



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FELIPPE DANYEL CARDOSO MARTINS

**MONITORAMENTO DE *Cryptosporidium* E *Giardia* EM  
ESGOTO BRUTO E TRATADO EM UMA ESTAÇÃO DE  
TRATAMENTO DE ESGOTO, LONDRINA/PR, BRASIL**

FELIPPE DANYEL CARDOSO MARTINS

**MONITORAMENTO DE *Cryptosporidium* E *Giardia* EM  
ESGOTO BRUTO E TRATADO EM UMA ESTAÇÃO DE  
TRATAMENTO DE ESGOTO, LONDRINA/PR, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa Dra. Roberta Lemos Freire.

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

MARTINS, Felipe Danyel Cardoso .

Monitoramento de *Cryptosporidium* e *Giardia* em esgoto bruto e tratado em uma estação de tratamento de esgoto, Londrina/Pr, Brasil / Felipe Danyel Cardoso MARTINS. - Londrina, 2016.  
48 f.

Orientador: Profa Dra. Roberta Lemos Freire.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Doenças Negligenciadas - Tese. 2. Diarreia - Tese. 3. Contaminação Ambiental - Tese. 4. PCR-RFLP - Tese. I. Freire, Profa Dra. Roberta Lemos. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

FELIPPE DANYEL CARDOSO MARTINS

**MONITORAMENTO DE *Cryptosporidium* E *Giardia* EM ESGOTO  
BRUTO E TRATADO EM UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE  
ESGOTO, LONDRINA/PR, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Lemos Freire  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Liza Ogawa  
Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

---

Dra. Leticia Nishi  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 26 de fevereiro de 2016.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública e no Laboratório de Protozoologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roberta Lemos Freire.

O recurso financeiro para o desenvolvimento do projeto foi obtido junto ao órgão de fomento à pesquisa, abaixo relacionado:

- 1. Funasa – Fundação Nacional de Saúde**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sueli e Julio por todo apoio, educação, ensinamentos de vida, além de todo esforço minha formação.

À minha namorada Natalia Bricks Soler que esteve ao meu lado com muita alegria, carinho, paciência e compreensão, sempre disposta a me ajudar e a me motivar.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Roberta Lemos Freire, pela oportunidade, por todos seus conselhos e orientações no desenvolvimento deste estudo, sempre presente e disposta a sanar minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Italmar Teodorico Navarro, por ter aceito compor a banca de qualificação, por toda confiança, conselhos, pelas oportunidades de investigações de surtos, foi peça chave na minha formação como homem e profissional.

Ao Prof João Luis Garcia, por toda orientação durante o período do mestrado e pela oportunidade de colaborar com suas pesquisas.

A Dr<sup>ª</sup> Letícia Nishi, por dispor seu tempo para se deslocar à Londrina e participar da banca de defesa desta dissertação.

Ao Dr Marcio Costa por aceitar compor a banca de qualificação e colaborar com a correção deste trabalho.

À Winni, Camila e Aline, grandes pessoas e ótimas estagiarias, foram essenciais no desenvolvimento deste estudo.

À todos da ETA-Tibagi e ETE-Sul, por facilitarem o acesso, auxiliarem as coletas, e por terem aceito o desafio deste projeto.

À Beatriz Nino, companhia diária no laboratório, por todos os conselhos e ideias para o desenvolvimento deste estudo.

Aos técnicos Aldair Matos e Elizabete Marana pela ajuda neste estudo.

Aos estagiários, e residentes por todo auxílio na realização deste projeto e sobretudo pela amizade.

À Pampinha por ter me levado a UEL, e resistido bravamente as coletas.

A todos que tive o prazer de conviver durante todo o mestrado, companheiros de pós graduação e de laboratório, cada um de vocês teve papel importante na minha formação.

MARTINS, Felipe Danyel Cardoso Martins. **Monitoramento de *Giardia* e *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado em uma Estação de Tratamento de Esgoto, Londrina/PR, Brasil.** 2016. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são etiologias de doença gastrointestinal em animais e humanos, com importância em jovens e adultos. *Cryptosporidium* é o segundo maior causador de diarreia em crianças menores de 5 anos na África e Ásia e *Giardia* é o protozoário mais frequentemente encontrado em humanos. O ciclo de vida se completa em apenas um hospedeiro, a infecção ocorre pela ingestão de oocistos (*Cryptosporidium*) e cistos (*Giardia*) eliminados nas fezes de seus hospedeiros, a água e alimentos são importantes vias de transmissão. As taxas de incidência e prevalência destas protozooses em humanos no Brasil são pouco estimadas, há uma carência de estudos moleculares para o melhor entendimento da epidemiologia molecular destas protozooses. No Brasil estes protozoários já foram descritos em esgoto bruto e tratado, isto sugere uma importante circulação destes protozoários na população humana, o descarte de esgoto mesmo que tratado representa risco à saúde pública. O objetivo do presente estudo foi monitorar a ocorrência de *Giardia* e espécies de *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado em uma estação de tratamento de esgoto de Londrina, Paraná. As amostras de esgoto bruto e tratado foram coletadas no período de um ano, com periodicidade quinzenal e foram concentradas por centrifugação e filtração, respectivamente. A ocorrência destes protozoários foi caracterizada por meio de extração de DNA seguida de nested-PCR, foram utilizados o gene 18S rRNA de *Giardia* ssp. e 18S rRNA de *Cryptosporidium* spp. A caracterização das espécies de *Cryptosporidium* foi realizada por meio de análise por polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP) dos produtos obtidos. Durante o período de estudo 50 amostras foram coletadas, 25 de esgoto bruto e 25 de esgoto tratado. Todas as amostras de esgoto bruto e 76% das de esgoto tratado foram positivas para *Giardia* spp. *Cryptosporidium* esteve presente em 84% das amostras de esgoto bruto e em 8% do tratado. No esgoto tratado foi encontrado apenas *C. muris*, já nas amostras de esgoto bruto foram detectadas cinco espécies: *C. muris*, *C. hominis*, *C. baileyi*, *C. suis* e *C. parvum*, em 100%, 19,04%, 9,52%, 9,52% e 4,76%, das amostras, respectivamente. A presença de espécies mistas foi observada em 19,04% das amostras. Este estudo conclui que poucos estudos no Brasil abordam a caracterização molecular destes protozoários. Há ocorrência de *Giardia* e *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado em Londrina/PR. Foi possível a identificação de *C. muris* em esgoto tratado e cinco espécies de *Cryptosporidium* em esgoto bruto: *C. muris*, *C. suis*, *C. hominis*, *C. parvum* e *C. baileyi*, por meio da PCRRFLP. A identificação de *C. muris*, *C. suis* e *C. baileyi* sugere que ocorra a contaminação do esgoto com fezes de roedores, suínos e aves. Nas amostras de esgoto bruto a ocorrência de *C. hominis* prevaleceu sobre *C. parvum*. São necessários estudos epidemiológicos, utilizando-se ferramentas moleculares, a fim de melhor entender a epidemiologia molecular de *Cryptosporidium* na população brasileira, além de investigar o papel de espécies como *C. muris* e *C. suis* na criptosporidiose humana.

**Palavras-chave:** Doenças Negligenciadas. Diarreia. Contaminação Ambiental. PCR-RFLP.

MARTINS, Felipe Danyel Cardoso Martins. **Surveillance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Raw and Treated Sewage in a Wastewater Treatment Plant, Londrina/PR, Brazil.** 2016. 48 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

*Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. are causes of gastrointestinal diseases in animals and humans, with importance in young and adults. *Cryptosporidium* is second largest diarrheacausing in children under 5 years in Africa and Asia and *Giardia* the parasite most found in humans. The life cycle is completed in only one host, the infection occurs by ingestion of oocysts (*Cryptosporidium*), and cysts (*Giardia*) eliminated in feces of their hosts, water and food are important routes of transmission. The incidence and prevalence of these protozoan infections in humans from Brazil are poorly estimated, there is a lack of molecular studies to better understand the molecular epidemiology of these protozoans. The presense of these protozoans in raw and treated sewage has been described in Brazil, and suggests a significant occurrence in human population, the sewage disposal even if treated causes a risk to public health. The aim of this study was to perform a surveillance in the occurrence of *Giardia* and species of *Cryptosporidium* in raw and treated sewage in a wastewater treatment plant in Londrina, Paraná. Samples of raw and treated sewage were collected within a year, bimonthly, and concentrated by means of centrifugation and filtration respectively. The occurrence of these protozoans was achieved based in DNA extraction followed by nested PCR, targeting the *Giardia* 16S rRNA and *Cryptosporidium* 18S rRNA gene. The species characterization in positive *Cryptosporidium* samples were performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Twenty-five samples were collected of both, raw and treated sewage. For *Giardia*, all raw sewage samples and 76% of treated sewage were positive. *Cryptosporidium* was positive in 84% of raw and 8% of treated sewage. *C. muris* was the only species found in treated sewage, in raw sewage we found five species: *C. muris*, *C. hominis*, *C. baileyi*, *C. parvum* and *C. suis* in 100%, 19.04%, 9,52%, 9.52% and 4.76%, respectively. Multiple species were observed in 19.04%. This study concludes that few studies in Brazil address the molecular characterization of these protozoa. *Giardia* and *Cryptosporidium* were found in both raw and treated sewage in Londrina/PR. The identification of *C. muris* in treated wastewater and five species of *Cryptosporidium* in raw sewage: *C. muris*, *C. suis*, *C. hominis*, *C. parvum* and *C. baileyi*, were achieved by means of PCR -RFLP. The identification of *C. muris*, *C. suis* and *C. baileyi* suggests that sewage is contaminated with feces from rodents, pigs and poultry. In raw sewage the occurrence of *C. hominis* prevailed against *C. parvum*. Therefore, epidemiological studies using molecular tools are necessary in the Brazilian population in order to better understand the molecular epidemiology, and to investigate the role of species such as *C. muris* and *C. suis* in human cryptosporidiosis

**Keywords:** Neglected Diseases. Diarrhea. Environmental Pollution. PCR-RFLP.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Possível ciclo de <i>Cryptosporidium</i> spp. em ambiente sem célula hospedeira.....	12
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico clássico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	13
<b>Figura 3.</b> Ciclo biológico de <i>Giardia</i> spp .....	16

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
PCR-RFLP	<i>Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
qPCR	<i>Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>
PCR	Polimerase Chain Reaction
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
2.1	<i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. ....	11
2.2	<i>GIARDIA</i> SPP .....	15
2.3	VEICULAÇÃO HÍDRICA DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> E <i>GIARDIA</i> E SURTOS RELACIONADOS .....	18
2.4	<i>GIARDIA</i> E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> EM ESGOTOS DOMÉSTICO .....	20
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4.</b>	<b>ARTIGO</b> .....	24
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	39
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são organismos que se caracterizam por causarem doença gastrointestinal em animais e humanos, de caráter zoonótico ou não, antes com importância em animais e humanos jovens e/ou imunocomprometidos, hoje com importância também em animais e humanos hígidos (FAYER, 2004; XIAO et al., 2004; RYAN; HIJAWI, 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que as mortes por diarreia somaram 10% do total em 2010 para crianças menores de cinco anos de idade em todo o mundo. Neste cenário, o *Cryptosporidium* é o segundo maior causador de diarreia em crianças menores de 5 anos na África e Ásia e *Giardia* é o protozoário mais frequentemente encontrado em humanos (HAQUE et al., 2007; RYAN; FAYER; XIAO, 2014).

Estes protozoários possuem ciclo de vida que se completa em apenas um hospedeiro, produzem oocistos (*Cryptosporidium*) e cistos (*Giardia*) que se caracterizam pela resistência no meio ambiente e são eliminados nas fezes em grandes quantidades (FAYER, 2010). A infecção ocorre após ingestão de cistos e oocistos, dos quais a água e os alimentos são importantes vias de transmissão (SMITH et al., 2007).

