



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WINNI ALVES LADEIA

**DETECÇÃO DA VIABILIDADE DE *CRYPTOSPORIDIUM* E
GIARDIA E CONCENTRAÇÃO DE *CRYPTOSPORIDIUM* EM
ESGOTO DOMÉSTICO**

Londrina
2021

WINNI ALVES LADEIA

**DETECÇÃO DA VIABILIDADE DE CRYPTOSPORIDIUM E
GIARDIA E CONCENTRAÇÃO DE CRYPTOSPORIDIUM EM
ESGOTO DOMÉSTICO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Lemos Freire

Londrina
2021

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

L154 Ladeia, Winni Alves.

Detecção da Viabilidade de *Cryptosporidium* e *Giardia* e Concentração de *Cryptosporidium* em esgoto doméstico / Winni Alves Ladeia. - Londrina, 2021.
104 f. : il.

Orientador: Roberta Lemos Freire.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Protozoários - Tese. 2. Saneamento - Tese. 3. Epidemiologia - Tese. 4. Saúde Única - Tese. I. Freire, Roberta Lemos . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

WINNI ALVES LADEIA

**DETECÇÃO DA VIABILIDADE DE CRYPTOSPORIDIUM E
GIARDIA E CONCENTRAÇÃO DE CRYPTOSPORIDIUM EM
ESGOTO DOMÉSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, 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. Maria Tereza Pepe Razzolini
Faculdade de Saúde Pública, Universidade de
São Paulo – USP

Profa. Dra. Regina Mitsuka Breganó
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de março de 2021.

Ao Pai

AGRADECIMENTOS

A todos os irmãos humanos que me auxiliaram nesta caminhada direta ou indiretamente, meus mais sinceros agradecimentos. Pela paciência, insistência, cobranças, partilhas e amor. Deixo os perímetros dos meus caminhos abertos, para quando quiserem ou precisarem cruzá-los novamente. Foi um prazer para mim cruzar seus caminhos.

Em especial, agradeço as “pessoas-fortaleza” da minha vida: minha mãe, que não importa o que aconteça, sempre vai apoiar minhas ideias malucas com ótimos conselhos, porque como ela diz, me criou para VIVER; minhas avós, que me ensinaram sobre o amor; meus tios (Sônia e Cris nesta etapa), que sempre mantiveram os braços abertos para mim e me ouviram mesmo sem entender muito das minhas questões e meu pai.

Agradeço aos professores: Dr. João Luis e Dr. Luiz Daniel pelas orientações na parte de diagnóstico molecular; Dra. Regina pelo carinho e minúcia nas correções executadas na qualificação e defesa; Dra. Fernanda e Dra. Eloiza pelas oportunidades e Dra. Maria Tereza Razzolini por compor a banca e contribuir, de forma tão gentil, com seus conhecimentos.

A professora Roberta, minha orientadora, exemplo, amiga e mãe na ciência. Obrigada por sempre acreditar em mim e sempre me incentivar a desbravar os caminhos do conhecimento. Seu exemplo e incentivo me fazem querer contribuir cada dia mais e mais à sociedade, tudo sempre com muito amor e respeito.

Aos meus companheiros de trabalho: Dra. Beatriz, doutora, técnica e mãe em muitos momentos; Dr. Felipe, meu irmão na ciência; Arielle, Giovana e Laís, as melhores estagiárias que eu poderia ter; Pablo, Kerlei e Douglas, que mantem a Zoonoses nos prumos; Ana Clécia, Thais Agostinho e Gustavo (SC) por opiniões e trocas de experiência e controles.

As companheiras de trabalho que se tornaram amigas para toda a vida: Isadora, sempre me sintonizando de volta ao planeta Terra; Nadyne, me contagiando com sua alegria e Juliana Bernardes, me ouvindo, rindo, trabalhando e chorando comigo.

Aos meus amigos que fazem o respirar ser bem mais leve: Laiane,

que me adotou; Ariel, minha acreana favorita; Raquel, minha irmã veterinária; Juliana Cabral, o relaxamento para minha mente; Karem, quem eu acho que ensino, mas sou eu quem mais aprende; todos os irmãos da Aliança Bíblica Universitária (ABU) e... Tami, que não consigo pôr em palavras o que representa na minha vida e Matheus, o irmão que Deus colocou na minha vida ao qual nem sei como agradecer.

Ao meu paleontólogo, teólogo, violinista...e cúmplice para todas as minhas aventuras e devaneios, João.

**Não te deixes vencer do mal,
mas vence o mal com o bem.**

Romanos 12:21

LADEIA, Winni Alves. **Detecção da Viabilidade de *Cryptosporidium* e *Giardia* e Concentração de *Cryptosporidium* em esgoto doméstico**. 2021. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Cryptosporidium e *Giardia* são protozoários que causam gastroenterite em seus hospedeiros, e as espécies mais frequentes no mundo são as de potencial zoonótico. A água é majoritariamente contaminada por esgoto doméstico e escoamentos agropecuários, sendo a via de transmissão de maior preocupação à saúde da população. Dentre as fontes de contaminação para a água, ambos os protozoários são frequentemente encontrados no esgoto, todavia, poucos estudos relacionam dados sobre viabilidade. Para detecção de viabilidade, o método de coloração com Propídio-monoazida (PMA) associada a PCR é avaliada como alternativa a técnica de imunofluorescência associada ao corante 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). O conhecimento da viabilidade desses agentes em esgoto é necessário para avaliar os riscos de contaminação da água e conseqüentemente, a situação de saúde da população. Os objetivos do estudo foram verificar a viabilidade de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. e quantificar oocistos viáveis em afluente e efluente de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) no interior do Paraná. De setembro a novembro de 2020 foram realizadas 10 coletas do afluente e efluente da ETE com periodicidade semanal, desse modo foi possível acompanhar sete processos de tratamento desde a chegada até a saída do esgoto, conforme o tempo de detenção hidráulica. As amostras do afluente e efluente foram concentradas por centrifugação associada a filtração e purificadas por flutuação em solução saturada de sacarose, para aprimorar a sensibilidade de detecção. A viabilidade foi verificada por marcação do DNA das células inviáveis com corante PMA, após fotoativação, associada a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* por nPCR e quantificação de oocistos por qPCR. Todas as amostras de afluente da ETE foram positivas para os protozoários com a presença de formas viáveis, com média de 8.769 oocistos de *Cryptosporidium* viáveis/L. Em efluente, todas foram positivas para *Cryptosporidium* com concentração média de 1.855 oocistos viáveis/L e para *Giardia*, 70% foram positivas, com formas viáveis em 30% delas. O acompanhamento do tratamento, de acordo com tempo de detenção, demonstrou persistência média de 31,17% dos oocistos viáveis após tratamento. Os resultados apresentam uma provável situação endêmica dos protozoários na população que abastece a ETE com alta concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. O tratamento do esgoto reduziu a frequência de cistos de *Giardia* e concentração de oocistos de *Cryptosporidium*, porém não foi capaz de inviabilizar todos os (oo)cistos. Dessa forma, o corpo hídrico recebe cargas frequentes de formas viáveis desses protozoários, que podem causar prejuízo a saúde. A variação na eficácia da redução de oocistos viáveis, demonstrada ao longo dos acompanhamentos de tratamento, evidencia a necessidade de monitoramento da viabilidade desses patógenos no efluente de esgoto para prever e prevenir riscos de infecção da população.

Palavras-chave: contaminação ambiental; propídio-monoazida; QPCR; risco à saúde; água residual.

LADEIA, Winni Alves. **Detection of the viability of *Cryptosporidium* and *Giardia* and concentration of *Cryptosporidium* in domestic wastewater.** 2021. 104 p. Dissertation (Master's in Animal Science) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Cryptosporidium and *Giardia* are protozoa which cause gastroenteritis in their hosts. The zoonotic species are the most frequent in the world. The major sources of contamination to water are runoffs from livestock and domestic wastewater and water is the source of transmission of most worry for health risks. The protozoa are frequently found in wastewater, although, few studies include viability data of (oo)cysts. The Propidium monoazide (PMA) stain method associated to PCR is assessed as an alternative to immunofluorescence and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) stain for viability detection of (oo)cysts. The knowledge of viability in sewage is necessary to assess the status of population health and water risk of contamination. The aims of the study were to verify the viability of *Cryptosporidium* and *Giardia* and quantify viable oocysts in influent and effluent of a Wastewater Treatment Plant (WWTP) in interior of Paraná state of Brazil. Ten collects were executed from September to November 2020 weekly. Respecting the hydraulic detention time, seven monitoring of the wastewater treatment since the sewage arrived until its left of the station were possible. The samples concentration was done by centrifugation associated with filtration and purification for improvement in sensibility. The viability was verified by PMA stain in inviable cells and photoactivation. It was associated to nPCR for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* and to qPCR for the quantification of viable oocysts. All the WWTP influent samples were positive for both protozoa including the presence of viable oocyst. The mean concentration of *Cryptosporidium* oocysts was 8,769 oocysts/L. In the WWTP effluent, all the samples were positive to *Cryptosporidium* with a mean concentration of 1,855 viable oocysts/L and 70% of samples were positive for *Giardia* in which 30% had viable cysts. The monitoring of wastewater treatment demonstrated a mean persistence of 31,17% of viable oocysts after treatment. The results indicated a probable endemic presence of these protozoa in the population which supplies the WWTP and *Cryptosporidium* presents high concentration of viable forms. The wastewater treatment reduced the frequency of cysts and the concentration of oocysts, although it was not capable to make all (oo)cysts unviable. The receptor river receives frequent charges of viable (oo)cysts which may cause risks for health. The variation in the reduction efficacy of viable oocysts evidences the necessity of monitoring (oo)cysts viability in sewage effluent to predict and prevent infection risks to the population.

