; aspectos sociais do reúso (preconceito ou aversão ao uso de esgoto tratado, mesmo que para atividades consideraras menos nobres); investimentos em modernização das ETEs; e questões políticas, que podem não só dificultar as questões a respeito dos investimentos em infraestrutura bem como investimentos na produção de ciência.

O reúso de águas é, sem dúvida, uma tendência global que tem como principal objetivo a manutenção da qualidade ambiental e também alternativa para se gerenciar a escassez de água, especialmente em situações de estresse hídrico. A reutilização intencional define-se como alternativa para reduzir os riscos de contaminantes microbiológicos derivados de águas residuais para fins urbanos como lavagens de rua e

irrigação de parques. No entanto, sob a perspectiva em Saúde Pública, mesmo em baixas concentrações, a presença de protozoários parasitas nas águas reutilizadas representa um risco potencial à saúde de pessoas expostas a essas águas, especialmente em populações mais sensíveis como crianças, idosos e imunodeficientes. Tais repercussões negativas à saúde podem ser intensificadas nas populações em situação de rua, no trabalhador que aplica essas águas configurando-se em fator de risco ocupacional, pois entram em contato direto ou indireto com os aerossóis formados com a aplicação das águas nas ruas. Ainda há que se considerar os animais de convívio urbano que circulam pelas ruas. Outra possível fonte de disseminação dos cistos e oocistos são os fômites sendo aqui destacados os calçados utilizados para circulação pública e levados para dentro das residências.

Portanto, políticas públicas e instrumentos regulatórios são cruciais para a prática de reúso e, assim, minimizar possíveis efeitos adversos à saúde. No Brasil, como já mencionado anteriormente, não há legislação federal para a regulação da qualidade microbiológica de águas de reúso. Há, no entanto, iniciativas estaduais e municipais para a regulação dessa prática. O estado de São Paulo publicou a resolução SES/SIMA 02/2020 (SÃO PAULO, 2020) anteriormente citada, prevendo o monitoramento de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., em águas não potáveis de uso irrestrito, mais uma vez evidenciando sua importância na transmissão de doenças. A legislação municipal de São Paulo limita-se às condições de uso e indicadores, mas nenhum parâmetro específico para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium*, inclusive para usos em áreas de circulação urbana.

Como visto anteriormente, diversos países têm regulamentações referentes à utilização das águas de reúso. A Austrália, por exemplo, tem seus padrões físico, químicos e microbiológicos para as múltiplas possibilidades de uso deste recurso da forma mais segura possível levando em consideração dados epidemiológicos, sendo inclusive *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. considerados no monitoramento e avaliação da qualidade desses recursos. Outros países como México e Espanha se utilizam de indicadores de contaminação fecal e ovos de helmintos, os quais podem não ser eficientes para demonstrar a disseminação de parasitas específicos nos ambientes urbanos.

Os parasitas *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. têm sido relatados na literatura demonstrando que sua circulação ocorre livre no ambiente, inclusive nos esgotos tratados ou não, sendo objeto de estudos sobre os riscos associados à saúde (CAPODAGLIO 2020, AMOUEYAN *et al.* 2019).

6. CONCLUSÃO

Um dos principais desafios na gestão de águas, se não o maior, é a questão dos conflitos de interesse gerados pela natural demanda destes recursos para abastecimento público, para a demanda na produção de alimentos e para a demanda industrial. A água de reúso se mostra uma forte aliada da gestão dos recursos hídricos no Brasil, inclusive fazendo parte de um contexto maior de economia circular e sustentabilidade. Os dados aqui obtidos apontam a ocorrência da espécie *Giardia duodenalis* e das espécies *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium meleagridis* nas amostras de águas de reúso, com destaque para as espécies que foram identificadas via sequenciamento. Estes dados contribuirão com subsídios para a elaboração de regulamentação adequada para o uso deste recurso em ambiente urbano ou outros usos onde a qualidade da água seja satisfatória para a proteção da saúde e do ambiente. Assim, a elaboração de regulamentação baseada no princípio da prevenção, com monitoramento de parâmetros microbiológicos que podem trazer riscos à saúde da população exposta (em especial as atividades ocupacionais que envolve águas de reúso), é de grande importância para proteger a saúde humana. O caráter heterogêneo de populações como a da cidade de São Paulo pode potencializar os riscos trazidos pela dispersão de patógenos pela água de reúso, uma vez que pessoas em diferentes condições imunológicas (imunocompetentes e imunocomprometidos) podem apresentar repercussões distintas quando expostas a patógenos presentes no ambiente, tais como pessoas em situação de abandono social.