Atualmente no Brasil as taxas de incidência e prevalência destas protozooses em humanos são pouco estimadas. Os poucos estudos que a descrevem são realizados em grupos fechados como crianças atendidas em creches e adultos portadores de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), portanto, existe uma carência de estudos moleculares para o melhor entendimento da epidemiologia molecular destas protozooses em humanos (COUTO; LIMA; BOMFIM, 2014; DAVID et al., 2015).

Estudos realizados em amostras de esgoto no Brasil revelam a presença destes protozoários em esgoto bruto e tratado e sugerem que ocorra uma circulação importante destes protozoários na população humana, já que o descarte de esgoto mesmo que tratado nos corpos hídricos pode representar risco à saúde pública (FARIAS; GAMBA; PELLIZARI, 2002; SANTOS et al., 2011; TONANI et al., 2013).

Portanto são necessários estudos para melhor compreender a complexa epidemiologia, os aspectos moleculares, e ainda para conhecer o risco relacionado à saúde pública que estes protozoários representam nos diversos ambientes.

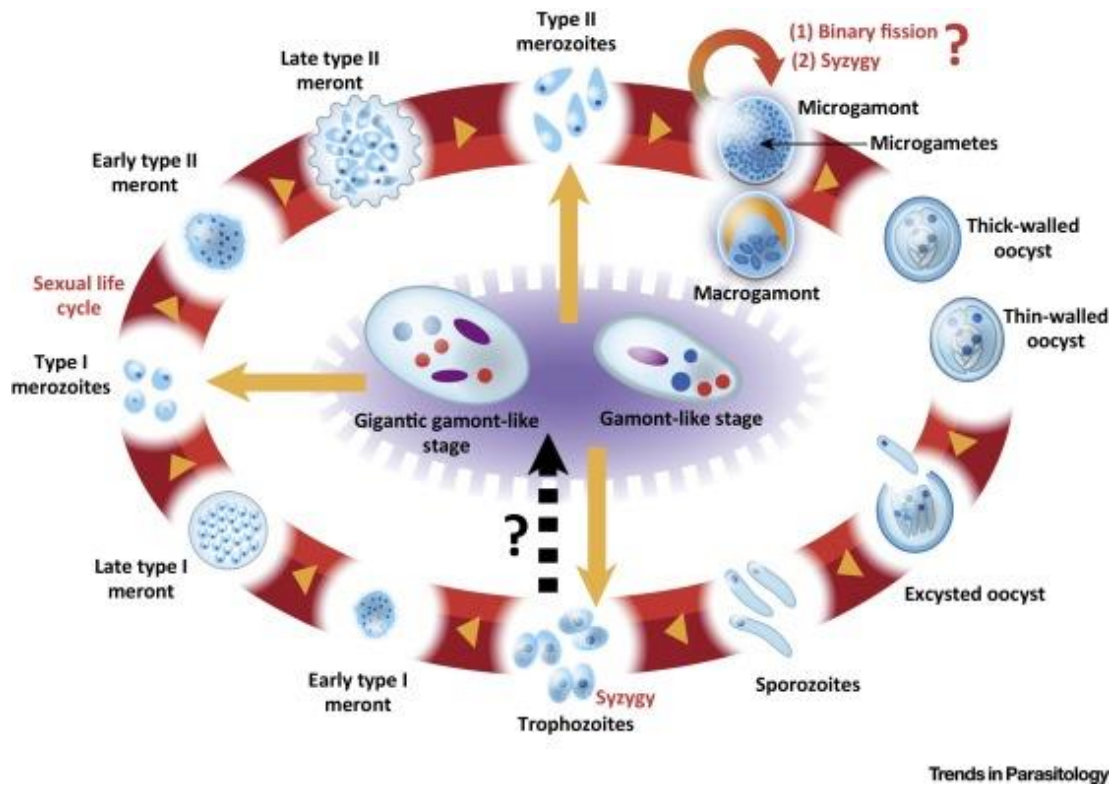
## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

*Cryptosporidium* é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse Coccidia e ordem Eucoccidiorida, porém recentemente novas evidências sugerem que o gênero *Cryptosporidium* está mais próximo da subclasse Gregarina (CLODE; KOH; THOMPSON, 2015). As principais evidências que motivam essa mudança são: a localização dos estágios de desenvolvimento no hospedeiro (intracelular, extracitoplasmático); a forma de ligação do parasita a célula do hospedeiro (organela alimentar na base do vacúolo parasitóforo); a ocorrência de dois tipos de oocistos (parede fina e parede grossa); o pequeno tamanho dos oocistos que não possuem estruturas como esporocisto, micrópila e grânulos polares; a refratariedade frente aos anticoccídios; reação cruzada de anticorpos monoclonais para *Cryptosporidium* spp. com gregarinas; e a evidência de novos estágios extracelulares semelhantes aos gamontes, e encontrados nos ciclos de vida das gregarinas (CLODE; KOH; THOMPSON, 2015; RYAN; HIJJAWI, 2015).

*Cryptosporidium* é conhecido por infectar células epiteliais do trato gastrointestinal, e pode causar infecções extra-intestinais nos pulmões, pâncreas, ductos biliares e vesícula biliar; as co-infecções virais desencadeiam agravamento dos casos (CHALMERS; DAVIES, 2010). A caracterização dos novos estágios extracelulares e o sucesso no cultivo em meio de cultura sem células, motivou a revisão do ciclo do *Cryptosporidium* para assimilar essas novas formas evolutivas. Há evidências de que existam dois ciclos distintos: um intracelular e extracitoplasmático e outro extracelular. O ciclo extracelular (Figura 1) tornou-se evidente a partir da descoberta da multiplicação de *Cryptosporidium* em biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (KOH et al., 2013).

**Figura 1.** Possível ciclo de *Cryptosporidium* spp. em ambiente sem célula hospedeira.

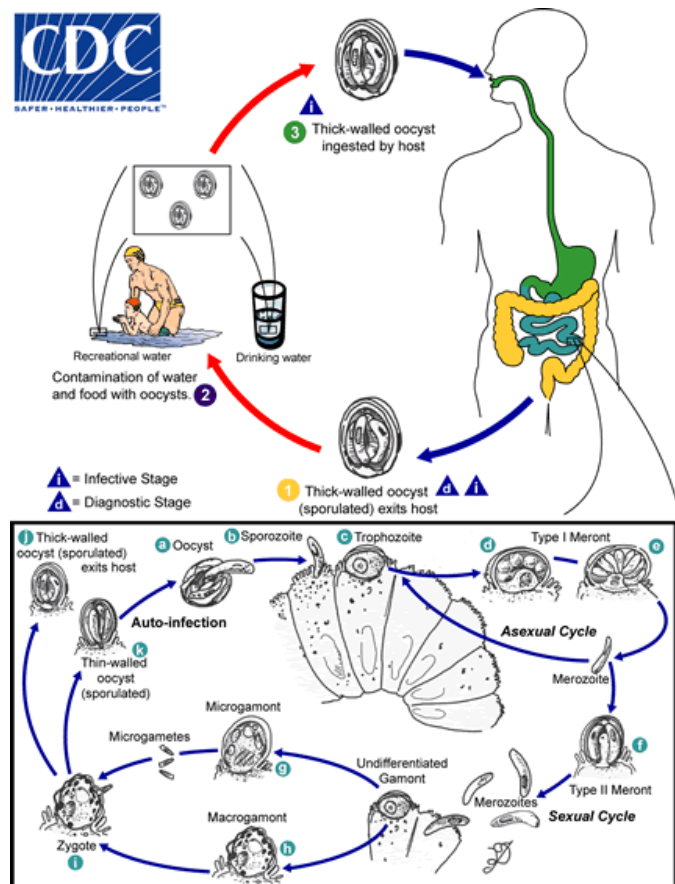


Fonte: Clode, Koh e Thompson (2015, p. 616).

A disseminação do parasita ocorre pela eliminação de oocistos infectantes nas fezes de seus hospedeiros e consequente contaminação do meio ambiente. Os oocistos são capazes de permanecerem viáveis por longo período de tempo no ambiente, são resistentes à salinidade do mar e ao pH baixo do solo. O ciclo se completa com a ingestão de oocistos, pelo hospedeiro suscetível, geralmente associada à água e aos alimentos (FAYER, 2004). A dose infectante para este protozoário é baixa, em condições experimentais humanos saudáveis desenvolveram quadro diarreico com apenas 30 oocistos e o número de oocistos eliminados alcançaram valores de  $10^6$  oocistos durante o período de infecção, e em bezerros os valores chegam a  $10^7$  oocistos/grama de fezes (CHAPPELL et al., 1996; SMITH et al., 2006).

O ciclo clássico descrito com infecção pela ingestão de oocistos e multiplicação do protozoário no intestino de seus hospedeiros está presente na figura 2.

**Figura 2.** Ciclo biológico clássico de *Cryptosporidium* spp.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2015).

O gênero *Cryptosporidium* é composto por 26 espécies e mais de 60 genótipos. Destes, 17 espécies já foram encontradas em humanos (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei*) e três genótipos (*Cryptosporidium* horse, skunk e chipmunk I) (RYAN; FAYER; XIAO, 2014). No entanto *C. hominis*, *C. parvum* e *C. meleagridis* são os mais frequentemente detectados (CACCIÒ et al., 2005; RYAN; FAYER; XIAO, 2014), sendo, *C. parvum* reconhecido como o mais frequente em mamíferos e, portanto, com maior potencial zoonótico (SMITH et al., 2007).

Estudos demonstram diferenças na epidemiologia desta doença; questões culturais, climáticas e geográficas resultam em mudanças na ocorrência e distribuição de espécies, e por consequência nas vias de transmissão (CAMA et al., 2006, 2007; XIAO; FENG, 2008). A distribuição de *C. viatorum* demonstra essas diferenças epidemiológicas; esta espécie é relatada em pessoas que residem ou visitaram o sub-continente indiano, Quênia e Guatemala. No País de Gales e Inglaterra a espécie mais relatada é *C. hominis* seguida de

*C. parvum*, nestes países as infecções esporádicas por espécies de *Cryptosporidium*, principalmente por *C. viatorum*, estão relacionadas às viagens ao sub-contidente indiano. A transmissão desta espécie parece não ocorrer na Europa, as diferenças encontradas entre países desenvolvidos e em desenvolvimento são o principal fator epidemiológico apontado (ELWIN et al., 2012a, 2012b; LEBBAD et al., 2013). Por isso a importância de estudos moleculares em diferentes regiões, para melhor compreender a complexa epidemiologia deste protozoário.

Quanto à distribuição de espécies conhecidamente frequentes como *C. parvum* e *C. hominis*, a primeira é relatada com maior frequência em populações de áreas rurais por efeito de bovinos jovens serem os principais hospedeiros desta espécie, já *C. hominis* é mais frequente no ambiente urbano devido ao contato próximo entre humanos (LEARMONTH et al., 2004).

No Brasil, os poucos estudos que relatam a infecção por *Cryptosporidium* spp. em humanos são restritos às crianças e imunossuprimidos. Rolando et al. (2012) realizaram um estudo com 1.197 amostras de fezes de crianças coletadas durante dez anos em uma creche e dois hospitais do Rio de Janeiro. Os autores relataram positividade em 3,17% (38/1197) das amostras por meio de microscopia e coloração de Kinyon modificada e todas as amostras foram confirmadas por qPCR. Assis et al. (2013), em estudo envolvendo 59 pacientes HIV positivos atendidos em um hospital de referência, encontraram, por meio de microscopia e coloração de Ziehl-neelsen modificada, oocistos de *Cryptosporidium* em 10,10% (6/59) dos pacientes, mas só realizaram a confirmação por PCR em dois casos.

Entretanto, a grande parte dos estudos brasileiros utilizaram como método de triagem para *Cryptosporidium* a microscopia óptica aliada aos métodos de coloração diferencial, considerada de baixa sensibilidade quando comparada às técnicas moleculares. A utilização de ferramentas moleculares pode levar ao melhor conhecimento da ocorrência deste protozoário mesmo quando os oocistos estão em baixo número nas amostras biológicas (ELSAFI et al., 2013).