Key words: environmental contamination; PMA; qPCR; health risk. wastewater.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** Espécies de *Cryptosporidium* descritas até 2021* com a classe taxonômica dos animais parasitados, os principais hospedeiros e o sítio de infecção21
- Quadro 2** Espécies de *Giardia* descritas até 2020* com divisão taxonômica atual, nova proposta de nomenclatura descrita por Monis, Cacciò e Thompson (2009) e hospedeiros acometidos24
- Quadro 3** Oligonucleotídeos utilizados na nPCR, do gene 18S rDNA para detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. e na qPCR para gene 18S rDNA para *Cryptosporidium* em esgoto, 202061

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Descrição espacial do local de coleta (ETE) de afluentes e efluente de esgoto de Ibiporã e Bacia do Rio Jacutinga, 202058
- Figura 2** Concentração de oocistos de *Cryptosporidium*, totais e viáveis, em afluentes e efluente de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), em 10 coletas semanais de setembro a novembro de 2020 em Ibiporã, Paraná, Brasil.....66
- Figura 3** Imagem de satélite de região de estudo com a representação do Rio Jacutinga a montante e a jusante do local do despejo de efluente da Estação de Tratamento de Esgoto com a concentração de oocistos viáveis de *Cryptosporidium*, Ibiporã, PR, 202068

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência de (oo)cistos totais e viáveis de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> com concentrações médias de <i>Cryptosporidium</i> em afluente e efluente de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) em Ibiporã, Paraná, Brasil, 2020.	65
Tabela 2	Acompanhamentos da concentração de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> , de acordo com tempo de detenção, em afluente e efluente de Estação de Tratamento de Esgoto, relacionados a remoção e persistência de oocistos após tratamento, Ibiporã, Paraná, BR, 2020.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
GDH	Glutamato desidrogenase
Gp60	60 kDa Glicoproteína
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMS	Separação Imunomagnética
(oo)cistos	oocistos e cistos
OMS	Organização Mundial de Saúde
nPCR	nested Polimerase Chain Reaction
PMA	Propídio-monoazida ou Propidium monoazide
qPCR	quantitative Polimerase Chain Reaction
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction
TPI	Triosefosfato Isomerase
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	CRYPTOSPORIDIUM E GIARDIA	20
2.1.1	Taxonomia	20
2.1.2	Ciclo De Vida	25
2.2	CADEIA DE TRANSMISSÃO E INTERFERÊNCIA NA EPIDEMIOLOGIA	27
2.2.1	Ocorrência Em Hospedeiros.....	27
2.2.2	Ocorrência No Ambiente	28
2.2.3	Interferência Das Fontes De Infecção No Ambiente	29
2.2.4	Influência Do Ambiente Para Hospedeiros Susceptíveis	31
2.3	ESGOTO COMO RESERVATÓRIO AMBIENTAL DE CRYPTOSPORIDIUM E GIARDIA	33
2.4	MÉTODOS DE DETECÇÃO: USO, LIMITAÇÕES E DISPONIBILIDADE.....	37
2.4.1	Propídio-Monoazida Pcr Para Detecção De Viabilidade	41
3	REFERÊNCIAS	43
4	HIPÓTESE	53
5	OBJETIVOS	54
5.1	OBJETIVO GERAL	54
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
6	ARTIGO – VIABILIDADE DE CRYPTOSPORIDIUM E GIARDIA EM ESGOTO DOMÉSTICO NO INTERIOR DO BRASIL.	55
6.1	INTRODUÇÃO	56
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
6.2.1	Descrição Do Local De Estudo: Aspectos Socioeconômicos E De Saneamento	57
6.2.2	Coleta Das Amostras	58
6.2.3	Concentração E Purificação	59

6.2.4	Viabilidade De Oocistos E Cistos Por Propídio-Monoazida	60
6.2.5	Curva Padrão Para Quantitativepcr De Cryptosporidium	60
6.2.6	Análise Molecular	61
6.2.7	Quantificação De Oocistos No Esgoto.....	62
6.2.8	Análise Estatística	63
6.2.9	Descrição Espacial	63
6.3	RESULTADOS	63
6.4	DISCUSSÃO	68
6.5	CONCLUSÃO	73
6.6	AGRADECIMENTOS	74
6.7	REFERÊNCIAS	74
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

Cryptosporidium e *Giardia* são protozoários de ciclo monoxeno que acarretam gastroenterite em seus hospedeiros. Espécies de animais entre mamíferos, aves e anfíbios são conhecidos por hospedarem ambos os protozoários, e, alguns peixes e répteis podem hospedar *Cryptosporidium*. Das espécies dos parasitas, as mais descritas no mundo são *C. parvum*, *C. hominis* e *C. meleagridis*, que são espécies zoonóticas e as mais descritas em humanos, e, *G. duodenalis*, única espécie do gênero zoonótica (ŠLAPETA, 2013; THOMPSON; ASH, 2016). Além da variedade de hospedeiros, a alta carga de (oo)cistos eliminados nas fezes e a alta infectividade associada à baixa dose infectante, corroboram com a ampla dispersão desses parasitas (MEDEMA et al., 2006; FENG; XIAO, 2011; HOFSTRA et al., 2013; ŠLAPETA, 2013).

A dispersão de *Cryptosporidium* e *Giardia* é potencializada pela via de transmissão hídrica. Esses protozoários são os mais transmitidos pela água em todo o mundo e os maiores causadores de surtos de veiculação hídrica (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007; BALDURSSON; KARANIS, 2011). O sucesso em se dispersar pela água está relacionado à alta resistência química e física de suas formas infectantes, os (oo)cistos, os quais são conhecidamente resistentes a desinfetantes, como o cloro, e apresentam baixa retenção às barreiras físicas convencionalmente utilizadas em estações de tratamento de água (ETA), como filtros e decantadores (NASSER, 2016; KING et al., 2017). Por conta disso, *Cryptosporidium* é reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como referência para patógenos entéricos na água, de acordo com altos valores de risco (MEDEMA et al., 2006).

Devido a essa resistência, medidas que previnam que os (oo)cistos contaminem fontes de água são mais aplicáveis para evitar sua dispersão. As principais origens de contaminação hídrica são o escoamento de resíduos fecais e o esgoto doméstico. O escoamento mais relevante é proveniente de atividades rurais ligadas a pecuária, já o esgoto é considerado mais relevante para a contaminação de corpos hídricos relacionados a ambientes urbanos (HOFSTRA et al., 2013). Dessa forma, assegurar a ausência ou inviabilidade de (oo)cistos nessas águas residuais é essencial para garantir a segurança quanto à transmissão hídrica desses parasitas (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007; THOMPSON; ASH, 2016).

1 As transmissões de patógenos por via hídrica são causadas
2 principalmente por precárias condições de saneamento básico. Um saneamento
3 básico de qualidade impede ou reduz o contingente de microrganismos nocivos
4 excretados por humanos e animais por meio do cumprimento de todas as etapas do
5 ciclo de vida do saneamento (TROEGER et al., 2018; WHO, 2018). A contenção,
6 coleta, tratamento, despejo adequado e reuso da água residual compõem o ciclo que
7 por sua vez precisa ser avaliado para certificar sua eficiência em reduzir impactos
8 ambientais e riscos à saúde. O monitoramento de patógenos como *Cryptosporidium*
9 e *Giardia* no esgoto é sugerido para estabelecer o controle das etapas e planejar
10 melhorias necessárias (MEDEMA et al., 2006; HOFSTRA et al., 2013). Neste sentido,
11 o esgoto é utilizado como ferramenta epidemiológica para avaliar a presença desses
12 patógenos na população e ainda para estimar riscos de transmissão de patógenos por
13 via hídrica (XIAO et al., 2018; MAO et al., 2020).

14 Vários estudos demonstraram a presença dos protozoários no esgoto
15 com alta frequência entre as coletas, indicando a constância dos parasitas nessa
16 matriz. Em todo o mundo, as frequências dos parasitas entre afluente e efluente de
17 estações de tratamento são similares, na qual (oo)cistos estão presentes em altas
18 cargas no esgoto bruto, enquanto cargas alarmantes são observadas no esgoto
19 tratado, o que traz um alerta para contaminação de águas superficiais (SANTOS et
20 al., 2011; SATO et al., 2013; TONANI et al., 2013; MARTINS et al., 2019).

21 Neste sentido, mesmo que escassos, alguns estudos ainda
22 certificaram que há (oo)cistos viáveis em esgoto doméstico (SANTOS et al., 2011; MA
23 et al., 2016). Considerando o lançamento do esgoto tratado em uma fonte de água
24 superficial, a viabilidade desses protozoários deve ser verificada nos efluentes de ETE
25 para determinação dos riscos de transmissão hídrica e conseqüente, atuação com
26 medidas preventivas à contaminação da água, que possam evitar riscos à saúde
27 animal e humana.