Portanto, para que a qualidade parasitológica das águas de reúso na cidade de São Paulo seja adequada e reduza riscos de infecção, se faz necessário que o aumento de investimentos em infraestrutura e em novas tecnologias para desinfecção dessas águas, assim como a criação de uma nova regulamentação de usos, ou a atualização das já existentes, tanto em nível municipal quanto estadual e federal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOUEYAN E., AHMAD S., EISENBRG JNS., GERRITY D. Equivalency of indirect and direct potable reuse paradigms based on a quantitative microbial risk assessment framework. **Microbial Risk Analysis**, v. 12, p. 60–75, ago. 2019.

ANGELAKI, A. N., GIKAS, P. Water reuse: Overview of current practices and trends in the world with emphasis on EU States. **Water Utility Journal**. v. 8, p. 67-78, 2014.

ARAÚJO, R.S., AGUIAR, B., DROPA, M. *et al.* .2018. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. species and *Giardia* spp. assemblages in two watersheds in the metropolitan region of São Paulo, Brazil. **Environ Sci Pollut Res**. 25**,** 15191–15203 (2018).

ASANO, T. (ed.). **Water reuse: issues, technologies, and applications**. New York: McGraw-Hill, 2007.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6603–6614, 2011.

BRASIL 1997. LEI Nº 9.433, DE 8 DE JANEIRO DE 1997, Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9433.htm>. Acesso em: 11 out. 2020.

BRASIL 2005. portaria 518/2004BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518/2004, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 mar. 2004.

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

BUREK, P. et al. Water Futures and Solution - Fast Track Initiative (Final Report). Monograph. Disponível em: <http://pure.iiasa.ac.at/id/eprint/13008/>. Acesso em: 8 nov. 2020.

CACCIÒ, S.M.; BECK, R.; LALLE, M.; et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. International Journal for Parasitology, v. 38, n. 13, p. 1523–1531, 2008.

CAPODAGLIO, A. G. Fit-for-purpose urban wastewater reuse: Analysis of issues and available technologies for sustainable multiple barrier approaches. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v. 0, n. 0, p. 1–48, 15 maio 2020.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CORREIA DA COSTA, J. M.; MEZO, M. Contribution of Treated Wastewater to the Contamination of Recreational River Areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3528–3538, jul. 2008.

CONSELHO NACIONAL DE RECURSOS HÍDRICOS – CNRH. (2005.) Estabelece modalidades e critérios gerais para a prática de reúso direto não potável de água, e dá outras providências. http://www.cnrh-srh.gov.br/http://www.cnrh-srh.gov.br/ (accessed 10 December 2006).

DAVID, É.; GUIMARÃES, S.; DE OLIVEIRA, A.; GOULART DE OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.; NOGUEIRA BITTENCOURT, G.; MORAES NARDI, A.; MARTINS RIBOLLA, P.; BUENO FRANCO, R.; BRANCO, N.; TOSINI, F.; BELLA, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Molecular Characterization of Intestinal Protozoa in Two Poor Communities in the State of São Paulo, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 103, 2015.

DI GIOVANNI, G. D.; BETANCOURT, W. Q.; HERNANDEZ, J.; ASSADIAN, N. W.; FLORES MARGEZ, J. P.; LOPEZ, E. J. Investigation of Potential Zooanthroponotic Transmission of Cryptosporidiosis and *Giardia* spp.sis through Agricultural Use of Reclaimed Wastewater∗. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 16, n. 6, p. 405–418, dez. 2006.