Os dados disponíveis sobre a distribuição de espécies de *Cryptosporidium* em humanos no Brasil demonstram que nas populações estudadas (HIV positivos e crianças) o *C. hominis* é mais frequente frente ao *C. parvum*. Em estudos que abrangem a caracterização molecular de amostras de fezes positivas para *Cryptosporidium* spp., a espécie *C. hominis* é encontrada em frequências de 40% a 90% em pacientes HIV positivos e 57,1% a 73,6% em crianças; já para *C. parvum* as frequências variam de 10% a 20% em HIV positivos e 10,5% a 42,9% em crianças (BUSHEN et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008;

LUCCA et al., 2009; ROLANDO et al., 2012). Os dados publicados de caracterização molecular em amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. em humanos do Brasil estão sumarizados no Quadro 1.

**Quadro 1.** Frequência de *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum* e outras espécies de *Cryptosporidium* em amostras humanas positivas para *Cryptosporidium* spp. no Brasil.

Referência	População Estudada	<i>Cryptosporidium hominis</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Outras espécies	Nº de amostras
(BUSHEN et al., 2007)	Crianças	57,1%	42,9%	-	42
(ARAÚJO et al., 2008)	HIV Positivos	40,0%	20,0%	40,0% <sup>a</sup>	5
	Crianças	66,6%	33,4%	-	9
(LUCCA et al., 2009)	HIV Positivos	63,0%	14,8	22,2% <sup>b</sup>	27
(ROLANDO et al., 2012)	HIV Positivos	90,0%	10,0%	-	10
	Crianças	73,6%	10,6%	15,8% <sup>c</sup>	38

Fonte: Elaborado pelo autor.

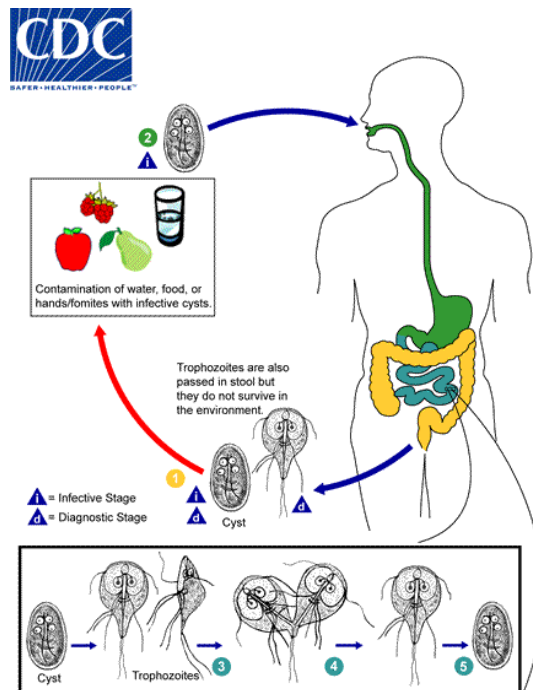
<sup>a</sup>*Cryptosporidium meleagridis*, <sup>b</sup>*Cryptosporidium felis* (18,5%) e *Cryptosporidium canis* (3,7%), <sup>c</sup>Não diagnosticado

A ocorrência de *C. felis*, *C. canis* e *C. meleagridis* em amostras fecais de pacientes HIV positivos já foi relatada no Brasil, demonstrando que além de *C. parvum* outras espécies de transmissão zoonótica estão presentes (LUCCA et al., 2009).

## 2.2 GIARDIA SPP.

*Giardia* spp é um protozoário que necessita de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo, o qual culmina na produção e eliminação de cistos nas fezes de seus hospedeiros, formas ambientais responsáveis por novas infecções. A transmissão ocorre por via fecal-oral de forma direta ou indireta, e nesta, a veiculação hídrica e o consumo de hortaliças contaminadas são as mais relatadas (THOMPSON, 2004) O ciclo biológico de *Giardia* spp. está contido na Figura 3.

**Figura 3.** Ciclo biológico de *Giardia* spp



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2016).

A taxonomia de *Giardia* está em constante estudo afim de melhor alocar este gênero dentro dos eucariotos. Sua estrutura celular e metabólica difere de eucariotos comuns, ha ausência de peroxissomos, diferenças no complexo de Golgi e ausência de mitocôndria (MARTI et al., 2003). Atualmente o gênero *Giardia* está inserido no reino Excavata, filo Metamonada, subfilo Trichosoa, superclasse Eopharyngea, classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa, ordem Diplomonadida e família Giardiidae (ADL et al., 2012).

Seis espécies de *Giardia* são descritas: *G. duodenalis*, *G. muris*, *G. microti*, *G. ardeae*, *G. psittaci* e *G. agilis*; e três delas, *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. microti*, são infectantes para os mamíferos. Apenas *G. duodenalis* é capaz de infectar uma ampla gama de mamíferos, incluindo os humanos, os animais de produção e os de companhia, o que a configura como a única espécie de interesse na saúde pública (READ; MONIS; THOMPSON, 2004). A associação entre cultura *in vitro* e análises moleculares mostrou diferenças entre os isolados da espécie *G. duodenalis*, que passaram a ser enquadrados em agrupamentos ou *assemblages* (A, B, C, D, E, F, G e H), nos quais há pequenas variações morfológicas e o agrupamento se baseia em análises de proteínas e polimorfismos no DNA (CACCIÒ et al., 2005; XIAO; FAYER, 2008; RYAN; CACCIÒ, 2013).

Somente os *assemblages* A e B compartilham hospedeiros humanos e animais e, portanto, são considerados com potencial zoonótico. Análises de variabilidade genética do *assemblage* A mostraram que é dividido em quatro *sub-assemblages*: AI, AII, AIII e AIV. Quando avaliada a distribuição nos hospedeiros, descobriu-se que isolados humanos pertencem aos *sub-assemblages* AI e AII, enquanto que isolados de outros mamíferos pertencem aos *sub-assemblages* AI, AIII e AIV (THOMPSON, 2004, RYAN; CACCIÒ, 2013). O *assemblage* B é sub-dividido em BI, BII, BIII e BIV; os isolados humanos pertencem aos *sub-assemblages* BIII e BIV, e os isolados de outros mamíferos (primatas não humanos e cães) pertencem aos *sub-assemblages* BI e BII (FENG; XIAO, 2011; RYAN; CACCIÒ, 2013).

Estudos buscam caracterizar a transmissão zoonótica e confirmar os principais hospedeiros de interesse na saúde pública (THOMPSON, 2013). Trabalhos realizados com amostras de cães relatam a ocorrência de *assemblages* A e B, porém as *assemblages* mais frequente encontradas são a C e D (SOMMER et al., 2015). Há hipóteses de que a ocorrência de *assemblages* A e B em cães seja devido à alta ocorrência de contaminação ambiental por humanos, desencadeando a transmissão do homem ao animal (zooantroponótica) (THOMPSON; ASH, 2016).

A giardíase nos estágios iniciais de vida é conhecida por causar má nutrição e retardo de crescimento (BERKMAN et al., 2002). No Brasil, estudos que relatam a ocorrência da infecção por *G. duodenalis* em crianças são vastos. Mascarini e Donalísio em 2006 relataram prevalências entre 21,4% e 23,7%, em crianças institucionalizadas em creches da cidade de Botucatu, São Paulo. Lopes et al., em 2006 relataram prevalência de 14,4% em escolares de uma cidade próxima à Londrina, e o principal fator associado a parasitoses foi banhar-se em rios lagos ou córregos. Estes estudos demonstram a característica endêmica desta protozoose em crianças brasileiras.

O uso de métodos multilocus na caracterização de *Giardia* revelaram discordância entre os loci utilizados na discriminação de *assemblages*, acredita-se que possa ocorrer viés na PCR por amplificação preferencial quando há mistura de *assemblages*. Estas evidências sugerem que a infecção pode ocorrer com um complexo de cepas de diferentes *assemblages* (ALMEIDA; POZIO; CACCIÒ, 2010; BONHOMME et al., 2011). Em ambientes com alta taxa de transmissão, há maior discordância das *assemblages* em diferentes marcadores, geralmente atribuídas à presença de misturas de espécies (BECK et al., 2012).

A epidemiologia molecular para *Giardia* em humanos é pouco explorada no Brasil e há uma carência de dados concretos sobre *assemblages* e sub-*assemblages* (COLLI et al., 2015; DAVID et al., 2015). No estado de São Paulo, David et al. (2015) estudaram a epidemiologia molecular de *Giardia* em uma população assintomática de baixa renda e encontraram *G. duodenalis* em 15% dos humanos e em 12,2% dos cães. Quando caracterizaram estes isolados, relataram *assemblages* A e B em humanos e A, C e D em cães, devido à alta presença de *Giarda* e a variabilidade observada, os autores concluíram que esta população estava exposta às múltiplas fontes de infecção e vias de transmissão.

Portanto, visto as características dos estudos realizados no Brasil é necessário a abordagem mais abrangente da epidemiologia molecular destes protozoários, para melhor compreender criptosporidiose e giardíase na população brasileira e revelar o real impacto destas doenças.

### 2.3 VEICULAÇÃO HÍDRICA DE *CRYPTOSPORIDIUM* E *GIARDIA* E SURTOS RELACIONADOS

Estes protozoários encontram-se frequentemente envolvidos em surtos (CALDERON; CRAUN, 2006). Dentre os surtos, destaca-se a importância da veiculação hídrica, já que estes protozoários são eliminados em grandes quantidades por seus hospedeiros, e são resistentes às condições ambientais e aos processos comumente utilizados no tratamento de água (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007).

Surtos de veiculação hídrica de protozoários são relatados mundialmente. Entre 1946 e 2010 foram relatados 524 surtos de veiculação hídrica por protozoários, destes 54,3% foram causados por *Cryptosporidium* e 38,5% por *Giardia* (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007; BALDURSSON; KARANIS, 2011). No Brasil, as notificações de surtos de veiculação hídrica devido aos protozoários apontam como agente etiológico *Toxoplasma gondii* e *Cyclospora cayetanensis*, ambos ocorridos no estado do Paraná (DIAS; FREIRE, 2005; DE MOURA et al., 2006; FRANCO, 2007). Mesmo com subnotificação de casos no Brasil, um surto de *Cryptosporidium* foi relatado em uma creche em São Paulo, porém sem a identificação dos protozoários em água de consumo (GONÇALVES et al., 2006).

Em surtos de criptosporidiose e giardíase por veiculação hídrica um dos principais fatores de risco apontados é a contaminação dos mananciais por esgoto não tratado. O esgoto tratado também pode contaminar os mananciais visto que esses protozoários são resistentes aos processos de tratamento comumente utilizados e, mesmo que

a taxa de remoção de matéria orgânica atinja 99%, ainda não há a eliminação total dos protozoários (ROBERTSON et al., 2000; NYGÅRD et al., 2006).

Também são relatadas outras formas de contaminação dos recursos hídricos como o desague de fezes de animais devido ao carreamento por água da chuva (APPELBEE et al., 2003; SMITH et al., 2007). A importância desta forma de contaminação varia de acordo com as características das bacias hidrográficas e depende do tipo de exploração presente a montante da captação (JIANG; ALDERISIO; XIAO, 2005). A contaminação de poços rasos por dispersão destes protozoários (GAUT et al., 2008) e a contaminação de reservatórios públicos ou domésticos representam um perigo para a população, pois não há barreiras entre os reservatórios e o consumidor e, geralmente, um reservatório atende uma parcela grande da população (PULESTON et al., 2014).

Devido ao potencial para causar surtos de grandes proporções, de sobreviverem ao tratamento convencional da água e esgoto e de serem resistentes no meio ambiente (FAYER, 2004), esses dois protozoários zoonóticos são estudados no Brasil quanto a presença em mananciais de abastecimento e em água para consumo humano. Franco, Rocha-eberhardt e Cantusio Neto (2001) relataram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em águas do Rio Atibaia, em Campinas/SP. Também em Campinas/SP, Franco e Cantusio Neto (2002) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água mineral engarrafadas e comercializadas. No município de Maringá/PR, ambos protozoários foram identificados em amostras de água não tratada captada pela estação de tratamento local e em amostras de água de abastecimento de um território indígena (NISHI et al., 2009a, 2009b). Já na cidade de Londrina/PR, Almeida et al. (2015) em estudo realizado em uma estação de tratamento de água, encontraram a presença de *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis* em 2/24 amostras de água de captação.