28

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *CRYPTOSPORIDIUM* E *GIARDIA*

Cryptosporidium spp. é um protozoário de ciclo monoxeno com alto potencial de resistência ambiental na forma de oocisto. O parasita é causador de diarreia osmótica, caracterizada por seu aspecto aquoso, que afeta principalmente hospedeiros imunossuprimidos (RYAN; HIJJAWI, 2015). As espécies do protozoário podem infectar hospedeiros distribuídos entre mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (KHAN; SHAIK; GRIGG, 2018). *Giardia* spp. é um protozoário flagelado de ciclo monoxeno que apresenta resistência ambiental em sua forma de cisto. Este parasito causa quadro crônico de diarreia osmótica, caracterizada por aspecto mucoso e lipidoso (FOSTER; SMITH, 2009). Mamíferos, aves e anfíbios são hospedeiros do protozoário, mediante confirmação molecular e experimental (RYAN; CACCIÒ, 2013).

Cryptosporidium é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como patógeno de referência para o controle de qualidade da água (MEDEMA et al., 2006). Essa atenção ocorre pelo alto potencial de resistência ambiental apresentado pelos oocistos de *Cryptosporidium* que também é observado nos cistos de *Giardia*. Ambos resistem a maior parte dos desinfetantes utilizados para o tratamento da água, característica essa que permite a distribuição dos parasitas de forma maciça para várias populações em um mesmo tempo e frequentemente deriva surtos de transmissão hídrica (BALDURSSON; KARANIS, 2011).

2.1.1 Taxonomia

Cryptosporidium pertence ao reino Protista, ao filo Apicomplexa, a classe Gregarinomorpha, a subclasse Cryptogregarina, a ordem Cryptogregarida e a família Cryptosporidiidae (CAVALIER-SMITH, 2014). Características genômicas, morfológicas, bioquímicas e biológicas do gênero permitiram que o protozoário fosse classificado como gregarina. Dentre elas podem-se destacar: a presença de dois tipos de oocistos, um de parede fina, que possibilita autoinfecção, e de parede grossa, com alta resistência ambiental; posição intracelular extracitoplasmática que o parasita

1 adota nos enterócitos do hospedeiro e o potencial de se replicar em ambiente
2 extracelular (RYAN et al., 2016).

3 Foram descritas até o momento 40 espécies de *Cryptosporidium* em
4 todo o mundo, as quais afetam hospedeiros distribuídos em todas as classes
5 taxonômicas dos vertebrados com mandíbula (Intrafilo Gnathostomata) (Quadro 1).
6 Essa ampla gama de hospedeiros demonstra que o protozoário não possui
7 característica espécie-específica, o que indica um potencial de adaptação a diferentes
8 hospedeiros e permite alta persistência do parasita (RYAN; HIJJAWI, 2015; FENG;
9 RYAN; XIAO, 2018; KHAN; SHAIK; GRIGG, 2018).

10 Cerca de 17 espécies de *Cryptosporidium* foram descritas em
11 humanos. No entanto, em oito espécies o potencial zoonótico do protozoário foi
12 confirmado, que são: *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. ubiquitum*, *C. muris*, *C. canis*, *C.*
13 *felis*, *C. cuniculus* e *C. viatorum*. *C. parvum* é a espécie que afeta o maior número de
14 espécies hospedeiras, e é a que expressa maior contingente de transmissão
15 zoonótica, em seguida, *C. meleagridis* e as outras citadas. *C. hominis* foi detectado
16 em humanos e outros mamíferos, contudo, o predomínio da espécie está na
17 população humana (RYAN; HIJJAWI, 2015; RYAN; ZAHEDI; PAPANINI, 2016; FENG;
18 RYAN; XIAO, 2018).

19 *Giardia* pertence ao reino Protista, ao filo Sarcomastigophora, a
20 classe Zoomastigophorea, a ordem Diplomonadida e a família Hexamitidae. A
21 classificação descrita foi pautada em aspectos morfológicos, porém nova
22 classificação, estabelecida de acordo com características bioquímicas, biológicas e
23 genéticas, foi proposta. Nesta proposta, *Giardia* pertence ao filo Metamonada, a classe
24 Trepomonadea, a ordem Giardiida e a família Giardiidae (PLUTZER; ONGERTH;
25 KARANIS, 2010)

26
27 **Quadro 1** - Espécies de *Cryptosporidium* descritas até 2021* com a classe taxonômica
28 dos animais parasitados, os principais hospedeiros e o sítio de infecção.

Espécies	Deteção Humanos	Animais	Órgão acometido	Total Espécies
Amphibia				1
<i>C. fragile</i>	-	Anfíbios	Estômago	

Aves				5
<i>C. avium</i>	-	Psittaciformes, Galliformes	Intestino	
<i>C. baileyi</i>	-	Aves	Mucosas (respiratória, Sistema digestório), Ocular	
<i>C. galli</i>	-	Aves	Proventrículo	
<i>C. ornithophilus</i>	-	Avestruzes, galinhas, gansos, calopsitas	Intestino grosso	
<i>C. proventriculi</i>	-	Aves	Proventrículo	
Aves e Mammalia				2
<i>C. meleagridis</i>	sim	Aves, bovinos, humanos	Intestino	
<i>C. muris</i>	sim	Roedores, lagomorfos, caninos, felinos, humanos, avestruzes	Estômago	
Mammalia				25
<i>C. andersoni</i>	sim	Ruminantes, camundongos, humanos	Estômago	
<i>C. apodemi</i>	-	Roedores	Intestino	
<i>C. bovis</i>	sim	Bovinos	Intestino	
<i>C. canis</i>	sim	Caninos, bovinos, humanos	-	
<i>C. cuniculus</i>	sim	Lagomorfos, camundongos, humanos	Intestino	
<i>C. ditrichi</i>	-	Roedores	Intestino delgado	
<i>C. erinacei</i>	sim	Equinos, ouriços, humanos	Intestino	
<i>C. fayeri</i>	sim	Marsupiais, humanos	-	
<i>C. felis</i>	sim	Felinos, humanos, bovinos	Trato gastrointestinal	
<i>C. homai</i>	-	Porquinho-da-índia	Intestino	
<i>C. hominis</i>	sim	Humanos, ruminantes	Intestino	
<i>C. macropadum</i>	-	Marsupiais	-	
<i>C. occultus</i>	sim	Roedores e ruminantes	Intestino grosso	

<i>C. parvum</i>	sim	Mamíferos	Intestino
<i>C. proliferans</i>	-	Roedores, ruminantes	Estômago
<i>C. rattii</i>	-	Roedores	Intestino delgado
<i>C. rubeyi</i>	-	Esquilos	-
<i>C. ryanae</i>	-	Bovinos	-
<i>C. scrofarum</i>	sim	Suídeos, humanos	Intestino
<i>C. suis</i>	sim	Suídeos, humanos	Intestino
<i>C. tyzzeri</i>	sim	Camundongos, humanos	Intestino
<i>C. ubiquitousum</i>	sim	Várias espécies de mamíferos	Trato gastrointestinal
<i>C. viatorum</i>	sim	Humanos	Trato gastrointestinal
<i>C. wrairi</i>	-	Porquinho-da-índia, camundongo, ruminantes	Intestino
<i>C. xiaoi</i>	-	Ruminantes	-
Peixes			4
<i>C. bollandi</i>	-	Peixes escalares	Estômago
<i>C. huwi</i>	-	Peixes	Estômago
<i>C. molnari</i>	-	Peixes	Estômago
<i>C. scophtalmi</i>	-	Rodvalho	Estômago e Intestino
Reptilia			2
<i>C. testudinis</i>	-	Cágados	-
<i>C. varanii</i>	-	répteis	-
Reptilia e Mammalia			1
<i>C. serpentis</i>	-	Répteis, bovinos, camundongo	Estômago
Total	17		40

1 * Referências: (ALVAREZ-PELLITERO et al., 2004; ŠLAPETA, 2013; KVÁČ et al., 2016, 2018, 2014a; LI et al.,
2 2015; RYAN et al., 2015; RYAN; HIJJAWI, 2015; HOLUBOVÁ et al., 2016, 2019, 2020; JEŽKOVÁ et al., 2016,
3 2021; ZAHEDI et al., 2017; ČONDLOVÁ et al., 2018; FENG; RYAN; XIAO, 2018; BOLLAND et al., 2020)

4

Foram descritas oito espécies de *Giardia* de acordo com características morfológicas, genéticas e bioquímicas e apresenta moderada espécie-especificidade porque foi relatada a infecção de cada espécie apenas em uma classe taxonômica de seus hospedeiros (Quadro 2) (RYAN; CACCIÒ, 2013).. *Giardia varani* foi descrita em lagartos, porém apenas características morfológicas foram abordadas, não possibilitando sua inclusão taxonômica (UPTON; ZIEN, 1997).

Quadro 2 - Espécies de *Giardia* descritas até 2020* com divisão taxonômica atual, nova proposta de nomenclatura descrita por Monis, Cacciò e Thompson (2009) e hospedeiros acometidos.