DINGEMANS, M. M. L. et al. Responsible Water Reuse Needs an Interdisciplinary Approach to Balance Risks and Benefits. Water, v. 12, n. 5, p. 1264, maio 2020.

DUNGENI, M.; MOMBA, M. The abundance of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in treated effluents produced by four wastewater treatment plants in the Gauteng Province of South Africa. **Water SA**, v. 36, n. 4, 24 ago. 2010.

DUONG, K.; SAPHORES, J.-D. M. Obstacles to Wastewater Reuse: An Overview: Obstacles to Wastewater Reuse. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Water**, v. 2, n. 3, p. 199–214, maio 2015.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Evolution of Monitoring for *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in Water. **Water Research**, v. 123, p. 96–112, out. 2017.

ENVIRONMENT PROTECTION AND HERITAGE COUNCIL; NATURAL RESOURCE MANAGEMENT MINISTERIAL COUNCIL. **Overview of the Australian guidelines for water recycling: managing health and environmental risks (phase 1)**. Canberra: Natural Resource Management Ministerial Council : Environment Protection and Heritage Council, 2008.

ESPANHA. Decreto Real 1620/2007, Reutilización de las aguas depuradas. v. 294, p. 50639. **Boletín Oficial del Estado**, 2007.

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

FRANZÉN, O.; JERLSTRÖM-HULTQVIST, J.; CASTRO, E.; SHERWOOD, E.; ANKARKLEV, J.; REINER, D. S.; PALM, D.; ANDERSSON, J. O.; ANDERSSON, B.; SVÄRD, S. G. Draft Genome Sequencing of *Giardia* spp. Intestinalis Assemblage B Isolate GS: Is Human *Giardia*sis Caused by Two Different Species? **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, p. e1000560, 21 ago. 2009.

HAMILTON, K. A.; WASO, M.; REYNEKE, B.; SAEIDI, N.; LEVINE, A.; LALANCETTE, C.; BESNER, M.-C.; KHAN, W.; AHMED, W. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Wastewater and Surface Water Environments. **Journal of Environment Quality**, v. 47, n. 5, p. 1006, 2018.

HATAM-NAHAVANDI, K.; MOHEBALI, M.; MAHVI, A.-H.; KESHAVARZ, H.; KHANALIHA, K.; TARIGHI, F.; MOLAEI-RAD, M.; REZAEIAN, T.; CHAREHDAR, S.; SALIMI, M.; FARNIA, S.; REZAEIAN, M. Evaluation of *Cryptosporidium* spp. Oocyst and *Giardia* spp. Cyst Removal Efficiency from Urban and Slaughterhouse Wastewater Treatment Plants and Assessment of Cyst Viability in Wastewater Effluent Samples from Tehran, Iran. **Journal of Water Reuse and Desalination**, v. 5, n. 3, p. 372–390, set. 2015.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne Transmission of Protozoan Parasites: A Worldwide Review of Outbreaks and Lessons Learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, n. 1, p. 1–38, mar. 2007.

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

MARYAM, B.; BÜYÜKGÜNGÖR, H. Wastewater reclamation and reuse trends in Turkey: Opportunities and challenges. Journal of Water Process Engineering, SI: Sust Water Processing. v. 30, p. 100501, 1 ago. 2019.

MEDEIROS, G.A.; JUNIOR, O.O.C.; VACCARI, G.B. Potencialidades do reúso da água: estudos de caso no setor sucroalcooleiro e universitário. **Engenharia Ambiental**, v. 9, n. 1, p. 003-016, jan/mar. 2012.

MÉXICO. Diario oficial. Norma Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-1997. **Que establece los lımites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público**. México, DF, v. 21, 1998.

MORGAN-RYAN, U. M.; FALL, A.; WARD, L. A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; PAYER, R.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. Hominis n. Sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo Sapiens. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 433–440, nov. 2002.

NASSER, A. M. Removal of *Cryptosporidium* spp. by Wastewater Treatment Processes: A Review. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 1, p. 1–13, fev. 2016.

NASSER, A. M.; VAIZEL-OHAYON, D.; AHARONI, A.; REVHUN, M. Prevalence and Fate of *Giardia* spp. Cysts in Wastewater Treatment Plants: *Giardia* spp. Cysts in Wastewater. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 477–484, set. 2012.