Esses estudos demonstram a extensa disseminação desses parasitas em ambientes variados no Brasil, essa ocorrência evidencia que possam ocorrer surtos de veiculação hídrica por estes protozoários (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012). É necessário avaliar o potencial infectante destes protozoários encontrados em amostras ambientais através da avaliação da viabilidade para conhecer o real risco que estes representam à saúde pública.

#### 2.4 GIARDIA E CRYPTOSPORIDIUM EM ESGOTOS DOMÉSTICO

Estudos relatam frequentemente a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* tanto em esgoto bruto quanto tratado. O interesse pela presença destes protozoários começou a ser relatada a partir da emergência de *Cryptosporidium* durante a década de 80 (FAYER, 2004). O surto ocorrido na cidade de Milwaukee nos Estados Unidos em 1993 evidenciou a capacidade de *Cryptosporidium* causar surtos extensos, e assim elevou o interesse na pesquisa deste protozoário em amostras ambientais (MAC KENZIE et al., 1994).

A característica emergente da *Giardia* e a presença de estágios resistentes em seu ciclo, fez com que este protozoário também passasse a ser pesquisado em água e esgoto (JAKUBOWSKI et al., 1991). Mesmo havendo diferenças expressivas na taxonomia de *Cryptosporidium* e *Giardia*, os estudos de ocorrência tendem a estudá-los juntos, a forma de transmissão e características semelhantes dos estágios ambientais estão entre as razões.

A resistência destes protozoários aos métodos de tratamento empregados no esgoto é outro fator que desencadeou a pesquisa da presença destes protozoários (ROBERTSON et al., 2000). Para se obter altas taxas de remoção destes protozoários, técnicas caras e avançadas devem ser utilizadas. Métodos alternativos e com menor custo são extensivamente testados (CANTUSIO NETO; SANTOS; FRANCO, 2006; LIM; WAN HAFIZ; NISSAPATOM, 2007; FU et al., 2010) e no Brasil, estes protozoários já foram identificados em esgoto tratado mesmo quando empregada a desinfecção por luz ultravioleta (SANTOS et al., 2011).

A eficiência de remoção de *Cryptosporidium* e *Giardia* no tratamento de esgoto, considerando 1 log a remoção de 99% dos protozoários, em tratamentos primários alcançaram valores de 0,12 log para *Cryptosporidium* e 0,18 log para *Giardia*. Nos tratamentos secundários, os processos oxidativos alcançaram valores de 2,17 log para *Cryptosporidium* e 2,60 log para *Giardia*, os anaeróbios 1,79 log e 2,04 log e lodos ativados de 1,52 log e 1,68 log. Em processos terciários, a ultrafiltração alcançou valores de 1,84 log e 2,40 log e a floculação seguida de filtração 1,69 log e 1,62 log. A escolha de qual combinação utilizar representa um grande desafio aos gestores, já que qualidade do efluente de cada processo influencia o subsequente (FU et al., 2010).

A dispersão destes protozoário após o desague de esgoto tratado em rios ou lagos eleva o risco do uso destes para: captação, recreação, dessedentação animal e irrigação (YANG et al., 2008). O maior surto de *Cryptosporidium* relatado no mundo, ocorrido em Milwaukee 1993, foi apontado como causa o mal funcionamento da estação de tratamento de

água aliado à contaminação de mananciais com *C. hominis*, provenientes da contaminação por esgoto (MAC KENZIE et al., 1994; CRAUN et al., 2010).

A caracterização molecular e a enumeração destes protozoários em esgoto bruto podem ser utilizadas como ferramenta na identificação de surtos, na identificação de espécies presentes em certas regiões, na identificação de sazonalidade da infecção e ainda como monitoramento da entrada de novas espécies e/ou genótipos em uma região (FENG et al., 2009; WIDERSTRÖM et al., 2014).

Estas protozooses são consideradas negligenciadas, portanto, em muitos países não são de notificação obrigatória e seu diagnóstico é realizado de forma tardia (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006). Em casos de emergência em saúde pública a rapidez no diagnóstico é de suma importância para se estipular medidas que limitem o seu avanço. Nesse sentido, o monitoramento em esgoto pode representar uma boa ferramenta na caracterização de emergências ocasionadas por essas protozooses (NYGÅRD et al., 2006). Na Suécia, foi possível identificar a dinâmica na quantidade de oocistos no esgoto bruto durante um surto de *C. hominis*, a quantidade antes da ocorrência do surto era menor que 200 oocistos/10L, durante o período de aumento dos casos foi de 1.800 oocistos/10L e após treze dias, no pico de aparecimento dos casos, foi de 270.000 oocistos/10L (WIDERSTRÖM et al., 2014). O constante monitoramento propicia a estipulação de valores padrões de endemicidade e, caso ocorra um aumento anormal destes valores, verifica-se a ocorrência de um surto ainda não notificado (ZHOU et al., 2003).

A identificação de espécies no esgoto elucida a ocorrência destes protozoários sem a necessidade de busca ativa em hospedeiros (BERTRAND; SCHWARTZBROD, 2007). Um estudo desenvolvido na China, com o objetivo de verificar a distribuição de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em quatro grandes cidades, descreveu alta ocorrência de *C. hominis* em duas cidades e *Giardia assemblage* AII nas quatro cidades, sugerindo que o ciclo antroponótico ocorre em maior frequência. Espécies zoonóticas como *C. meleagridis*, conhecida por parasitar aves e humanos, e *C. cuniculus*, conhecida por parasitar coelhos e humanos, também foram encontradas porém em baixa frequência (LI et al., 2012).

No Brasil, os estudos apontam apenas para a presença de oocistos e cistos sem a caracterização de espécies e genótipos. Em São Paulo/SP, foram relatados oocistos de *Cryptosporidium* spp em todas as amostras de esgoto bruto coletadas no período de seis meses, e com concentrações entre 80 e 912 oocistos/L (FARIAS; GAMBÁ; PELLIZARI, 2002). Santos et al. (2011) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* em 6,4% das amostras

de esgoto bruto e cistos de *Giardia* frequentemente durante dois anos. Com a vasta extensão territorial brasileira, a caracterização molecular em amostras de esgoto bruto pode auxiliar no estudo da distribuição destes protozoários.

A ausência de estudos de epidemiologia molecular sobre estes parasitas em humanos no Brasil aliada à importância em saúde pública, apontam para a necessidade de estudos que abordem a epidemiologia molecular destas protozooses. A grande disseminação destes protozoários em diferentes ambientes aquáticos e a importância como agentes etiológicos em surtos de veiculação hídrica revelam a possibilidade da ocorrência de surtos destas doenças no Brasil. A resistência aos métodos rotineiramente utilizados no tratamento de esgoto e a conhecida ocorrência em esgoto bruto e tratado no Brasil demonstram a ocorrência destes protozoários e eleva a preocupação do uso de corpos receptores de esgoto tratado. A caracterização molecular destes protozoários em amostras de esgoto bruto pode revelar as espécies e *assemblages* presentes na população atendida e auxiliar na caracterização da epidemiologia destas protozooses, já o conhecimento de espécies e *assemblages* no esgoto tratado revela o real risco a saúde pública do uso de corpos receptores de esgoto tratado.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Monitorar a ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em esgoto bruto e tratado de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) em Londrina, Paraná.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Detectar *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de esgoto bruto e tratado de uma estação de tratamento de esgoto de Londrina por meio de extração de DNA e PCR.
- b) Identificar por meio de PCR-RFLP as espécies de *Cryptosporidium* presentes nas amostras de esgoto positivas.

#### 4 ARTIGO

### **Monitoramento de *Giardia* e *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado em uma Estação de Tratamento de Esgoto em Londrina/PR, Brasil.<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo redigido sob normas do periódico *Applied and Environmental Microbiology*. Instruções aos autores em: [http://aem.asm.org/site/misc/journal-ita\\_org.xhtml#link00](http://aem.asm.org/site/misc/journal-ita_org.xhtml#link00)

**Monitoramento de *Giardia* e *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado em uma Estação de Tratamento de Esgoto em Londrina/PR, Brasil**

**Surveillance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Raw and Treated Sewage in a Wastewater Treatment Plant in Londrina/PR, Brazil.**

Felippe Danyel Cardoso Martins\*

**RESUMO**

*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são protozoários causadores de diarreia e conhecidos por causarem surtos veiculação hídrica. A caracterização molecular destes protozoários em esgoto revela dados a respeito da epidemiologia e do potencial de contaminação dos recursos hídricos. A caracterização molecular destes protozoários em esgoto pode prover dados ainda desconhecidos da ocorrência de espécies no Brasil. O objetivo do presente estudo foi monitorar a ocorrência de *Giardia* e espécies de *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado em uma estação de tratamento de esgoto (ETE) de Londrina, Paraná. As amostras de esgoto bruto e tratado foram coletadas no período de um ano, com periodicidade quinzenal e foram concentradas por centrifugação e filtração, respectivamente. Foram coletadas durante o período de estudo vinte e cinco amostras de esgoto bruto e vinte e cinco de tratado. A ocorrência destes protozoários foi caracterizada por meio de extração de DNA seguida de nested-PCR, foram utilizados o gene 18S rRNA de *Giardia* e 18S rRNA de *Cryptosporidium*. A caracterização das espécies de *Cryptosporidium* foi realizada por meio de análise por polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP) dos produtos obtidos. Para *Giardia*, todas as amostras de esgoto bruto e 76% das de esgoto tratado foram positivas. *Cryptosporidium* esteve presente em 84% das amostras de esgoto bruto e em 8% do tratado. No esgoto tratado foi encontrado apenas *C. muris*, já nas amostras de esgoto bruto foram encontradas cinco espécies: *C. muris*, *C. hominis*, *C. baileyi*, *C. suis* e *C. parvum* em 100%, 19,04%, 9,52%, 9,52% e 4,76%, respectivamente. A presença de espécies mistas foi observada em 19,04% das amostras. Este estudo descreve a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em esgoto bruto e tratado em uma ETE em Londrina/PR, Brasil, demonstra a ocorrência de *C. muris* em esgoto tratado e *C. muris*, *C. hominis*, *C. baileyi*, *C. suis* e *C. parvum* em esgoto bruto. Demonstra que a ocorrência de *C. hominis* prevalece sobre *C. parvum* nas amostras de esgoto bruto. Enfatiza o problema do uso de corpos hídricos que recebem efluente de ETE e aponta à necessidade da caracterização de espécies de *Cryptosporidium* em humanos do Brasil para avaliar o papel de espécies como *C. suis* e *C. muris* na criptosporidiose humana.

**Palavras-chave:** Doenças Negligenciadas. Diarreia. Contaminação Ambiental. PCR-RFLP.

---

\* Mestrando em Ciência Animal - Universidade Estadual de Londrina. Email: fmartins@uel.br

## ABSTRACT

*Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. are protozoans that causes diarrhea, are known as causes of waterborne outbreaks. The molecular characterization of these protozoans in sewage reveals data about the epidemiology and the potential contamination of water resources. Molecular characterization of these protozoa in sewage might provide unknown data concerning the species occurrence in Brazil. The aim of this study was to perform a surveillance in the occurrence of *Giardia* and species of *Cryptosporidium* in raw and treated sewage in a wastewater treatment plant (WWTP) in Londrina, Paraná. Samples of raw and treated sewage were collected within a year, bimonthly, and concentrated by means of centrifugation and filtration respectively. The occurrence of these protozoans was achieved based in DNA extraction followed by nested PCR, targeting the *Giardia* 18S rRNA and *Cryptosporidium* 18S rRNA. The species characterization in positive *Cryptosporidium* samples were performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). We collected twenty-five samples of both, raw and treated sewage. For *Giardia*, all raw sewage samples and 76,00% of treated sewage were positive. *Cryptosporidium* was positive in 84,00% of raw and 8,00% of treated sewage. *C. muris* was the only species found in treated sewage, in raw sewage we found five species: *C. muris*, *C. hominis*, *C. baileyi*, *C. parvum* and *C. suis* in 100%, 19.04%, 9,52%, 9.52% and 4.76%, respectively. Multiple species were observed in 19.04%. This study describes the presence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp in raw and treated sewage in a WWTP in Londrina/PR, Brazil, demonstrates the occurrence of *C. muris* in treated sewage and *C. muris*, *C. hominis*, *C. baileyi*, *C. suis* and *C. parvum* in raw sewage. The occurrence of *C. hominis* prevailed over *C. parvum* in raw sewage samples. The results emphasize the problem of the use of water bodies that receive effluent from WWTP and indicates the need for characterization of *Cryptosporidium* species in humans of Brazil in order to evaluate the role of species such as *C. suis* and *C. muris* in human cryptosporidiosis.