Espécies	Assemblege s	Nomenclatur a proposta	Hospedeiros
<i>Giardia agilis</i>	-		Anfíbios
<i>G. ardeae</i>	-		Aves
<i>G. cricetidarum</i>	-		Roedores (Cricetidae)
<i>Giardia duodenalis</i>			Mamíferos
	A	<i>G. duodenalis</i>	Humanos, primatas não humanos, bovinos, ovinos, cão, gato, mamíferos silvestres
	B	<i>G. enterica</i>	Humanos, primatas não humanos, cão, gato, mamíferos silvestres, bovinos (relatos)
	C		Canídeos
	D	<i>G. canis</i>	Canídeos
	E	<i>G. bovis</i>	Bovinos, ovinos, caprinos, suínos, equinos
	F	<i>G. felis</i>	Felídeos
	G	<i>G. simondi</i>	Roedores
	H	-	Mamíferos marinhos
<i>G. microti</i>	-		Roedores
<i>G. muris</i>	-		Roedores
<i>G. peramelis</i>	-		Marsupiais (<i>Isoodon obesulus</i>)
<i>G. psittaci</i>	-		Aves

*Referências: (PLUTZER; ONGERTH; KARANIS, 2010; RYAN; CACCIÒ, 2013; HILLMAN et al., 2016; GARCIA-R et al., 2017; XIAO; FENG, 2017; LYU et al., 2018).

Dentre as oito espécies, apenas *G. duodenalis* foi descrita em humanos, sendo a única com potencial zoonótico confirmado. Essa espécie apresenta alta variabilidade genética se comparada com as demais, o que levou a sua

1 classificação em oito grupos genéticos denominados *assemblages*. Dentre eles, os
2 *assemblages* A e B foram descritos em humanos e outros mamíferos, C e D em
3 canídeos e relatos em outros mamíferos domésticos, E em ruminantes e relatos em
4 outros mamíferos domésticos, F em felídeos e relatos em outros mamíferos, G em
5 roedores e H em mamíferos marinhos (RYAN; CACCIÒ, 2013; HEYWORTH, 2016).

6 Os *assemblages* de *G. duodenalis* apresentam variações genotípicas
7 e fenotípicas que configuram certo distanciamento filogenético. Por conta dessas
8 variações, foi proposta a classificação desses grupos genéticos como espécies.
9 Dessa forma, o *assemblage* A seria denominado *G. duodenalis*; o B, *G. enterica*; os
10 C e D, *G. canis*; o E, *G. bovis*; o F, *G. cati* e o G, *G. simondi*. O *assemblage* H ainda
11 não foi nomeado devido a necessidade de mais descrições para construções
12 completas do genoma. Para classificação taxonômica dessas espécies, atualizações
13 quanto a biologia e análises moleculares desses grupos genéticos devem ser
14 realizadas (MONIS; CACCIO; THOMPSON, 2009; RYAN; CACCIÒ, 2013).

15 Com o avanço das ferramentas de análise molecular, a genotipagem
16 e subtipagem das espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* foram possíveis, o que
17 acarretou aprimoramento no entendimento da epidemiologia de ambos. Para
18 *Cryptosporidium* a genotipagem é baseada no gene *gp60* (60 kDa Glicoproteína), e
19 apresenta classificação para mais de 10 espécies do protozoário. *C. hominis* foi o
20 primeiro a ser analisado, por isso possui a codificação I, seguido pelas letras de la a
21 lk para enquadramento de semelhantes. Em seguida, *C. parvum* foi codificado em II,
22 com variações nas famílias de subtipos indo de Ila a Ilt (XIAO; FENG, 2017; FENG;
23 RYAN; XIAO, 2018).

24 Para *Giardia* há genotipagem para os *assemblages* A, B e E de *G.*
25 *duodenalis* por conta da existência de maiores informações genéticas para esses
26 grupos. A genotipagem é baseada nos genes *gdh* (glutamato-desidrogenase), *tpi*
27 (triosefosfato isomerase) e *beta-giardin* que codificam o *assemblage* A em A1 a A6 e
28 B em B1 a B4, todavia, B e E apresentam alta variação genética entre esses genes, o
29 que dificulta a definição de subtipificação (RYAN; CACCIÒ, 2013; XIAO; FENG, 2017).

30 31 2.1.2 Ciclo de Vida

32
33 *Cryptosporidium* e *Giardia* apresentam algumas semelhanças em
34 seus ciclos de vida. Ambos os protozoários: possuem resistência ambiental nas

1 formas de oocistos e cistos, respectivamente; e, são transmitidos pela forma direta,
2 devido a característica de (oo)cistos serem eliminados já infectantes, poderem
3 contaminar mãos e já serem transmitidos; ou pela forma indireta, quando há ingestão
4 de alimentos ou água contaminados com (oo)cistos. Essas semelhanças na fase
5 ambiental do ciclo e nas formas de transmissão fecal-oral geram relação próxima na
6 epidemiologia desses parasitas, fato que proporciona com que sejam estudados
7 conjuntamente (RYAN; CACCIÒ, 2013; THOMPSON; ASH, 2016).

8 Após a ingestão de oocistos de *Cryptosporidium* pelo hospedeiro
9 susceptível, ocorre o excistamento no estômago, os esporozoítos são liberados e
10 aderem as células do epitélio do trato gastrointestinal. O sítio de adesão varia entre
11 as espécies (Quadro 1), mas o tropismo é por células epiteliais. Os esporozoítos
12 adotam posição intracelular extracitoplasmática e ficam envoltos pelo vacúolo
13 parasitóforo, o que permite evasão ao sistema imune. Se nutrem por meio da organela
14 alimentadora, e se diferenciam em trofozoítos iniciando a fase de merogonia
15 (THOMSON et al., 2017).

16 Na merogonia os merozoítos se replicam de forma assexuada e
17 rompem o vacúolo parasitóforo para infectarem outras células o que gera injúria a
18 superfície de contato apical da célula epitelial. Uma segunda fase de merogonia é
19 iniciada e os merozoítos de segundo estágio podem ou não dar início a fase de
20 merogonia se diferenciando em microgamontes e macrogamontes, dando início a
21 fase de gametogonia. Nesta fase de reprodução sexuada, os microgamontes se
22 conjugam aos macrogamontes dando origem a um zigoto. Este se divide, dando
23 origem a quatro esporozoítos e os oocistos de parede fina (uma camada) e parede
24 grossa (duas camadas) são formados. Os oocistos são liberados para a lúmen do
25 órgão infectado e são eliminados nas fezes. Os de parede fina se rompem na luz do
26 intestino causando autoinfecção e, dessa forma, mantem a infecção crônica, não
27 sendo infectantes a outros hospedeiros. Os de parede grossa são as formas
28 infectantes do parasita (THOMSON et al., 2017; KHAN; SHAIK; GRIGG, 2018).

29 O ciclo parasitário de *Giardia* se inicia com a ingestão de cistos, estes
30 se excistam no duodeno devido ao estímulo do pH e a temperatura do hospedeiro. Os
31 trofozoítos se aderem à superfície das microvilosidades, adotando posição
32 extracelular, se nutrem do substrato digerido pelo hospedeiro e se multiplicam por
33 divisão binária. A reprodução do protozoário é assexuada, no entanto, estudos são

1 propostos para verificar o potencial de trocas de material genético entre as células
2 (RYAN; CACCIÒ, 2013; THOMPSON; ASH, 2016).

3 Os trofozoítos têm estímulo para encistamento por meio do contato
4 com a bile, o que caracteriza a eliminação intermitente do parasita. Os cistos formados
5 são eliminados nas fezes, são infectantes e contaminam o ambiente (FENG; XIAO,
6 2011; RYAN; CACCIÒ, 2013).

8 2.2 CADEIA DE TRANSMISSÃO E INTERFERÊNCIA NA EPIDEMIOLOGIA

10 2.2.1 Ocorrência em Hospedeiros

11 *Cryptosporidium* e *Giardia* afetam várias espécies diferentes de
12 animais e a frequência entre as espécies acometidas tem alta variação. Nos anfíbios,
13 poucos estudos foram realizados, ocorrendo descrições de forma isolada (KVÁČ et
14 al., 2014b). Um estudo, com amostragens feitas por um período de dez anos em um
15 zoológico, não detectou a presença de *Giardia* nos anfíbios, enquanto nas demais
16 classes taxonômicas citadas houve detecção, o que indica sua baixa prevalência
17 (CHAGAS et al., 2019).

18 As frequências observadas nos répteis e peixes também são baixas,
19 todavia os estudos com foco nessas populações são escassos. A epidemiologia da
20 criptosporidiose nesses hospedeiros não é clara. Sabe-se até o momento que as
21 espécies de *Cryptosporidium* que possuem esses animais como hospedeiros não são
22 consideradas zoonóticas (RYAN, 2010). Pouco se sabe sobre outras espécies do
23 parasita acometendo esses indivíduos, no entanto, houve detecção de espécies
24 zoonóticas em peixes (CERTAD et al., 2015). *Giardia* já foi detectada em peixes,
25 todavia, nenhuma espécie foi relacionada taxonomicamente (YANG et al., 2010)

26 A frequência de *Cryptosporidium* nas aves é mais conhecida por conta
27 dos estudos realizados em aves de produção. A ocorrência em frangos fica em torno
28 de 10% no mundo, variando de acordo com as condições de criação e rigor higiênico-
29 sanitário. Em outras espécies, como perus e patos, os valores são próximos (WANG
30 et al., 2014; HELMY et al., 2017). No Brasil, estudos relatam frequências entre 12 e
31 14% em aves de produção, com a maior ocorrência em galinhas poedeiras (DA
32 CUNHA; CURY; SANTÍN, 2018; SANTANA et al., 2018). Em aves silvestres o nível
33 de acometimento varia muito, em decorrência do número baixo de animais
34 contemplados nos estudos ou por verificações apenas em animais que apresentam

1 sinais clínicos (NAKAMURA; MEIRELES, 2015). *Giardia* é menos estudada em aves,
2 porque esses animais são assintomáticos e geralmente não apresentam *assemblages*
3 zoonóticos (CANO et al., 2016; CUNHA; CURY; SANTÍN, 2017). Contudo,
4 *assemblages* A e B já foram verificados nesses animais (BERRILLI et al., 2012).