NISHI, L.; VIEIRA, A. M. S.; VIEIRA, M. F.; SILVA, G. F.; BERGAMASCO, R. Application of Hybrid Process of Coagulation/Flocculation and Membrane Filtration for the Removal of Protozoan Parasites from Water. Procedia Engineering, CHISA 2012. v. 42, p. 148–160, 1 jan. 2012.

OLIVEIRA, G. L. **Processos de tratamento biológico e físico-químico combinados visando o reúso de esgoto sanitário**. 2012. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

ONU. The road to dignity by 2030: ending poverty, transforming all lives and protecting the planet. Synthesis report of the Secretary-General on the post-2015 sustainable development agenda. New York: United Nations, 2014.

OPAS. ACHA, P. N.; SZYFRES, B.; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Washington, D.C.: Organização Pan-Americana Da Saúde, 2003.

PLUTZER, J.; KARANIS, P.. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. Water Research, v. 101, p. 318–332, 2016.

POHL, S. C.; LENZ, D. M. Utilização de efluente tratado em complexo industrial automotivo. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 3, p. 551–562, maio 2017.

PUTIGNANI, L.; MENICHELLA, D. Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. Review Article. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ipid/2010/753512/>. Acesso em: 8 nov. 2020.

RAZZOLINI, M.T.P.; BRETERNITZ, B.S.; KUCHKARIAN, B.; BASTOS, V.K. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in urban wastewater: A challenge to overcome. Environmental Pollution, v. 257, p. 113545, 2020.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L.. *Cryptosporidium* spp. species in humans and animals: current understanding and research needs. Parasitology, v. 141, n. 13, p. 1667–1685, 2014.

RYAN, U.; PAPARINI, A.; MONIS, P.; HIJJAWI, N. It's Official – *Cryptosporidium* spp. Is a Gregarine: What Are the Implications for the Water Industry? **Water Research**, v. 105, p. 305–313, nov. 2016.

SANTOS, L. U. dos; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R. M. B.; GUIMARÃES, J. R. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in raw and effluent wastewater: critical evaluation of methods. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 115–120, jun. 2011.

SANTOS, P. R. dos; DANIEL, L. A. Occurrence and Removal of *Giardia* spp. Cysts and *Cryptosporidium* spp. Oocysts from a Municipal Wastewater Treatment Plant in Brazil. **Environmental Technology**, v. 38, n. 10, p. 1245–1254, 19 maio 2017.

SÃO PAULO. Lei nº16174, de 22 de abril de 2015. Estabelece regramento e medidas para fomento ao reúso de água para aplicações não potáveis, oriundas do polimento do efluente final do tratamento de esgoto, de recuperação de água de chuva, da drenagem de recintos subterrâneos e de rebaixamento de lençol freático. **Diário Oficial do Município de São Paulo**. 23 abr. 2015, p. 1.

SÃO PAULO. Resolução conjunta SES/SMA/SSRH nº 01, de 28 de junho de 2017. Disciplina o reúso direto não potável de água, para fins urbanos, proveniente de Estações de Tratamento de Esgoto Sanitário e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado, São Paulo**, 28 jun. 2017, p. 41-42. Seção 1.

SÃO PAULO. Resolução conjunta SES/SIMA nº 01, de 13 de fevereiro de 2020. Disciplina o reúso direto não potável de água, para fins urbanos, proveniente de Estações de Tratamento de Esgoto Sanitário e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado, São Paulo**, 01 fev. 2020, p. 42. Seção 1.

SILVA, SHEILA O. S.; RICHTZENHAIN, LEONARDO J.; BARROS, IRACEMA N.; et al. A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. Experimental Parasitology, v. 135, n. 3, p. 551–557, 2013.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. ***Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Disinfected Wastewater by Concentration/IMS/IFA**. Estados Unidos, Setembro, 2014.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for Water Reuse. EPA/600/R-12/618**. Washington, DC Setembro, 2012.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. **Water Recycling and Reuse | Region 9: Water | USEPA**. Disponível em: https://www3.epa.gov/region9/water/recycling. Acesso em: 10 out. 2018.