**Key words:** Neglected Diseases. Diarrhea. Environmental Pollution. PCR-RFLP.

## Introdução

*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são protozoários causadores de doença diarreica, com transmissão zoonótica ou antroponótica, de caráter oportunista ou não, integram a lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial de Saúde e são descritos como os principais causadores de surtos de protozooses de veiculação hídrica no mundo (1–4).

No Brasil, estes parasitas foram identificados em diversos ambientes como: água bruta, água de fontes naturais, água engarrafada, esgoto bruto e tratado, lodo de esgoto e hortaliças (5–10). Devido ao caráter negligente, as dificuldades técnicas e o alto custo, faltam dados moleculares sobre a distribuição de espécies, genótipos e *assemblages* encontrados para melhor avaliar a disseminação, a dinâmica de transmissão e o risco à saúde pública (11).

A caracterização molecular de amostras clínicas de diferentes hospedeiros é de suma importância no estudo da epidemiologia destas protozooses, pois o conhecimento de espécies e *assemblages* revela dados sobre a biologia e taxonomia, essenciais para estipular medidas de prevenção no entanto, grande parte dos estudos que utilizaram a caracterização molecular destes protozoários no Brasil foram realizados em animais (12–17).

Considerando *Cryptosporidium*, em amostras de fezes humanas obtidas de crianças e imunossuprimidos, demonstrou-se que *C. hominis* é mais frequente frente ao *C. parvum* (18). Há ainda relato da ocorrência de infecção por *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis* em imunossuprimidos, porém em baixa frequência (19). Os estudos abrangendo a caracterização molecular de *Giardia* em humanos no Brasil focam na comprovação da ocorrência de ciclo zoonótico, as *sub-assemblages* de *Giardia duodenalis* frequentemente detectadas são AI, AII e BIV (17, 20).

Em amostras ambientais, a detecção de *assemblages* de *Giardia* e espécies de *Cryptosporidium* em amostras de esgoto bruto tem sido utilizada para o monitoramento da ocorrência destes protozoários e, para a caracterização da forma de transmissão por meio da epidemiologia molecular. Visto a carência de dados sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* e *assemblages* de *Giardia* em humanos no Brasil, a caracterização molecular destes protozoário em esgoto bruto pode prover dados ainda desconhecidos (21–24).

O objetivo deste estudo foi monitorar a ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* e caracterizar as espécies de *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado em uma estação de tratamento de esgoto (ETE).

## **Material e métodos**

### *Descrição da área de estudo*

O estudo foi desenvolvido no município de Londrina (23° 18' 36" S 51° 09' 46" O) que se localiza na região norte do Paraná. É o segundo maior município do estado e o quarto do

sul do Brasil. Possui 548.249 mil habitantes, a região metropolitana contempla mais de 1 milhão de pessoas e apresenta IDH de 0,778. Há ocorrência de chuvas ao longo de todo ano e a pluviosidade anual média é de 1429 mm (25).

#### *Características da Estação de Tratamento de Esgoto*

A estação de tratamento de esgoto investigada (ETE-Sul), é responsável pelo tratamento das águas servidas em uma área com aproximadamente 245.000 habitantes. A ETE-Sul recebe em média  $3,4 \times 10^3$  m<sup>3</sup>/dia e realiza tratamento preliminar, primário e secundário, compostos por: gradeamento, desarenador, decantador primário, reator anaeróbio de fluxo ascendente, filtro percolado submerso e decantador secundário. O efluente desagua no ribeirão Cambezinho, considerado classe II de acordo com a portaria 357/05 do Conselho Nacional do Meio ambiente (CONAMA) que classifica os rios de acordo com a qualidade da água.

#### *Coleta das amostras*

A coleta foi realizada quinzenalmente entre dezembro de 2014 e novembro de 2015. Foram coletados 1 L de esgoto bruto, após o desarenador, e 2 L de esgoto tratado, antes do deságue no ribeirão Cambezinho. No total foram coletadas 25 amostras de esgoto bruto e 25 de esgoto tratado. As amostras foram acondicionadas em bombonas plásticas, higienizadas e enxaguadas com Tween<sup>®</sup> 80 0,1% e transportadas em caixa isotérmica ao Laboratório de Protozoologia da Universidade Estadual de Londrina para o processamento em até 24 horas.

#### *Concentração das amostras*

Do total coletado foram concentrados 500 mL de esgoto bruto por meio de centrifugação (5). As amostras foram distribuídas em tubos de 50 mL contendo 5 mL de Tween<sup>®</sup> 80 1% (v/v), homogeneizadas e submetidas à centrifugação a 1500 x g por 15 minutos em rotor do tipo *swing* sem freio; o sobrenadante foi retirado com pipetas estéreis

descartáveis e o sedimento ressuspenso em Tween® 80 0,1% (v/v), acondicionado em um tubo de 50 mL e submetido a nova centrifugação como descrito anteriormente. Novamente o sedimento foi ressuspenso em Tween® 80 0,1% (2-4 mL) e armazenado a 4°C com 50 ng de gentamicina e estreptomicina, e 0,02U de penicilina por mL de concentrado, até momento da extração do DNA.

Para o esgoto tratado, as amostras de 1,2L foram concentradas por filtração e centrifugação (5). As amostras foram filtradas em membranas de éster de celulose 1,2 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro em suporte de filtração tipo *manifold*; as membranas foram eluídas em Tween® 80 0,1% (v/v) por meio de raspagem e o eluído centrifugado a 1500 x g por 15 minutos; o sedimento foi ressuspenso em Tween® 80 0,1% (v/v) e novamente centrifugado; o sedimento final foi ressuspenso em Tween® 80 0,1% (1-2mL) e armazenado a 4°C com 50 ng de gentamicina, estreptomicina e 0,02U de penicilina por mL de concentrado até a realização da extração de DNA.

#### *Extração de DNA*

Das amostras concentradas, foram utilizados 200 µL para a extração de DNA por meio de Kit comercial NucleoSpin Tissue® (Macherey-Nagel) seguindo o protocolo do fabricante, com o incremento de três ciclos de gelo/degelo antes da etapa de lise, a fim de proporcionar a ruptura dos (oo)cistos (26).

#### *Reação em cadeia da polimerase para detecção de DNA de Cryptosporidium e Giardia*

Para a detecção de *Cryptosporidium* spp. foi realizado a *nested*-PCR em triplicata para a amplificação de um fragmento de 823 a 840 pares de bases do gene 18S rRNA (27), constituída de: 1X PCR Buffer Invitrogen®; 200 µM de dNTPs; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 400 nM de cada oligonucleotídeo; 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polimerase; 200 nM BSA; 2,0 µL do DNA extraído e água ultra pura para compor o volume final de 25 µL. O produto da

primeira reação foi diluído em 50µL de água ultrapura para dar sequência à segunda reação. As condições de amplificação para ambas as reações foram: 5min a 95°C; seguidos por 35 ciclos de 45s a 94°C; 45s a 55°C; 60s a 72°C e 5min a 72°C.

Para detecção de *Giardia* spp. foi realizada a *nested*-PCR em triplicata para a amplificação de um fragmento do gene 18S rRNA (28, 29), constituída de: 1X PCR Buffer Invitrogen®; 200 µM de cada dNTPs; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 nM de cada oligonucleotídeo; 5% de DMSO (dimetilsulfóxido); 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polimerase; 1,5 µL de DNA e água ultra pura para compor um volume de 25 µL. O produto da primeira reação foi diluído em 50 µL de água ultrapura para dar sequência à segunda reação. As condições de amplificação foram: 5min a 95°C; seguidos por 35 ciclos de 45s a 94°C; 45s a 58°C na primeira reação e 55°C na segunda reação; 60s a 72°C e 5min a 72°C.

O diagnóstico foi realizado em triplicata a fim de aumentar a sensibilidade analítica do método (30). Foram utilizados controles negativos compostos por água ultrapura e controles positivos compostos por DNA de *C. parvum*. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com SYbR Safe® e fotodocumentados.

#### *Discriminação das espécies de Cryptosporidium por meio da PCR-RFLP*

Os produtos da segunda reação, quando positiva para *Cryptosporidium* spp., foram submetidos à análise por polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP) com as enzimas *SspI*, *AseI*, *DdeI* e *MboII* para a discriminação das espécies (27). As reações de digestão foram realizadas separadas e consistiam de: 1X NEB® Buffer; 5U de enzima (*SspI* e *MboII*) ou 3U (*AseI* e *DdeI*); 5 µL do produto da segunda reação de PCR e água ultrapura completando o volume de 20 µL. O tempo utilizado nas clivagens foi de uma hora a 37°C e 15 minutos a 65°C. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,5%, corados com SYbR Safe® e fotodocumentadas. Os padrões de bandas foram comparados com imagens padrão contidas no Cryptodb (<http://www.cryptodb.org>) e no caso da suspeita de

contaminação mista foram comparados aos padrões de clivagem gerados pelo NebCutter v2.1 (31) com sequências de referência importadas do GenBank.

## Resultados

Entre as amostras de esgoto bruto, todas foram positivas para *Giardia* spp. e 84% (21/25) para *Cryptosporidium* spp. No esgoto tratado a ocorrência dos protozoários foi menor: 76,00% (19/25) das amostras foram positivas para *Giardia* spp. e 8,00% (2/25) para *Cryptosporidium* spp. *Giardia* foi mais frequente frente a *Cryptosporidium* durante o período estudado.

Considerando as réplicas das amostras de esgoto bruto, para *Giardia* 88% (22/25) das amostras apresentaram sucesso na amplificação em todas as réplicas e em 12% (3/25) a amplificação ocorreu em duas. Para *Cryptosporidium*, 19,04% (4/21) das amostras apresentaram amplificação em todas as réplicas; 38,09% (8/21) em duas e 42,85% (9/21) em uma. No esgoto tratado, para *Giardia* obteve-se três réplicas positivas em 26,31% (5/19) das amostras; duas positivas em 31,57% (6/19) das amostras e uma positiva em 42,10% (8/19) das amostras. Para *Cryptosporidium* nas duas amostras positivas apenas uma réplica foi positiva.

A identificação das espécies de *Cryptosporidium* foi alcançada por meio da PCR-RFLP em todas as amostras positivas de esgoto bruto e tratado. Cinco espécies foram encontradas em esgoto bruto: *C. muris*, *C. hominis*, *C. baileyi*, *C. suis* e *C. parvum*. Foi observada alta frequência de *C. muris* nas amostras, já que todas as positivas para *Cryptosporidium* continham, em alguma réplica, o padrão condizente com esta espécie. Considerando as outras espécies *C. hominis* foi encontrado em 19,04% (4/21), *C. suis* e *C. baileyi* em 9,52% (2/21) e *C. parvum* em 4,76% (1/21). Em esgoto tratado foi identificado apenas *C. muris*.

Foi observada a presença de espécies mistas em 19,04% (4/21) das amostras de esgoto bruto positivas. As misturas encontradas em réplicas foram: *C. muris/C. hominis*; *C.*

*hominis/C. parvum; C. suis/C. baileyi/C. hominis e C. suis/C. baileyi/C. hominis/C. muris*. Em todas as amostras com mistura de espécies houve diferença nas espécies encontradas entre as réplicas. Em apenas uma réplica de uma amostra o diagnóstico não foi possível devido à grande quantidade de bandas resultantes da mistura de muitas espécies. Os resultados das espécies mistas encontradas por amostra e réplicas estão sumarizados na Tabela 1.