5 Os mamíferos são os mais estudados quanto à presença e a
6 epidemiologia desses protozoários. Em animais de produção, a detecção de
7 *Cryptosporidium* é frequente. Em bovinos a ocorrência encontrada fica em torno de
8 10%. Mais especificamente em bezerros neonatos, o parasita é responsável por cerca
9 de 37% dos quadros de diarreia (THOMSON et al., 2017). Em suínos a ocorrência
10 varia de 0 a 18%. Nos animais neonatos essas frequências são maiores para ambas
11 as espécies de hospedeiros. A constância da detecção do parasita nesses
12 hospedeiros é percebida ao levar em consideração as propriedades rurais positivas,
13 que para bovinos, apresentam positividade de mais de 50% (SEVÁ et al., 2012; LIN
14 et al., 2015; TOLEDO et al., 2017; ZOU et al., 2017).

15 *Giardia duodenalis* é a espécie do gênero mais descrita em todo o
16 mundo, justamente por afetar uma ampla gama de mamíferos, incluindo o homem, e
17 isso facilitar sua dispersão. *Giardia* apresenta característica endêmica em humanos
18 para os *assemblages* A e B, e a mesma característica se observa em cães e bovinos
19 para os *assemblages* C e D, e E respectivamente. Todavia, o *assemblage* mais
20 frequente em mamíferos é o A, que foi detectado em uma maior variedade de espécies
21 (RYAN; CACCIÒ, 2013).

22 23 2.2.2 Ocorrência no ambiente

24 A via de eliminação desses parasitas pelo hospedeiro são as fezes, o
25 que acarreta transmissão direta ou indireta. Para transmissão direta, a eliminação em
26 locais com a presença de fontes de infecção e hospedeiros susceptíveis é mais
27 frequente. Para transmissões indiretas, a contaminação da água e/ou de alimentos
28 com os (oo)cistos são os mais observados e os mais eficientes para dispersão e
29 persistência dos parasitas na população (BALDURSSON; KARANIS, 2011).

30 No ambiente, os cistos podem se manter viáveis por meses e oocistos
31 por até dois anos. Ambos apresentam resistência aos processos de tratamento de
32 água convencionalmente utilizados. As barreiras mecânicas como decantação e
33 filtração apresentam um resultado variável de retenção nesses sistemas de
34 tratamento, ainda assim, configuram maior eficiência que outras técnicas

1 empregadas, como a desinfecção por cloro, que é ineficaz (FAYER, 2004;
2 BALDURSSON; KARANIS, 2011; RYAN; CACCIÒ, 2013).

3 A maior parte dos surtos causados por esses protozoários foi
4 transmitida pela água, por conta, principalmente, dessas características de resistência
5 e pela água ter o potencial de veicular o agente para vários indivíduos em um mesmo
6 período de tempo. Isso pode aumentar o número de notificações de casos em
7 determinada população, por se tratar de uma via de transmissão maciça.
8 *Cryptosporidium* foi responsável por 55% (304/554) dos surtos de gastroenterite em
9 humanos causados por protozoários e transmitidos pela água e *Giardia* foi
10 responsável por 38% (210/554) deles, portanto, estes os protozoários que mais
11 causam surtos de veiculação hídrica no mundo (BALDURSSON; KARANIS, 2011).

12 Outra característica que corrobora para o potencial de causar surtos
13 de transmissão pela água é a baixa dose infectante. A dose infectante mínima para
14 *Cryptosporidium* é de 10 oocistos e para *Giardia* é de 10 a 100 cistos. Considerando
15 a recomendação de ingestão diária de 42,9mL/kg de água, a concentração de 3
16 oocistos/L e 3,33 cistos/L em água de beber para um ser humano de 70kg configura
17 risco de infecção (FAYER, 2004; GRANDJEAN, 2004; FENG; XIAO, 2011).

18 19 2.2.3 Interferência das Fontes de Infecção no Ambiente

20 As fontes de infecção (FI) são animais ou humanos que hospedam
21 esses parasitas e eliminam os (oo)cistos pelas fezes, para que hospedeiros
22 susceptíveis sejam afetados. Quando infectados com *Cryptosporidium* o período de
23 incubação varia de três a sete dias. O período pré-patente é de três dias após infecção
24 e o período patente se estende de duas semanas a meses, podendo persistir por
25 período indeterminado se a infecção não for debelada. No pico de eliminação, o carga
26 parasitária que afeta o ambiente é de cerca de 10^7 oocistos/g de fezes (FOSTER;
27 SMITH, 2009). Quando infectados com *Giardia*, o período de incubação e o período
28 pré-patente médio são de seis dias, com eliminação de cistos por, em média, 20 dias
29 de forma intermitente. São excretados cerca de 10^6 cistos/g de fezes no pico de
30 eliminação (BELOSEVIC et al., 1984).

31 As FI de maior relevância para ambos os protozoários são os
32 mamíferos. Portanto, a maior parte dos estudos relacionados a epidemiologia dos
33 parasitas está atrelado a esses hospedeiros, principalmente animais de produção e
34 humanos. Isso se deve a capacidade de transmissão zoonótica das espécies que os

1 acometem ser comprovada e, sua maior dispersão. Essas espécies zoonóticas de
2 *Cryptosporidium* e grupos genéticos de *Giardia duodenalis* são as mais encontradas
3 no ambiente (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017).

4 Nos estudos de análise molecular, encontram com maior frequência
5 em amostras ambientais, *C. parvum*, *C. hominis*, *C. muris* e *C. meleagridis*. No caso
6 de *Giardia duodenalis* a maior frequência de detecção é do assemblege A e B,
7 seguidos por uma menor detecção do C, D e E (DURIGAN et al., 2014; MA et al.,
8 2016). Esses achados demonstram a relevância dos genótipos do parasita eliminados
9 por hospedeiros que estão mais predominantes e aglomerados no mundo e que,
10 conseqüentemente, mais afetam o ambiente.

11 Em ambientes com maior aglomeração do ser humano, as espécies
12 dos parasitas que acometem o homem são mais encontradas. Análises moleculares
13 de *Cryptosporidium*, detectado em amostras de esgoto doméstico, apontam para uma
14 constância na observação de espécies zoonóticas. Observa-se que em situações
15 onde o esgoto está mais atrelado a regiões de aglomeração de pessoas, *C. hominis*,
16 *C. parvum*, *C. meleagridis* e *C. muris* apresentam maior relevância em relação as
17 outras. Isso demonstra o potencial dos humanos, quando FI, de contaminarem o
18 ambiente com esses oocistos. A alta frequência de *C. muris* pode ser proveniente de
19 roedores nas redes de esgoto (MA et al., 2016; MARTINS et al., 2019).

20 Para *Giardia*, mesmo comportamento é observado. A diferença entre
21 ambos os protozoários é que a predominância de *assembleges* zoonóticos em relação
22 aos outros é observada no esgoto em regiões não só urbanas como rurais
23 (BERTRAND; SCHWARTZBROD, 2007; MA et al., 2016). No caso de
24 *Cryptosporidium*, as espécies mais comuns em humanos também são observadas em
25 contextos rurais, todavia, as proporções das espécies *C. parvum*, *C. meleagridis* e *C.*
26 *suis* são maiores em relação a proporção de *C. hominis* (MA et al., 2016). Isso
27 reafirma a influência das FIs na contaminação do ambiente e indica a caracterização
28 de sua transmissão pelo grau de interação entre FI e hospedeiros susceptíveis,
29 proporcionada pelo ambiente.

30 Para a água, especificamente, ocorre apresentação das espécies de
31 forma mais convergente. As espécies dos parasitas encontradas estão associadas de
32 forma proporcional a densidade da espécie-específica de seu hospedeiro. Por conta
33 disso, as espécies dos protozoários encontradas com maior frequência são as
34 zoonóticas, seguidas por espécies que afetam o ser humano e especificamente

1 animais domésticos (DURIGAN et al., 2014; DANIELS et al., 2015; TOLEDO et al.,
2 2017). Em ambiente urbano, há presença dos assembleges A, B, C, D e E de *G.*
3 *duodenalis* na água; nos humanos, predomínio dos assembleges A e B e em animais
4 domésticos, todos os citados, com maior frequência dos assembleges zoonóticos A e
5 B (DURIGAN et al., 2014; DANIELS et al., 2015).

6 As detecções realizadas em amostras ambientais expressam o que
7 ocorre na população de FIs presentes no espaço em comum. A contaminação do
8 ambiente ocasionada por fezes de hospedeiros com esses parasitas é direta e
9 convergente, em sentido agregador, o que aumenta a possibilidade de transmissões
10 maciças. Nesse sentido, a questão do quanto esse ambiente contaminado irá refletir
11 na situação de saúde de hospedeiros susceptíveis necessita ser melhor
12 compreendida.

13

14 2.2.4 Influência do Ambiente para Hospedeiros Susceptíveis

15 Os hospedeiros que apresentam maior susceptibilidade a infecções
16 são indivíduos jovens, em idade de imaturidade imunológica, indivíduos com quadro
17 de doença imunossupressora ou crônica e, indivíduos idosos. No entanto, todos os
18 animais e humanos podem ser acometidos e apresentarem sinais clínicos, isso vai
19 depender: da virulência da cepa; de fatores ambientais, como o grau de
20 contaminação; do nível de desafio ao hospedeiros e do potencial imunológico do
21 indivíduo de debelar a infecção (THOMPSON; ASH, 2016). O fato da dose infectante
22 ser baixa para ambos os protozoários favorece a infecção em muitos hospedeiros
23 (FAYER, 2004; FENG; XIAO, 2011).