WHO, Reuse of Effluents: Methods of Wastewater Treatment and Health Safeguards. Annals of Internal Medicine, v. 79, n. 2, p. 329, 1 ago. 1973.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. 4th. Edition. Genebra, 2011.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guideline for the safe use of wastewater, excreta and greywater in agriculture**. Volume 4: wastewater use in agriculture. Genebra, 2006.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Water safety in distribution systems**. World Health Organization, 2014.

WINPENNY, J. T.; HEINZ, I.; KOO-OSHIMA, S. **The wealth of waste: the economics of wastewater use in agriculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010.

WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). The United Nations World Water Development Report, 2017. **Wastewater: The Untapped Resource**. Paris, UNESCO, 2017.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; *et al*. Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* spp. Parasites Based on the Small-Subunit rRNA Gene Locus. Applied and Environmental Microbiology, v. 65, n. 4, p. 1578–1583, 1999.

YU, X.; VAN DYKE, M. I.; PORTT, A.; HUCK, P. M. Development of a Direct DNA Extraction Protocol for Real-Time PCR Detection of *Giardia* spp. *Lamblia* from Surface Water. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 6, p. 661–668, ago. 2009.

ZINTL, A.; PROCTOR, A. F.; READ, C.; DEWAAL, T.; SHANAGHY, N.; FANNING, S.; MULCAHY, G. The Prevalence of *Cryptosporidium* spp. Species and Subtypes in Human Faecal Samples in Ireland. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 02, p. 270, fev. 2009.

ANEXOS

MÉTODO USEPA 1693/2014

Para a coleta da água, preparo e análise das lâminas da água de reúso foi utilizado o método 1693/USEPA (2014). O método consiste em realizar a filtração, eluição, concentração, separação imunomagnética dos cistos e oocistos, coloração por imunofluorescência e DAPI (4′,6-Diamidine-2′-phenylindole dihydrochloride) para coloração fluorescente dos núcleos, a fim de se detectar os cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em microscopia de imunofluorescência. As lâminas foram armazenadas refrigeradas em temperatura adequada (4ºC) e ao abrigo de luz. As lâminas foram utilizadas para o processo de raspagem das amostras e recuperação dos cistos e oocistos a fim de a realizar a extração do DNA e a caracterização molecular dos cistos e oocistos utilizando o Real-Time PCR (qPCR), além do Nested PCR e sequenciamento das amostras positivas.

FILTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras foram filtradas utilizando uma bomba peristáltica e cápsulas Envirochek HV. O fluxo da bomba foi ajustado de forma a não exceder 1 litro por minuto e, antes de cada procedimento de filtração, os frascos com as amostras foram devidamente homogeneizados. Para o início do procedimento, a cápsula foi acoplada na bomba de pressão, que foi mantida ligada até que toda a amostra fosse filtrada. Para evitar perda de material, os frascos de polipropileno foram lavados com cerca de 1 litro de PBST e 1 litro de água de osmose reversa após o término da filtração, e esta água da lavagem foi novamente filtrada para recuperação de cistos e oocistos residuais possivelmente aderidos no frasco. Foram tomados os devidos cuidados com a bomba peristáltica para que não ocorresse a retrolavagem da cápsula, o que resultaria em perda de amostra.

ADIÇÃO DO DISPERSANTE

Para a adição do dispersante, a cápsula Envirochek HV foi fixada no sistema Envirochek. A solução dispersante hexametafosfato de sódio (NaHMP) foi adicionada de forma a cobrir por completo toda a membrana da cápsula. O sistema foi então ligado, agitando a amostra com a solução dispersante a 900 rpm por 5 minutos. Após a agitação, houve o descarte de toda a solução dispersante conforme o procedimento recomendado pelo fabricante. Para que o dispersante residual fosse removido, foi adicionada de água destilada na cápsula, e então a água foi descartada.