## **Discussão**

O presente estudo demonstra a ocorrência de *Giardia* spp. e espécies de *Cryptosporidium* em amostras de esgoto bruto e tratado no município de Londrina, Sul do Brasil. Vários estudos relatam a presença destes protozoários em esgoto (24, 32–34), porém poucos caracterizaram a ocorrência de múltiplas espécies visto que os principais métodos utilizados, como a reação de imunofluorescência direta e a PCR seguida de sequenciamento, não discriminam as espécies presentes dentro de uma mesma amostra.

A presença de *Giardia* em todas amostras de esgoto bruto sugere a característica endêmica deste protozoário nesta região. A ocorrência de *Giardia* no esgoto tratado lançado em um ribeirão eleva a importância na escolha de corpos hídricos receptores de esgoto tratado e do monitoramento dos mesmos. Colli et al. (20) descreveram a presença de *Giardia* em humanos, cães e hortaliças no Brasil e, por meio da identificação genotípica dos isolados, observaram relação entre eles; a negligência no uso de fontes de água para irrigação favoreceu a manutenção do ciclo da doença na população.

O método empregado no presente estudo para a discriminação das espécies de *Cryptosporidium* foi primariamente aplicado a amostras ambientais por Xiao et al. (21) em amostras de esgoto bruto e de rios receptores de esgoto tratado nos Estados Unidos. No presente estudo, obteve-se resultados semelhantes principalmente quanto às espécies encontradas em esgoto bruto: *C. muris*, *C. parvum* e *C. hominis*. Feng et al. (22), com o uso

da PCR-RFLP em amostras de esgoto bruto na China, também relataram a presença de *C. suis* e *C. baileyi*, e em 15,87% das amostras positivas havia a presença de espécies múltiplas.

Ruecker et al. (35) avaliaram a PCR-RFLP com o objetivo de verificar a eficácia desta metodologia na discriminação de múltiplas espécies em uma mesma amostra. Os autores concluíram que a PCR-RFLP é capaz de discriminar a contaminação mista, porém em algumas amostras podem haver dificuldades devido à presença de muitas espécies, fato observado em apenas uma réplica do presente estudo. Alguns autores sugerem limitar as sequencias alvo antes da PCR-RFLP ou PCR seguida de sequenciamento a fim de elucidar as espécies mistas, porém estes métodos demandam o uso de muitas réplicas e podem resultar em padrões ainda mistos, cromatogramas com sobreposição de picos e não amplificação devido a variação aleatória (24, 30, 35).

A ocorrência de *C. muris* em todas as amostras positivas sugere a contaminação por fezes de roedores, já que são os principais hospedeiros desta espécie e estão presentes no sistema de esgoto (24, 36). Estudos na Europa e Estados Unidos também observaram *C. muris* em amostras de esgoto bruto e associaram à presença de roedores (21, 24, 37). A presença no esgoto tratado evidencia a passagem desta espécie de *Cryptosporidium* pelo tratamento e sinaliza que outras espécies podem ser lançadas no ambiente elevando o risco à saúde pública. *C. muris* é descrito com baixa frequência em humanos e em sua maioria imunossuprimidos (38) porém, experimentalmente em humanos, mostrou infectividade e causou diarreia branda resultando em quadros de infecção persistente e assintomática (36). Desta maneira, há a possibilidade da presença de *C. muris* na população da região.

*C. muris* presente em todas as amostras positivas, sugere maior abundância desta, o que pode subestimar a presença das outras espécies. A presença de mistura de espécies pode ocasionar a amplificação apenas da mais abundante (30). No entanto, encontrou-se *C. suis*, *C. hominis*, *C. parvum* e *C. baileyi*.

A ocorrência de *C. suis* pode levar a duas interpretações: (I) a presença de dejetos de origem não humana no esgoto doméstico; ex. efluentes de abatedouros e escoamento de fezes em decorrência de chuvas (II) a infecção por esta espécie ocorrer na população humana da região em estudo, no entanto isto é pouco provável. Este resultado, aliado à ocorrência de *C. muris*, suporta a necessidade de estudos aprofundados da população hígida e imunossuprimida para melhor conhecer a epidemiologia da infecção por *Cryptosporidium* spp., já que estas espécies não são frequentes em humanos (38, 39).

A espécie *C. baileyi* é reconhecida por causar doença em aves (40), sua presença no esgoto pode ser explicada pela abundância de aves sinatrópicas na região urbana da cidade em sua maioria da espécie *Zenaida auriculata*, podendo os protozoários serem carregados ao sistema de esgoto por infiltração de água da chuva com fezes destes animais.

*C. parvum* e *C. hominis* são as duas principais espécies que acometem humanos sendo a primeira relatada como zoonótica e a segunda antroponótica (2). A ocorrência de *C. hominis* nas amostras de esgoto bruto sugere a infecção em humanos na região, já a presença de *C. parvum* pode sugerir a ocorrência de ciclo zoonótico. Esta espécie já foi encontrada em água bruta na região (7), porém devido à alta gama de hospedeiros de *C. parvum* não se pode confirmar que a eliminação ocorreu por humanos, nem que a transmissão ocorreu entre animais e humanos. A maior ocorrência de *C. hominis* frente a *C. parvum* concorda com os dados epidemiológicos destes protozoários no Brasil, a infecção por *C. hominis* é mais frequente que por *C. parvum* (18).

## **Conclusão**

Este estudo descreveu a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em esgoto bruto e tratado de uma ETE em Londrina, Paraná, Brasil e demonstrou a ocorrência de *C. muris* em esgoto tratado e *C. muris*, *C. hominis*, *C. baileyi*, *C. suis* e *C. parvum* em esgoto bruto. *C. muris*, *C. suis* e *C. baileyi* sugerem a contaminação do esgoto com fezes de roedores, suínos e

aves, respectivamente, ou ainda a infecção de humanos por *C. muris* e *C. suis*. A ocorrência de *C. hominis* prevaleceu sobre *C. parvum* nas amostras de esgoto bruto. Dessa forma, enfatiza-se o problema do uso de corpos hídricos que recebem efluente de ETE e aponta a necessidade da caracterização de espécies de *Cryptosporidium* em humanos do Brasil para avaliar o papel de espécies como *C. suis* e *C. muris* na criptosporidiose humana.

## Referências

1. **Ryan U, Cacciò SM.** 2013. Zoonotic potential of Giardia. *Int J Parasitol* **43**:943–56.
2. **Ryan U, Fayer R, Xiao L.** 2014. Cryptosporidium species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* **141**:1–19.
3. **Savioli L, Smith H, Thompson A.** 2006. Giardia and Cryptosporidium join the “Neglected Diseases Initiative”. *Trends Parasitol* **22**:203–8.
4. **Baldursson S, Karanis P.** 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites : Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. *Water Res* **45**:6603–6614.
5. **Santos LU dos, Cantusio Neto R, Franco RMB, Guimarães JR.** 2011. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto ou tratado : avaliação crítica dos métodos. *Eng Sanitária Ambient* **16**:115–120.
6. **Bonatti TR, Franco RMB.** 2014. Real scale environmental monitoring of zoonotic protozoa and helminth eggs in biosolid samples in Brazil. *J Parasit Dis.* **40**: 633–642
7. **Almeida JC, Martins FDC, Ferreira Neto JM, Santos MM Dos, Garcia JL, Navarro IT, Kuroda EK, Freire RL.** 2015. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* **24**:303–308.
8. **Franco RMB, Cantusio Neto R.** 2002. Occurrence of Cryptosporidial Oocysts and Giardia Cysts in Bottled Mineral Water Commercialized in the City of Campinas, State of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**:205–207.
9. **Tiyo R, Souza Cz De, Nishi L, Brustolin Cf, Ratti Ba, Falavigna Guilherme Al.** 2015. Water from different sources used for the irrigation of vegetables to be marketed: research on *Cryptosporidium*spp., *Giardia*spp., and coliforms in Parana, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **57**:333–336.
10. **Branco N, Leal DAG, Franco RMB.** 2012. A Parasitological Survey of Natural Water Springs and Inhabitants of a Tourist City in Southeastern Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis* **12**:410–417.
11. **Franco RMB, Hachich EM, Naveira RML, Silva E de C, Campos MM de C, Cantusio Neto R, Cerqueira DA, Branco N, Leal DAG.** 2012. Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. *Epidemiol e Serviços Saúde* **21**:233–242.
12. **Meireles MV.** 2010. Cryptosporidium infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. *Rev Bras Parasitol Vet* **19**:197–204.

13. **Silva FMPE, Lopes RS, Araújo-Junior JP.** 2013. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* **22**:22–28.
14. **Couto MCM, Lima MF, Bomfim TCB.** 2014. New *Cryptosporidium parvum* subtypes of Ila subfamily in dairy calves from Brazil. *Acta Trop* **130**:117–122.
15. **Nakamura AA, Simões DC, Antunes RG, Silva DC da, Meireles MV.** 2009. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Vet Parasitol* **166**:47–51.
16. **Paz e Silva FM, Monobe MM, Lopes RS, Araujo JP.** 2012. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasitol Res* **110**:325–34.
17. **Durigan M, Abreu AG, Zucchi MI, Franco RMB, de Souza AP.** 2014. Genetic Diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus Genotyping Reveals Zoonotic Potential between Clinical and Environmental Sources in a Metropolitan Region of Brazil. *PLoS One* **9**:e115489.
18. **Rolando RF, Silva S, Peralta RH, Silva AJ, Cunha Fde S, Bello AR, Peralta JM.** 2012. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **107**:476–479.
19. **Araújo AJUDS, Kanamura HY, De Almeida ME, Gomes AHDS, Pinto THL, Da Silva AJ.** 2008. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **50**:139–143.
20. **Colli CM, Bezagio RC, Nishi L, Bignotto TS, Ferreira ÉC, Falavigna-Guilherme AL, Gomes ML.** 2015. Identical Assemblage of *Giardia duodenalis* in Humans, Animals and Vegetables in an Urban Area in Southern Brazil Indicates a Relationship among Them. *PLoS One* **10**:e0118065.
21. **Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk TK, Gradus S, Lal A.** 2001. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Oocysts in Samples of Raw Surface Water and Wastewater. *Appl Environ Microbiol* **67**:1097–1101.
22. **Feng Y, Li NN, Duan L, Xiao L.** 2009. *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. *J Clin Microbiol* **47**:153–7.
23. **Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Törökné A, Márialigeti K.** 2008. Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. *Int J Hyg Environ Health* **211**:524–533.
24. **Spanakos G, Biba A, Mavridou A, Karanis P.** 2015. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recycled waters used for irrigation and first description of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in Greece. *Parasitol Res* **114**:1803–1810.
25. **IBGE.** 15 jun. 2015, acessado. Cidades, Londrina/PR. <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=411370search=parana>
26. **Wells B, Shaw H, Hotchkiss E, Gilray J, Ayton R, Green J, Katzer F, Wells A, Innes E.** 2015. Prevalence, species identification and genotyping *Cryptosporidium* from livestock and deer in a catchment in the Cairngorms with a history of a contaminated public water supply. *Parasit Vectors* **8**:66.