24 O grau e a origem de contaminação ambiental têm influência direta no
25 risco de infecção aos hospedeiros susceptíveis. A fase ambiental dos protozoários é
26 seu mecanismo de dispersão e persistência. Entre as vias de transmissão indiretas
27 relacionadas ao ambiente podem-se citar o alimento e a água como as de maior
28 casuística (THOMPSON; ASH, 2016).

29 Alimentos que apresentam sua superfície contaminada com (oo)cistos
30 e são ingeridos crus tem potencial de transmitir os parasitas para os hospedeiros.
31 Esses alimentos são frutas e verduras folhosas em sua maioria, com um apontamento
32 atual para a relevância de moluscos aquáticos nessa transmissão. Para prevenção da
33 transmissão por frutas e hortaliças, a remoção mecânica desses protozoários da

1 superfície é a única forma não prejudicial ao alimento e ao consumidor, de eliminar os
2 (oo)cistos (THOMPSON; SMITH, 2011; KOOH et al., 2020).

3 Por conta da dificuldade de remoção mecânica adequada, as
4 verduras folhosas são alimentos estudados quanto a risco de transmissão. Descrições
5 de cistos de *Giardia* são mais frequentes que *Cryptosporidium*, e apresentam os
6 assemblages A e B de *G. duodenalis*. A água de irrigação contaminada é a fonte de
7 contaminação mais provável para os alimentos (THOMPSON; SMITH, 2011; KIRK et
8 al., 2015). Um estudo que considerou o uso de água de superfície contaminada com
9 efluente de esgoto registrou maior risco das pessoas contraírem *Cryptosporidium* e
10 *Giardia* por meio de água de irrigação quando comparado a água de recreação, o que
11 está relacionada a ingestão de verduras (XIAO et al., 2018).

12 Água contaminada com (oo)cistos viáveis tem potencial de transmitir
13 os protozoários para os hospedeiros susceptíveis. As fontes de água de consumo são
14 comumente: águas superficiais, como rios e lagos; águas de minas, que são águas
15 subterrâneas que apresentam contato com a superfície e águas subterrâneas que são
16 alcançadas pela perfuração de poços. Em todas essas fontes os protozoários foram
17 detectados, indicando o risco de transmissão de (oo)cistos por todos os tipos de fonte
18 de água de potável (GAUT et al., 2008; DANIELS et al., 2015; MURPHY et al., 2017;
19 TOLEDO et al., 2017). Uma questão relevante para avaliar o risco de transmissão é a
20 qualidade dessa fonte de água. Águas com tratamento terciário, por filtração em
21 membrana, apresentam fator de proteção (*Odds Ratio*: 0,77; IC: 0,64 – 0,84) a
22 transmissão dos parasitas para os indivíduos em detrimento de fontes de menor nível
23 de tratamento (LAKE et al., 2007)

24 A remoção efetiva desses protozoários da água pode ocorrer por
25 ultrafiltração e a inativação, por técnicas de esterilização como radiação ultravioleta,
26 ou técnicas mais simples, mas pouco práticas, como a fervura. A dificuldade de
27 executar essas técnicas na escala de tratamento individual e coletivo fazem as
28 medidas que previnem contaminação da água por *Cryptosporidium* e *Giardia* serem
29 as de maior aplicação para garantir a segurança e a qualidade da água (KARANIS;
30 KOURENTI; SMITH, 2007).

31 A origem da contaminação da água pode vir do esgoto doméstico
32 (afluente ou efluente); do escoamento de fezes de animais de produção para
33 mananciais e da contaminação direta por defecação ou esgoto a céu aberto (BUDU-
34 AMOAKO et al., 2012; XIAO et al., 2018). A contaminação dos alimentos pode ocorrer

1 pelo uso de águas de irrigação contaminadas com (oo)cistos; pelo escoamento de
2 fezes que contenham os parasitas para as plantações; pela defecação direta e pelo
3 contato desses com superfícies que contém os protozoários (COLLI et al., 2015; TIYO
4 et al., 2015).

5 Levando em consideração as origens de contaminação para água, a
6 contaminação direta por defecação tem comportamento pontual, conseqüentemente
7 é geralmente associada a um evento único, no qual alguns dos hospedeiros
8 envolvidos com uma fonte de infecção irão manifestar doença ao mesmo tempo, por
9 terem mesmo período de incubação (RYAN; LAWLER; REID, 2017). Essa
10 manifestação súbita de diarreia intensifica a atenção, facilitando o diagnóstico e
11 notificação.

12 A contaminação por escoamento de fezes pode variar quanto a carga
13 parasitária eliminada para o ambiente. Características ambientais (e.g. baixo
14 crescimento vegetativo e ausência de mata ciliar) e características da população (e.g.
15 estação de nascimento de animais domésticos) podem aumentar o nível de
16 contaminação de um corpo hídrico. Todavia, em situação oposta, os níveis de
17 contaminação diminuem (WINKWORTH; MATTHAEI; TOWNSEND, 2010). Esse
18 comportamento provavelmente acarreta uma transmissão intermitente, com picos de
19 animais sintomáticos o que proporciona notificação, mesmo que inferior ao número
20 real de casos.

21 No caso do esgoto, por se tratar de um local de convergência de
22 excrementos, há presença constante dos parasitas. Por consequência, quando há
23 contaminação do ambiente, ela provavelmente ocorre de forma constante, com
24 característica endêmica (MARTINS et al., 2019). Essa característica não geraria
25 atenção ao protozoário como diagnóstico diferencial, acarretando subdiagnóstico e
26 subnotificação (ROBERTSON; HERMANSEN; GJERDE, 2006). Nesse contexto, o
27 papel do efluente do esgoto na cadeia de transmissão é pouco compreendido, sendo
28 o papel do esgoto sem tratamento, comprovadamente prejudicial à saúde do ambiente
29 e dos hospedeiros (WHO, 2006).

31 2.3 ESGOTO COMO RESERVATÓRIO AMBIENTAL DE *CRYPTOSPORIDIUM* E *GIARDIA*

32
33 O esgoto doméstico é o destino de excrementos fecais de indivíduos
34 que residem em um mesmo ambiente. No caso do esgoto urbano, os humanos são

1 os principais fornecedores de material fecal. No mundo, estima-se que 31% da
2 população humana tem seus excrementos recolhidos para tratamento (WHO, 2019).
3 No Brasil, esse percentual é de 43% (BRASIL, 2017). Isso significa que as fezes de
4 cerca de 2,4 bilhões de pessoas em todo mundo convergem em esgoto doméstico,
5 que serão tratadas, ou não, e lançadas em uma fonte de água.

6 Considerando que a maior parte da população do mundo e do Brasil
7 está sujeita a péssimas condições de saneamento, muitos seres humanos estão
8 expostos aos prejuízos causadas por baixas condições sanitárias. Esses prejuízos a
9 saúde incluem: aumento de doenças de transmissão fecal-oral; aumento de doenças
10 vetoriais; aumento de doenças acarretadas por má-nutrição e aumento de transtornos
11 psicológicos, como ansiedade. Além dos prejuízos diretos a saúde, prejuízos sociais
12 e econômicos são relacionados a pobreza, ao baixo rendimento escolar e a baixa
13 produtividade (WHO, 2018). Para reverter esse cenário, ampliação da coleta e
14 tratamento efetivo do esgoto são necessários.

15 Mesmo os seres humanos sendo os principais abastecedores do
16 esgoto com fezes e urina, os animais também possuem sua participação. Animais
17 domésticos como cães e gatos podem ter seus dejetos despejados em vasos
18 sanitários. Animais sinantrópicos, como ratos e pombos, que tenham acesso ao
19 esgoto em algum ponto entre a coleta e recepção, são possíveis abastecedores. Por
20 conta disso, a variedade de patógenos que podem compor o esgoto é alta, no entanto,
21 pouco compreendida (ZAHEDI et al., 2019).

22 A composição variável do esgoto se intensifica pela informação
23 imprecisa sobre as fontes que o abastecem e sobre a situação das tubulações
24 condutoras. O esgoto sanitário é definido como o conjunto das águas residuais de
25 atividades domésticas, as quais provém de resíduos de cozinha, lavanderia e
26 banheiro. Relacionando a composição do esgoto com sua definição, tem-se na
27 legislação que quaisquer águas residuais que excedam os valores de Demanda
28 Bioquímica de Oxigênio (DBO) ou Demanda Química de Oxigênio (DQO) não devem
29 compor o esgoto doméstico. Essa determinação ocorre pela necessidade de
30 estabelecimento do tratamento adequado do esgoto para que um nível seguro seja
31 atingido para a água de reuso, tanto em relação ao ambiente quanto ao organismos
32 vivos (KATES; KNAPP; KEENAN, 2014; BRASIL, 2020).