ELUIÇÃO

Para a realização da eluição, a cápsula Envirochek HV foi novamente fixada no sistema Envirochek. A tampa de entrada foi então retirada e a solução tampão de fosfato-salino com tween-20 (PBST) para eluição foi adicionada de forma a cobrir por completo toda a membrana da cápsula. A tampa de entrada foi então recolocada e a cápsula fixada um uma das pinças do agitador com a válvula de purga voltada para o topo do eixo vertical do homogeneizador. O agitador foi então ligado a 900 rpm por 5 minutos. A cápsula foi retirada do homogeneizador ao final deste processo e o conteúdo desta foi então adicionado a um tubo cônico de centrifugação.

A cápsula foi novamente fixada no sistema em posição vertical com a entrada voltada para cima, onde foi adicionada a solução tampão para eluição. A cápsula foi então fixada em uma das pinças do agitador com a válvula de purga posicionada no topo do eixo vertical do homogeneizador. O agitador foi ligado novamente em velocidade de 900 rpm durante 5 minutos.

Ao final da agitação, a solução de eluição foi mantida na cápsula, que foi posicionada novamente no agitador. Após a agitação, a cápsula foi retirada e o conteúdo da mesma foi adicionado em um tubo cônico de centrifugação de 250 mL. Foi utilizada uma pisseta com solução tampão PBST para lavar as paredes interiores da cápsula a fim de evitar perda de cistos. O líquido contido na cápsula foi então transferido para o tubo de centrifugação utilizado anteriormente.

CONCENTRAÇÃO E IMS (SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA)

Os tubos cônicos de centrífuga (250 mL) foram colocados em uma centrífuga por quinze minutos com velocidade de 2500 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido cuidadosamente com uma pipeta até que o volume restante no tubo cônico fosse de 5 mL para não haver suspensão e comprometimento do pellet obtido. Após a remoção do sobrenadante, o pellet foi suspenso com agitação em vortex, e então todo o volume foi adicionado a um tubo tipo Falcon de 50 mL. Os tubos Falcon foram então centrifugados por quinze minutos a 2500 rpm. O sobrenadante da amostra foi removido com uma pipeta com bastante cuidado para que não houvesse comprometimento do pellet, até que o volume restante no tubo Falcon fosse de 5 mL. O pellet foi então suspenso novamente com o auxílio de um vortex e a amostra foi transferida para um tubo de lado plano (tubo de Leighton) identificado. O tubo Falcon foi então lavado com 5 mL (em duas lavagens de 2,5 mL cada) de água destilada com o auxílio de uma pisseta para recuperar possíveis cistos e oocistos aderidos ao tubo, e então transferido também para o tubo de lado plano.

Em cada tubo de Leighton, foram adicionados os tampões SL-A 10X e SL-B 10x, Dynabeads (anticorpos magnéticos específicos) anti-*Giardia* spp., e Dynabeads anti-*Cryptosporidium* spp. de acordo com as informações do fabricante do KIT (*Dynabeads® Life Technologies*™) e adicionado kaolin em cada tubo. Cada tubo então foi colocado em um mixer rotatório. Ao final do procedimento de agitação, o tubo foi colocado em um concentrador de partículas magnéticas (MPC-1) de forma a encostar o lado plano do tubo em contato com o imã do concentrador. A amostra foi então homogeneizada. O sobrenadante da amostra foi então descartado, mantendo-se apenas o sedimento aderido ao lado plano do tubo. Para a suspensão deste sedimento, foi preparada uma solução Tampão SL-A 1X diluindo-se o tampão SL-A 10X em água destilada. Foi adicionado 1 mL desta solução ao tubo de lado plano de forma a suspender toda a amostra, e então adicionado a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Uma nova lavagem com 0,5 mL do tampão SL-A 1x foi realizada no tubo de lado plano e então adicionada novamente ao tubo de microcentrífuga.