27. **Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RC, Fayer R, Lal AA.** 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* **65**:3386–91.
28. **Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC.** 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* **83**:44–51.
29. **Appelbee AJ, Frederick LM, Heitman TL, Olson ME.** 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Vet Parasitol* **112**:289–294.
30. **Ruecker NJ, Hoffman RM, Chalmers RM, Neumann NF.** 2011. Detection and resolution of *Cryptosporidium* species and species mixtures by genus-specific nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, direct sequencing, and cloning. *Appl Environ Microbiol* **77**:3998–4007.
31. **Vincze T, Posfai J, Roberts RJ.** 2003. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **31**:3688–91.
32. **Robertson L, Paton C, Campbell A, Smith PG, Jackson MH, Gilmour RA, Black SE, Stevenson DA, Smith H V.** 2000. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Water Res* **34**:2310–2322.
33. **Montemayor M, Valero F, Jofre J, Lucena F.** 2005. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. *J Appl Microbiol* **99**:1455–1462.
34. **Li N, Xiao L, Wang L, Zhao S, Zhao X, Duan L, Guo M, Liu L, Feng Y.** 2012. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* by genotyping and subtyping parasites in wastewater. *PLoS Negl Trop Dis* **6**:e1809.
35. **Ruecker NJ, Bounsombath N, Wallis P, Ong CSL, Isaac-Renton JL, Neumann NF.** 2005. Molecular forensic profiling of *Cryptosporidium* species and genotypes in raw water. *Appl Environ Microbiol* **71**:8991–4.
36. **Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry RC, Lupo PJ, Widmer G, Tzipori S.** 2015. *Cryptosporidium muris*: infectivity and illness in healthy adult volunteers. *Am J Trop Med Hyg* **92**:50–55.
37. **Khouja LBA, Cama V, Xiao L.** 2010. Parasitic contamination in wastewater and sludge samples in Tunisia using three different detection techniques. *Parasitol Res* **107**:109–116.
38. **Cama V a., Bern C, Sulaiman IM, Gilman RH, Ticona E, Vivar A, Kawai V, Vargas D, Zhou L, Xiao L.** 2003. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *J Eukaryot Microbiol* **50 Suppl**:531–3.
39. **Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedraza-Díaz S, McLauchlin J.** 2006. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J Med Microbiol* **55**:703–707.
40. **Nakamura AA, Meireles MV.** 2015. *Cryptosporidium* infections in birds - a review. *Rev Bras Parasitol Vet* **24**:253–267.

Tabela 2. Amostras de esgoto bruto (EB) com presença de espécies mistas para *Cryptosporidium* identificadas por PCR-RFLP, coletadas quinzenalmente entre dezembro de 2014 e novembro de 2015 em uma estação de tratamento de esgoto, em Londrina, Paraná, Brasil.

Amostras Positivas para <i>Cryptosporidium</i>	Nº Réplicas Positivas	Espécies encontradas	Espécies encontradas por réplica
EB6	3	<i>C. muris</i> e <i>C. hominis</i>	<i>C. muris</i>
			<i>C. muris</i> e <i>C. hominis</i>
			<i>C. muris</i> e <i>C. hominis</i>
EB12	2	<i>C. muris</i> , <i>C. baileyi</i> , <i>C. suis</i> e <i>C. hominis</i>	<i>C. muris</i> , <i>C. baileyi</i> , <i>C. suis</i> e <i>C. hominis</i>
			<i>C. baileyi</i> , <i>C. suis</i> e <i>C. hominis</i>
EB14	3	<i>C. muris</i> , <i>C. baileyi</i> , <i>C. suis</i> e <i>C. hominis</i>	<i>C. muris</i> e <i>C. hominis</i>
			<i>C. baileyi</i> , <i>C. suis</i> e <i>C. hominis</i>
			<i>C. baileyi</i> , <i>C. suis</i> e <i>C. hominis</i>
EB20	2	<i>C. muris</i> , <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i>	<i>C. muris</i>
			<i>C. hominis</i> e <i>C. parvum</i>

## 5. CONCLUSÃO

Há poucos estudos no Brasil que abordem a caracterização molecular destes protozoários, portanto há uma carência de dados para melhor caracterizar a epidemiologia molecular destas protozooses, e avaliar os riscos à saúde pública diante dos achados ambientais.

Há ocorrência de *Giardia* e *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado em Londrina/PR.

Foi possível a identificação de *C. muris* em esgoto tratado e cinco espécies de *Cryptosporidium* em esgoto bruto: *C. muris*, *C. suis*, *C. hominis*, *C. parvum* e *C. baileyi*, por meio da PCR-RFLP.

A identificação de *C. muris*, *C. suis* e *C. baileyi* sugere que ocorra a contaminação do esgoto com fezes de roedores, suínos e aves.

A ocorrência de *C. hominis* prevaleceu sobre *C. parvum*, nas amostras de esgoto bruto.

Há necessidade de estudos epidemiológicos com ferramentas moleculares na população Brasileira a fim de melhor entender a epidemiologia molecular de *Cryptosporidium*, e o papel de espécies como *C. muris* e *C. suis* na criptosporidiose humana.

## REFERÊNCIAS

- ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; LANE, C. E.; LUKEŠ, J.; BASS, D.; BOWSER, S. S.; BROWN, M. W.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, E.; LE GALL, L.; LYNN, D. H.; MCMANUS, H.; MITCHELL, E. A. D.; MOZLEY-STANRIDGE, S. E.; PARFREY, L. W.; PAWLOWSKI, J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, R. S.; SHADWICK, L.; SCHOCH, C. L.; SMIRNOV, A.; SPIEGEL, F. W. The revised classification of eukaryotes. **The Journal of eukaryotic microbiology**, Lawrence, v. 59, n. 5, p. 429-493, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3483872&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jan. 2016.
- ALMEIDA, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 76, n. 6, p. 1895–901, mar. 2010. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20080999](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20080999)\n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2838019/pdf/2305-09.pdf>>. Acesso em: 6 set. 2016.
- ALMEIDA, J. C.; MARTINS, F. D. C.; FERREIRA NETO, J. M.; SANTOS, M. M. Dos; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; KURODA, E. K.; FREIRE, R. L. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 303–308, set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26291147>>. Acesso em: 28 out. 2015.
- APPELBEE, A. J.; FREDERICK, L. M.; HEITMAN, T. L.; OLSON, M. E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 112, n. 4, p. 289–294, mar. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702004223>>. Acesso em: 27 jul. 2015.
- ARAÚJO, A. J. U. D. S.; KANAMURA, H. Y.; DE ALMEIDA, M. E.; GOMES, A. H. D. S.; PINTO, T. H. L.; DA SILVA, A. J. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 139–143, 2008.
- ASSIS, D. C.; RESENDE, D. V.; CABRINE-SANTOS, M.; CORREIA, D.; OLIVEIRA-SILVA, M. B. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 149–154, jun. 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652013000300149&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652013000300149&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 27 jul. 2015.
- BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. **Water research**, Oxford, v. 45, n. 20, p. 6603–6614, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>>. Acesso em: 27 jul. 2015.

BECK, R.; SPRONG, H.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Genotyping *Giardia duodenalis* isolates from dogs: lessons from a multilocus sequence typing study. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 12, n. 3, p. 206–213, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022810>>. Acesso em: 2 ago. 2015.

BERKMAN, D. S.; LESCANO, A. G.; GILMAN, R. H.; LOPEZ, S. L.; BLACK, M. M. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: A follow-up study. **Lancet**, London, v. 359, n. 9306, p. 564–571, 2002.

BERTRAND, I.; SCHWARTZBROD, J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and faecal contamination origin. **Water research**, Oxford, v. 41, n. 16, p. 3675–82, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17434561>>. Acesso em: 12 set. 2015.

BONHOMME, J.; LE GOFF, L.; LEMÉE, V.; GARGALA, G.; BALLEST, J. J.; FAVENNEC, L. Limitations of tpi and bg genes sub-genotyping for characterization of human *Giardia duodenalis* isolates. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 327–330, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.05.004>>. Acesso em: 9 set. 2015.

BUSHEN, O. Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R. C.; DUPNIK, K.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; FAYER, R.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 101, n. 4, p. 378–384, abr. 2007. Disponível em: <<http://trstmh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/j.trstmh.2006.06.005>>. Acesso em: 9 set. 2015.

CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. A.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 430–437, set. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046184>>. Acesso em: 20 out. 2015.

CALDERON, R. L.; CRAUN, G. F. Estimates of endemic waterborne risks from community-intervention studies. **Journal of Water and Health**, London, v. 4, n. Suppl 2, p. 89, jul. 2006. Disponível em: <[http://earth1.epa.gov/nheerl/articles/2006/waterborne\\_disease/endemic\\_risk.pdf](http://earth1.epa.gov/nheerl/articles/2006/waterborne_disease/endemic_risk.pdf)>. Acesso em: 21 set. 2015.

CAMA, V. A.; ROSS, J. M.; CRAWFORD, S.; KAWAI, V.; CHAVEZ-VALDEZ, R.; VARGAS, D.; VIVAR, A.; TICONA, E.; NAVINCOPA, M.; WILLIAMSON, J.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R. H.; BERN, C.; XIAO, L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 196, n. 5, p. 684–691, set. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17674309>>. Acesso em: 1 set. 2015.

CAMA, V.; GILMAN, R. H.; VIVAR, A.; TICONA, E.; ORTEGA, Y.; BERN, C.; XIAO, L. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 12, n. 6, p. 1025–8, jun. 2006.

CANTUSIO NETO, R.; SANTOS, L. U.; SANTOS, J. U.; FRANCO, R. M. B. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil.

**Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 89–94, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17037138>>. Acesso em: 23 jan. 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Cryptosporidium spp.* Disponível em: <[http://www.cdc.gov/parasites/images/crypto/cryptosporidium\\_lifecycle.gif](http://www.cdc.gov/parasites/images/crypto/cryptosporidium_lifecycle.gif)>. Acesso em: 20 jan. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Giardia spp.* Disponível em: <[http://www.cdc.gov/parasites/giardia/images/giardia\\_lifecycle.gif](http://www.cdc.gov/parasites/giardia/images/giardia_lifecycle.gif)>. Acesso em: 20 jan. 2016.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. **Experimental parasitology**, Orlando, v. 124, n. 1, p. 138-146, jan. 2010.

CHAPPELL, C. L.; OKHUYSEN, P. C.; STERLING, C. R.; DUPONT, H. L. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 173, n. 1, p. 232-236, 1996.

CLODE, P. L.; KOH, W. H.; THOMPSON, R. C. A. Life without a host cell: what is *Cryptosporidium*? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 12, p. 614-624, dez. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492215001762>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

COLLI, C. M.; BEZAGIO, R. C.; NISHI, L.; BIGNOTTO, T. S.; FERREIRA, É. C.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; GOMES, M. L. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a relationship among them. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0118065, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4356552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

COUTO, M. C. M.; LIMA, M. F.; BOMFIM, T. C. B. New *Cryptosporidium parvum* subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 130, p. 117–122, 13 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X13003252>>. Acesso em: 27 maio. 2015.

CRAUN, G. F.; BRUNKARD, J. M.; YODER, J. S.; ROBERTS, V. A.; CARPENTER, J.; WADE, T.; CALDERON, R. L.; ROBERTS, J. M.; BEACH, M. J.; ROY, S. L. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 23, n. 3, p. 507-528, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610821>>. Acesso em: 5 abr. 2015.

DAVID, É. B.; GUIMARÃES, S.; OLIVEIRA, A. P. de; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. de; NOGUEIRA BITTENCOURT, G.; NARDI, A. R. M.; RIBOLLA, P. E. M.; FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; TOSINI, F.; BELLA, A.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. **Parasites & vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 103, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4335703&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 6 maio. 2015.

DE MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R.

M. T.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 2, p. 326–329, fev. 2006. Disponível em: <<http://europepmc.org/articles/PMC3373086>>. Acesso em: 25 set. 2015.

DIAS, R. A. F.; FREIRE, R. L. Surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 239–248, 2005.

ELSAFI, S. H.; AL-MAQATI, T. N.; HUSSEIN, M. I.; ADAM, A. A.; HASSAN, M. M. A.; AL ZHRANI, E. M. Comparison of microscopy, rapid immunoassay, and molecular techniques for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. **Parasitology research**, Berlin, v. 112, n. 4, p. 1641–1646, abr. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-013-3319-1>>. Acesso em: 25 set. 2015.

ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; CHALMERS, R. M. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 140, n. 04, p. 673–683, 2012a.

ELWIN, K.; HADFIELD, S. J.; ROBINSON, G.; CROUCH, N. D.; CHALMERS, R. M. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 42, n. 7, p. 675–682, 2012b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751912001270>>. Acesso em: 6 abr. 2015

FARIAS, E. W. C.; GAMBA, R. C.; PELLIZARI, V. H. DETECTION OF CRYPTOSPORIDIUM SPP. OOCYSTS IN RAW SEWAGE AND CREEK WATER IN THE CITY OF SÃO PAULO, BRAZIL. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 41–43, 2002.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, p. 37–56, 2004.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 124, n. 1, p. 90–97, jan. 2010.