33 O tratamento requerido para esgoto doméstico considera sua
34 composição e as exigências do corpo hídrico receptor quanto a autodepuração, para

1 que a água de reuso produzida seja segura para o ambiente. Por conta disso, despejo
2 clandestinos de origem industrial, agroindustrial ou comercial, por exemplo, podem
3 saturar a capacidade de depuração da estação de tratamento. Essa saturação pode:
4 inviabilizar a remoção de componentes depuráveis (e.g. microrganismos) ou agregar
5 componentes não depuráveis (e.g. metais pesados e princípios ativos), que serão
6 despejados em um corpo hídrico o qual terá sua saúde e dos indivíduos relacionados
7 prejudicada (BRASIL, 2005; KATES; KNAPP; KEENAN, 2014; DE MEDEIROS et al.,
8 2017; JIANG et al., 2020).

9 Mesmo com o baixo conhecimento sobre a composição do esgoto
10 doméstico, *Cryptosporidium* e *Giardia* são relatados em altas frequências entre as
11 coletas, indicando uma presença constante (THOMPSON; ASH, 2016). A
12 quantificação dos (oo)cistos é menos descrita, mas apresenta grande variação,
13 dependente de características da população que abastece esse esgoto. Mas é fato
14 que quanto maior o adensamento de pessoas e animais com altas prevalências, maior
15 vai ser a quantidade encontrada. No afluente do esgoto a concentração de (oo)cistos
16 de *Cryptosporidium* variam de 0 a 6.000 oocistos/L e de *Giardia* de 120 a 10.000
17 cistos/L. No efluente, as concentrações de *Cryptosporidium* variam de 0 a 70
18 oocistos/L e de *Giardia* de 0 a 1.000 cistos/L (SANTOS et al., 2011; TONANI et al.,
19 2013; RAMO et al., 2017).

20 As espécies dos protozoários esperadas de encontrar com maior
21 frequência no esgoto são as que acometem humanos. De acordo com a possível
22 representatividade dos abastecedores do esgoto, *C. hominis* e *C. parvum* seriam as
23 mais encontradas, seguidas por *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. felis* e menos
24 esperadas *C. ubiquitum* e *C. cuniculus*. As espécies menos esperadas para
25 *Cryptosporidium* estão relacionadas a hospedeiros menos abundantes em meio
26 urbano (RYAN; ZAHEDI; PAPARINI, 2016). No caso de *Giardia*, a espécie *G.*
27 *duodenalis* é a mais esperada por ser a que infecta mamíferos e a única que parasita
28 humanos (RYAN; CACCIÒ, 2013).

29 Entretanto, variações nos relatos de espécies de *Cryptosporidium* no
30 esgoto são observados. *Giardia* não apresenta variações, sendo *G. duodenalis* a
31 única espécie do gênero verificada. Os *assemblages* A e B são os mais descritos em
32 todo o mundo. O *assemblage* predominante é o AII, observado em humanos, todavia
33 tipos zoonóticos e antropozoonóticos estão presentes com frequência intermediária a
34 baixa, expressos principalmente no *assemblage* B (LIU et al., 2011; AYED et al., 2012;

1 MA et al., 2016; ULLOA-STANOJLOVIĆ et al., 2016). Para *Cryptosporidium* alta
2 variação entre as espécies foi detectada dentre diferentes regiões do planeta. Dentre
3 as espécies, as frequentemente encontradas são *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*
4 e *C. parvum*. No entanto, outras espécies, como *C. andersoni* foram verificadas com
5 alta frequência no nordeste da China e Tunísia em esgoto doméstico, assim como *C.*
6 *cuniculus* no Brasil (LIU et al., 2011; AYED et al., 2012; LI et al., 2012; ULLOA-
7 STANOJLOVIĆ et al., 2016; MARTINS et al., 2019; ZAHEDI et al., 2019).

8 Apesar de *Giardia* ter menor variabilidade de espécies quando
9 comparado a *Cryptosporidium*, o gênero apresenta maior frequência em esgoto,
10 variando de 28% a 100% em todo o mundo, enquanto a de *Cryptosporidium* varia de
11 13% a 84% (AYED et al., 2012; LI et al., 2012; ULLOA-STANOJLOVIĆ et al., 2016;
12 MARTINS et al., 2019). Essa característica divergente entre os protozoários corrobora
13 com as maiores prevalências de *Giardia* e com o comportamento espécie-específico
14 de *Cryptosporidium* (THOMPSON; ASH, 2016). A variação de espécie permite estimar
15 quais os hospedeiros mais prováveis de estarem eliminando os oocistos e estimar as
16 espécies do protozoário mais prevalentes dentro da população que abastece esse
17 esgoto (ZAHEDI et al., 2019).

18 Como há alta frequência e quantidade de (oo)cistos dos parasitas no
19 esgoto, há preocupação quanto a viabilidade desses protozoários após o tratamento.
20 O tratamento de esgoto mais empregado no Brasil para redução da DBO é lagoa
21 anaeróbia (13% das ETEs) seguido por reator anaeróbio (12% das ETEs). Para
22 ambos, a redução de DBO é de cerca de 69%. Considerando que DBO é indicador de
23 carga de matéria orgânica no sistema, incluindo microorganismos, grande porcentagem
24 de seres vivos permanece no esgoto após os tratamentos (BRASIL, 2017).

25 *Cryptosporidium* e *Giardia* podem ser removidos por lagoa de
26 estabilização, no entanto, para que o processo seja efetivo, são demandados 20 dias
27 de retenção do esgoto, o que é inviável para se aplicar em um tratamento. Métodos
28 de tratamento anaeróbio são comprovadamente menos eficazes para remoção
29 quando comparados a métodos aeróbios, no entanto, estes métodos são menos
30 usados por demandarem maior investimento. Mesmo nos tratamentos aeróbios, há
31 grande variabilidade de taxa de redução, por conta da variabilidade nos componentes
32 orgânicos e inorgânicos do esgoto (CHAURET; SPRINGTHORPE; SATTAR, 1999;
33 ROBERTSON; HERMANSEN; GJERDE, 2006). Os tratamentos terciários como
34 ultrafiltração e radiação ultravioleta são eficazes para a remoção dos protozoários,

1 todavia, são inviáveis para implantação em grande escala por conta do alto custo
2 financeiro (NASSER, 2016). Deste modo, a viabilidade dos parasitas no efluente
3 permanece incerta em muitos casos.

4 Poucos resultados apresentam verificação da viabilidade dos
5 (oo)cistos. Essa análise é importante para certificar se há contaminação do corpo
6 hídrico com parasitas viáveis de forma que possa causar risco a saúde humana e
7 animal. Estudos realizados detectaram formas viáveis do parasita (ROBERTSON;
8 HERMANSEN; GJERDE, 2006; NASSER, 2016). Comumente, a viabilidade é
9 verificada por Imunofluorescência Direta associada ao DAPI (4',6-diamidino-2-
10 phenylindole), que é uma técnica menos específica que as moleculares. RT-qPCR e
11 PMA-qPCR por exemplo, podem quantificar parasitas viáveis e definir espécies com
12 o uso de porções específicas do gene ou por sequenciamento (JENKINS et al., 2010;
13 ALONSO; AMORÓS; GUY, 2014).

14 Um estudo verificou maior margem de segurança alimentar com uso
15 de água de reuso proveniente de esgoto pós tratamento se comparada a esgoto sem
16 tratamento (DOMENECH et al., 2018). No entanto, existem muitas variações na
17 eficiência desse tratamento, por conta de características ambientais, do próprio
18 tratamento empregado e da população que elimina excrementos para o esgoto
19 (NASSER, 2016). Dessa forma, a análise de viabilidade é importante para entender a
20 eficiência prática do tratamento e para estabelecer medidas preventivas que evitem
21 risco de infecção de hospedeiros via água.

22 23 2.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO: USO, LIMITAÇÕES E DISPONIBILIDADE

24
25 Os métodos diagnósticos disponíveis para a detecção de
26 *Cryptosporidium* e *Giardia* se baseiam em técnicas de: microscopia; imunodiagnóstico
27 (e.g. diagnóstico imunológico, imunocromatográfico e imunoenzimático); cultura
28 celular; citometria de fluxo e diagnóstico molecular. Todos esses métodos são
29 utilizados para verificação dos parasitas, no entanto, não são todos que estão
30 disponíveis em todas as regiões do mundo como ferramenta de detecção (SOARES;
31 TASCA, 2016; ADEYEMO et al., 2018; KHURANA; CHAUDHARY, 2018).

32 A maior parte das técnicas de microscopia basicamente requerem um
33 microscópio óptico, lâmina e um técnico treinado para realizar a leitura. A resposta
34 que se pode obter é a detecção do gênero de forma qualitativa e, em alguns casos,

1 quantitativa. De forma simples, a informação sobre a presença ou não dos parasitas
2 é gerada. Por ser simples e identificar presença dos protozoários, essa técnica é
3 comumente utilizada em todo o mundo para diagnóstico nas fezes dos hospedeiros
4 (SOARES; TASCA, 2016; ADEYEMO et al., 2018).

5 A disponibilidade dos métodos microscópicos em todas as regiões do
6 mundo garante a possibilidade de diagnóstico. Todavia, o subdiagnóstico ainda ocorre
7 por: falta de conhecimento técnico para a leitura das lâminas, principalmente nos
8 países de baixo nível socioeconômico; negligência médica na investigação de
9 afecções gastrointestinais e a baixa sensibilidade dos métodos (RYAN; ZAHEDI;
10 PAPANINI, 2016; BEER et al., 2017).