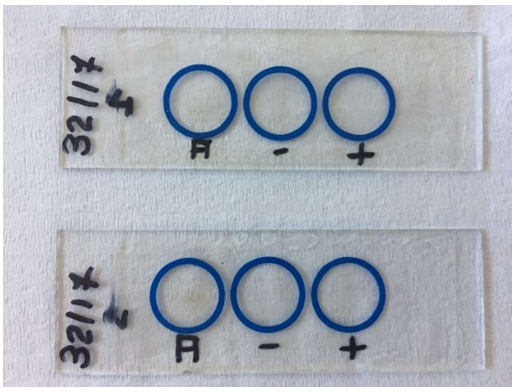
Cada tubo de microcentrífuga foi colocado em um segundo concentrador de partículas magnéticas (MPC-M), com a fita magnética em contato com os tubos. O concentrador foi então agitado manualmente por cerca de um minuto. Ao final deste procedimento, o sobrenadante foi novamente descartado com bastante cuidado utilizando

uma pipeta. A faixa magnética foi removida do equipamento e então foi adicionada água destilada ao tubo de microcentrífuga. O tubo foi colocado em um vortex para a ressuspensão do sedimento. Os tubos foram então colocados em banho-maria a 80ºC para que ocorresse a dissociação térmica dos cistos e oocistos dos Dynabeads. Ao final do banho-maria o tubo voltou a ser agitado em um mixer e depois o colocado novamente no MPC-M com a fita magnética, de forma a separar a amostra dos Dynabeads. O sobrenadante foi então coletado com auxílio de uma pipeta e transferido para o poço da lâmina 1. Iniciou-se então a segunda dissociação térmica da amostra. Para isto, foi adicionada novamente água destilada no tubo de microcentrífuga, e este foi levado novamente ao agitador (vortex). O tubo voltou a ser colocado em banho-maria a 80ºC. Ao final do banho-maria, o tubo voltou a ser agitado em um mixer e depois o colocamos novamente no MPC-M com a fita magnética, de forma a separar o restante dos cistos e oocistos. O sobrenadante foi então coletado com auxílio de uma pipeta e transferido para o poço da lâmina 2.

COLORAÇÃO DE LÂMINAS

Cada lâmina utilizada para a leitura em microscopia de imunofluorescência possui 3 poços (Figura 1). O Primeiro à esquerda foi padronizado sendo sempre utilizado como poço da amostra, o poço central foi utilizado como controle negativo com 10 µL de PBS e o poço da direita foi utilizado com 10 µL de controle positivo (cistos e oocistos) contidos no kit de análise.

Figura - Lâminas preparadas com amostras de água de reúso.



Fonte: Autor.

As lâminas foram deixadas para secar em repouso, em temperatura entre 35º e 45ºC por 60 minutos ao abrigo de luz. Com a lâmina seca, foram adicionados 10 µL de metanol absoluto em cada poço (amostra, negativo e positivo) e a lâmina foi colocada em estufa para secagem. Uma gota de corante Aqua-Glo G/C™ (Waterborne, USA), responsável pela marcação fluorescente dos cistos e oocistos, foi colocada em cada poço da lâmina, que então foi levada à câmara úmida ao abrigo de luz por 30 minutos. Foram adicionados então 50 µL de PBS em cada poço e o excesso foi removido com o auxílio de uma pipeta. 50 µL de DAPI foram colocados em cada poço da lâmina, que foi deixada em repouso por 1 minuto novamente ao abrigo de luz. Para finalizar, foram pipetados 15 µL de DABCO/Glicerol em cada poço da lâmina e foram adicionadas as lamínulas.

CONTROLE DE QUALIDADE

Para a realização do controle de qualidade foi utilizado o método 1693/USEPA de 2014. Utilizou-se a suspensão padronizada AccuSpike™ (Waterborne, USA) contendo 100 de cistos de *Giardia* spp. e 100 oocistos de *Cryptosporidium.* Para as análises de avaliação de desempenho do método foram realizadas três amostras com semeadura experimental para cada tipo de matriz (três para a ETE "A" e três para a ETE "B"). Para a ETE "B", a taxa de recuperação de *Giardia* spp. ficou em 50% e *Cryptosporidium* spp. em 37%, já na ETE "A", obtivemos 51% de recuperação de *Giardia* spp. e 39% de *Cryptosporidium*. Todos os resultados estão dentro da faixa de aceitação recomendada pelo método da USEPA/1693.