FENG, Y.; LI, N. N.; DUAN, L.; XIAO, L. *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 47, n. 1, p. 153–7, jan. 2009. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01777-08>>. Acesso em: 21 set. 2014.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 24, n. 1, p. 110–40, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3021202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 out. 2014.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista panamericana de infectología**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 36–43, 2007.

FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; LEAL, D. A. G. Parasitologia ambiental: Métodos de

concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de patologia tropical**, Goiania, v. 41, n. 2, p. 119–135, 2012.

FRANCO, R. M. B.; NETO, R. C. Occurrence of cryptosporidial oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the City of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 2, p. 205–207, mar. 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-0276200200012&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-0276200200012&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 12 nov. 2012.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. OCCURRENCE OF *Cryptosporidium* OOCYSTS AND *Giardia* CYSTS IN RAW WATER FROM THE ATIBAIA RIVER, CAMPINAS, BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 109–111, 2001.

FU, C. Y.; XIE, X.; HUANG, J. J.; ZHANG, T.; WU, Q. Y.; CHEN, J. N.; HU, H. Y. Monitoring and evaluation of removal of pathogens at municipal wastewater treatment plants. **Water Science and Technology**, v. 61, n. 6, p. 1589–99, 2010.

GAUT, S.; ROBERTSON, L.; GJERDE, B.; DAGESTAD, A.; BRATTLI, B. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Norwegian groundwater wells in bedrock. **Journal of Water and Health**, London, v. 6, n. 3, p. 383–388, 2008.

GONÇALVES, E. M. D. N.; DA SILVA, A. J.; EDUARDO, M. B. D. P.; UEMURA, I. H.; MOURA, I. N. S.; CASTILHO, V. L. P.; CORBETT, C. E. P. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics**, São Paulo, v. 61, n. 2, p. 119–126, abr. 2006.

HAQUE, R.; ROY, S.; SIDDIQUE, A.; MONDAL, U.; RAHMAN, S. M. M.; MONDAL, D.; HOUP, E.; PETRI, W. a. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 76, n. 4, p. 713–717, 2007.

JAKUBOWSKI, W.; SYKORA, J. L.; SORBER, C. A.; CASSON, L. W.; GAVAGHAN, P. D. Determining Giardiasis Prevalence by Examination of Sewage. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 173–178, jul. 1991. Disponível em: <<http://wst.iwaponline.com/content/24/2/173.abstract>>. Acesso em: 23 jan. 2016.

JIANG, J.; ALDERISIO, K. A.; XIAO, L. Distribution of cryptosporidium genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4446–4454, ago. 2005.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, London, v. 5, n. 1, p. 1–38, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.iwaponline.com/jwh/005/jwh0050001.htm>>. Acesso em: 8 nov. 2015.

KOH, W.; CLODE, P. L.; MONIS, P.; THOMPSON, R. Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, n. 1, p. 270, 2013. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/270>>. Acesso em: 21 set. 2015.

LEARMONTH, J. J.; IONAS, G.; EBBETT, K. A.; KWAN, E. S. Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 70, n. 7, p. 3973–8, 1 jul. 2004. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.70.7.3973-3978.2004>>. Acesso em: 4 out. 2015.

LEBBAD, M.; BESER, J.; INSULANDER, M.; KARLSSON, L.; MATTSSON, J. G.; SVENUNGSSON, B.; AXEN, C. Unusual cryptosporidiosis cases in Swedish patients: extended molecular characterization of *Cryptosporidium* *viatorum* and *Cryptosporidium* *chipmunk* genotype I. **Parasitology**, London, v. 140, n. 14, p. 1735–1740, 2013. Disponível em: <[http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S003118201300084X](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S003118201300084X)>. Acesso em: 4 out. 2015.

LI, N.; XIAO, L.; WANG, L.; ZHAO, S.; ZHAO, X.; DUAN, L.; GUO, M.; LIU, L.; FENG, Y. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* by genotyping and subtyping parasites in wastewater. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. e1809, 6 set. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3435239&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 out. 2015.

LIM, Y. A. L.; WAN HAFIZ, W. I.; NISSAPATOM, V. Reduction of *Cryptosporidium* and *Giardia* by sewage treatment processes. **Tropical Biomedicine**, Kuala Lumpur, v. 24, n. 1, p. 95–104, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568382>\n[http://www.msptm.org/files/95\\_-\\_104\\_Lim\\_YAL.pdf](http://www.msptm.org/files/95_-_104_Lim_YAL.pdf)>. Acesso em: 4 out. 2015.

LUCCA, P. de; DE GASPARI, E. N.; BOZZOLI, L. M.; FUNADA, M. R.; SILVA, S. O. de S.; IULIANO, W.; SOARES, R. M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from HIV infected patients from an urban area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 6, p. 341–343, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209271>>. Acesso em: 12 out. 2015.

MAC KENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K. A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 331, n. 3, p. 161–7, 21 jul. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7818640>>. Acesso em: 23 jan. 2016.

MARTI, M.; REGÖS, A.; LI, Y.; SCHRANER, E. M.; WILD, P.; MÜLLER, N.; KNOPF, L. G.; HEHL, A. B. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 27, p. 24837–24848, 4 jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711599>>. Acesso em: 23 jan. 2016.

MASCARINI, L. M.; DONALÍSIO, M. R. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 6, p. 577–579, 2006.

NISHI, L.; BAISSO, M. L.; SANTANA, R. G.; FREGADOLLI, P.; FALAVIGNA, D. L. M.; FALAVIGNA-GUILHERME, a L. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system. **Zoonoses and public health**, Berlin, v. 56, n. 5, p.

221–228, jun. 2009a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19068074>>. Acesso em: 28 out. 2014.

NISHI, L.; BERGAMASCO, R.; TOLEDO, M. J. D. O.; FALAVIGNA, D. L. M.; GOMES, M. L.; MOTA, L. T.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. In the Ivaí Indigenous Land, Brazil. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 9, n. 5, p. 543–7, out. 2009b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945186>><http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vbz.2008.0021>>. Acesso em: 12 nov. 2012.

NYGÅRD, K.; SCHIMMER, B.; SØBSTAD, Ø.; WALDE, A.; TVEIT, I.; LANGELAND, N.; HAUSKEN, T.; AAVITSLAND, P. A large community outbreak of waterborne giardiasis- delayed detection in a non-endemic urban area. **BMC Public Health**, London, v. 6, p. 141, 2006.

PULESTON, R. L.; MALLAGHAN, C. M.; MODHA, D. E.; HUNTER, P. R.; NGUYEN-VAN-TAM, J. S.; REGAN, C. M.; NICHOLS, G. L.; CHALMERS, R. M. The first recorded outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium cuniculus* (formerly rabbit genotype), following a water quality incident. **Journal of water and health**, London, v. 12, n. 1, p. 41–50, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24642431>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 125–30, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134804000139>>. Acesso em: 4 set. 2014.

ROBERTSON, L.; PATON, C.; CAMPBELL, A.; SMITH, P. G.; JACKSON, M. H.; GILMOUR, R. A.; BLACK, S. E.; STEVENSON, D. A.; SMITH, H. V. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. **Water Research**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 2310–2322, jun. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004313549900408X>>. Acesso em: 21 set. 2014.

ROLANDO, R. F.; SILVA, S.; PERALTA, R. H.; SILVA, A. J.; CUNHA FDE, S.; BELLO, A. R.; PERALTA, J. M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* by real-time polymerase chain reaction in stool samples from patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 4, p. 476–479, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666857>>. Acesso em: 1 ago. 2015.

RUIZ, F. M. L.; GONÇALVES, D. D.; REIS, C. R. Dos; BREGANÓ, R. M.; FILHO, F. A.; MURAD, V. A.; NORONHA DUTRA DE MENEZES, M. C.; FREIRE, R. L.; DE FREITAS, J. C.; SANTANA, M. A. Z.; NAVARRO, I. T. Ocorrência de enteroparasitoses em escolares do município de Jataizinho, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Science**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 107–111, 13 mar. 2006.

RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International journal for parasitology**, Oxford, v. 43, n. 12-13, p. 943–56, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856595>>. Acesso em: 2 jun. 2014.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. Cryptosporidium species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, London, v. 141, n. 13, p. 1–19, 11 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111501>>. Acesso em: 21 set. 2014.

RYAN, U.; HIJJAWI, N. New developments in Cryptosporidium research. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 367–373, maio 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751915000478>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

SANTOS, L. U. dos; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R. M. B.; GUIMARÃES, J. R. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 115–120, 2011.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 203–208, maio 2006.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 160–167, abr. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492206000547>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. a B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 1-2, p. 29–40, out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728067>>. Acesso em: 1 abr. 2015.

SOMMER, M. F.; BECK, R.; IONITA, M.; STEFANOVSKA, J.; VASIĆ, A.; ZDRAVKOVIĆ, N.; HAMEL, D.; REHBEIN, S.; KNAUS, M.; MITREA, I. L.; SHUKULLARI, E.; KIRKOVA, Z.; RAPTI, D.; CAPÁRI, B.; SILAGHI, C. Multilocus sequence typing of canine *Giardia duodenalis* from South Eastern European countries. **Parasitology Research**, Berlin, v. 114, n. 6, p. 2165–2174, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4405-3>>. Acesso em: 9 set. 2015.

THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 15–35, 9 dez. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15567577>>. Acesso em: 9 nov. 2015.

THOMPSON, R. C. A. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 43, n. 12-13, p. 1079–1088, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751913001793>>. Acesso em: 9 nov. 2014.

THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 40, p. 315–323, jun. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134815004049>>. Acesso em: 9 nov. 2014.

TONANI, K. A. A.; PADULA, J. A.; JULIÃO, F. C.; FREGONESI, B. M.; ALVES, R. I. S.; SAMPAIO, C. F.; BEDA, C. F.; HACHICH, E. M.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Persistence of Giardia, Cryptosporidium, Rotavirus, and Adenovirus in Treated Sewage in São Paulo State, Brazil. **The Journal of parasitology**, New York, v. 99, n. 6, p. 1144–1147, dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23718640>>. Acesso em: 8 nov. 2015.

WIDERSTRÖM, M.; SCHÖNNING, C.; LILJA, M.; LEBBAD, M.; LJUNG, T.; ALLESTAM, G.; FERM, M.; BJÖRKHOLM, B.; HANSEN, A.; HILTULA, J.; LÅNGMARK, J.; LÖFDAHL, M.; OMBERG, M.; REUTERWALL, C.; SAMUELSSON, E.; WIDGREN, K.; WALLENSTEN, A.; LINDH, J. Large outbreak of Cryptosporidium hominis infection transmitted through the public water supply, Sweden. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 20, n. 4, p. 581–589, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3966397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 jan. 2015.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. **International journal for parasitology**, Oxford, v. 38, n. 11, p. 1239–1255, set. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18479685>>. Acesso em: 30 mar. 2012.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. Cryptosporidium Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 72–97, 15 jan. 2004. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.17.1.72-97.2004>>. Acesso em: 21 set. 2014.

XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 309–323, abr. 2008. Disponível em: <<http://femsim.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-695X.2008.00377.x>>. Acesso em: 15 set. 2015.

YANG, W.; CHEN, P.; VILLEGAS, E. N.; LANDY, R. B.; KANETSKY, C.; CAMA, V.; DEAREN, T.; SCHULTZ, C. L.; ORNDORFF, K. G.; PRELEWICZ, G. J.; BROWN, M. H.; YOUNG, K. R.; XIAO, L. Cryptosporidium source tracking in the Potomac River watershed. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 74, n. 21, p. 6495–6504, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18776033>>. Acesso em: 21 set. 2014.

ZHOU, L.; SINGH, A.; JIANG, J.; XIAO, L. Molecular surveillance of Cryptosporidium spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 41, n. 11, p. 5254–5257, nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14605176>>. Acesso em: 26 jul. 2014.