11 Com o objetivo de aumentar a sensibilidade, técnicas de
12 concentração e purificação são utilizadas. Há técnicas de centrifugação; centrifugo-
13 flutuação (e.g. flutuação em solução de sacarose, flutuação em solução de sulfato de
14 magnésio, Allen, Ridley formol-éter e flutuação em solução salina) e técnica de
15 separação imunomagnética (IMS) (SOARES; TASCA, 2016; KHURANA;
16 CHAUDHARY, 2018). Contudo, essas técnicas demandam equipamentos para serem
17 realizadas, e no caso de IMS investimento financeiro relevante (UNITED STATES OF
18 AMERICA, 2012). Assim, a aplicação dessas técnicas é limitada aos locais que
19 possuem mão de obra qualificada, equipamentos e recursos financeiros para
20 execução, mantendo-se o subdiagnóstico nas regiões que não os possuem.

21 Os métodos de imunodiagnóstico apresentam alta variabilidade
22 quanto aos equipamentos e nível de conhecimento requeridos para a execução de
23 suas técnicas. Os ensaios imunocromatográficos tem boa reprodutibilidade, por
24 requererem apenas a placa já fixada com anticorpos para a detecção qualitativa a
25 nível de gênero. No caso deste, as limitações para sua aplicação estão relacionadas
26 ao recurso financeiro para compra dos testes comerciais, que são mais custosos que
27 a microscopia, e a moderada especificidade gerada pela possibilidade de reações
28 cruzadas (BEER et al., 2017; KHURANA; CHAUDHARY, 2018).

29 Os ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA (Enzyme Linked
30 Immunosorbent Assay), requerem mais investimento com equipamentos e estrutura,
31 no entanto, possibilitam mais resultados em menos tempo. Com esta técnica,
32 detecções qualitativas e semiquantitativas são geradas, assim como pressupor tempo
33 de infecção, quando se trata de pesquisa de anticorpos. Todavia, esses ensaios são
34 flexíveis quanto a adaptação de protocolos, o que gera variabilidade no nível de

1 sensibilidade e especificidade (RYAN; ZAHEDI; PAPANINI, 2016; SOARES; TASCA,
2 2016). Mesmo os custos iniciais sendo diluídos a longo prazo, pelo potencial de
3 análise de várias amostras ao mesmo tempo, a variação de sensibilidade e
4 especificidade tal como a baixa reprodutibilidade limitam o uso do método na rotina
5 (RYAN; ZAHEDI; PAPANINI, 2016; SQUIRE; RYAN, 2017).

6 Os ensaios imunológicos, como imunofluorescência direta (RID), são
7 de fácil execução e leitura, se comparado à microscopia. No entanto, são custosos
8 quanto a compra de equipamentos, como microscópio de epi-fluorescência, e kits
9 comerciais para realização dos testes. Esse método associado a filtração e IMS são
10 considerados padrão ouro para a pesquisa dos protozoários em água (UNITED
11 STATES OF AMERICA, 2012). Por apresentarem sensibilidade e especificidade que
12 se aproximam de 100%, em muitos kits de RID a associação dessas técnicas é
13 recomendada para a pesquisa dos protozoários também em amostras ambientais, em
14 detrimento dos métodos microscópicos e imunocromatográficos/imunoenzimáticos
15 (ADEYEMO et al., 2018). Contudo, o investimento financeiro com os kits e
16 equipamentos, e, o conhecimento técnico para a execução das técnicas, fazem com
17 que ela esteja disponível no diagnóstico de rotina de países desenvolvidos e, em
18 países em desenvolvimento, apenas no âmbito da pesquisa (SQUIRE; RYAN, 2017).

19 O cultivo celular de ambos os protozoários é extremamente
20 dispendioso e trabalhoso. Para *Cryptosporidium*, é necessário o estabelecimento de
21 esporozoítos em células de primeira linhagem de adenocarcinoma ileocecal de
22 humanos (HCT-8) (WOODS; NESTERENKO; UPTON, 1995). Para *Giardia*, os
23 reagentes que compõem o meio de cultura variam de acordo com a região e cepa do
24 parasita. O cultivo celular permite detectar o parasita em baixa carga na amostra, além
25 da obtenção de taxa de infectividade e isolamento. Todavia, as amostras precisam
26 estar concentradas e purificadas, exigindo a associação de outras técnicas (TYSNES;
27 ROBERTSON, 2016; KHURANA; CHAUDHARY, 2018). Devido aos custos,
28 dificuldade de estabelecimento do cultivo e exigência de conhecimento técnico,
29 mesmo em países desenvolvidos o método não está disponível em todos os grupos
30 de pesquisa (RYAN; ZAHEDI; PAPANINI, 2016; ADEYEMO et al., 2018; KHURANA;
31 CHAUDHARY, 2018).

32 A citometria de fluxo é um método alternativo ao cultivo celular. A
33 técnica permite a quantificação e classificação de (oo)cistos de acordo com seu
34 gênero. Por meio de separação mediada por marcadores imunofluorescentes ou

1 cromógenos a purificação da amostra pode ser realizada, tal como ensaio de
2 viabilidade. O cultivo celular permite a identificação de infectividade e o isolamento,
3 no entanto, a citometria de fluxo apresenta maior reprodutibilidade. Ainda é uma
4 técnica onerosa e com alta exigência de conhecimento técnico, contudo, mais
5 acessível que cultivo para grupos de pesquisa que desejam realizar verificações de
6 viabilidade, tanto em hospedeiros quanto em amostras ambientais (ADEYEMO et al.,
7 2018; ROUSSEAU et al., 2018). Por ser uma técnica com princípio de identificação
8 em comprimento de onda específico emitido por algum componente presente em
9 solução, exige a purificação das amostras para evitar confundimento, fato que
10 desfavorece sua ampla aplicação (KESERUE; FÜCHSLIN; EGLI, 2011).

11 Os métodos de diagnósticos moleculares estão se distribuindo e
12 sendo replicados em países em desenvolvimento. Hoje, a utilização de análises
13 moleculares pode proporcionar: a detecção do gênero do parasita de forma
14 qualitativa (e.g. PCR, *n*PCR) e quantitativa (e.g. *q*PCR); quantificação de formas
15 viáveis (e.g. *q*RT-PCR, PMA-*q*PCR, FISH); identificação de espécies (e.g. PCR-RFLP,
16 LAMP) e genotipagem (e.g. sequenciamento). As técnicas apresentam alta
17 sensibilidade e especificidade, no entanto, elas variam de acordo com fatores
18 intrínsecos a técnica, como especificidade de *primers*, e, extrínsecos, como a
19 presença de inibidores na amostra (SOARES; TASCA, 2016; ADEYEMO et al., 2018;
20 KHURANA; CHAUDHARY, 2018). Os fatores intrínsecos podem ser controlados,
21 todavia, os extrínsecos não. A purificação das amostras previamente as análises
22 moleculares é usada para reduzir flutuações na acurácia dos testes (RADSTROM et
23 al., 2008).

24 Mesmo sendo necessário investimento em equipamentos, estrutura e
25 conhecimento técnico, os métodos moleculares vêm sendo utilizados para
26 verificações mais acuradas dos parasitas em países em desenvolvimento. No Brasil,
27 técnicas mais estabelecidas como *n*PCR, PCR-RFLP e sequenciamento são
28 utilizadas por alguns grupos de pesquisa (ASSIS et al., 2013; TOLEDO et al., 2017).
29 Todavia, técnicas mais dispendiosas como *q*PCR, *q*RT-PCR e PMA-*q*PCR são pouco
30 utilizadas (NAKADA, 2018) e técnicas modernas como FISH e LAMP não são
31 utilizadas.

32 As barreiras socioeconômicas que restringem a execução de técnicas
33 mais modernas e acuradas em regiões menos desenvolvidas geram um viés nos
34 dados epidemiológicos da criptosporidiose e giardíase. Mesmo em países

1 desenvolvidos, há subdiagnóstico e consequente subnotificação (BEER et al., 2017).
2 No caso desses países, a principal causa é a negligência médica, nos quais estima-
3 se que menos de 10% dos pacientes atendidos com quadro diarreico passam por
4 diagnóstico (RYAN; LAWLER; REID, 2017). Provavelmente, em países menos
5 desenvolvidos, com menor disponibilidade de testes e conhecimento técnico, a
6 ocorrência de subdiagnóstico seja maior.

7 A adaptação de técnicas de concentração e purificação, assim como,
8 técnicas de detecção se fazem necessárias para que as pesquisas em países em
9 desenvolvimento possam ser realizadas rotineiramente por grupos dos próprios
10 países, os quais possuem maior conhecimento de características epidemiológicas
11 regionais. Dessa forma, informações quanto a prevalência, espécies e genótipos dos
12 parasitas seriam melhor conhecidas e seria possível saber o quanto a população está
13 afetada e o quanto esses hospedeiros vão afetar o ambiente. A importância desse
14 conhecimento se expressa em medidas eficazes de prevenção e controle dessas
15 doenças para evitar perdas socioambientais e socioeconômicas (RYAN; ZAHEDI;
16 PAPANINI, 2016; SQUIRE; RYAN, 2017).

17 A associação de técnicas de microscopia a técnicas de biologia
18 molecular pode ser uma alternativa viável para execução de pesquisas nessas regiões
19 de menor nível socioeconômico. A utilização de microscopia para definição inicial de
20 presença dos parasitas aliada a purificação das amostras para posterior pesquisa
21 molecular em amostras positivas, pode baratear os custos e trazer respostas mais
22 específicas que melhorem a compreensão da epidemiologia (SOARES; TASCA,
23 2016). Para acesso de viabilidade, principalmente em amostras ambientais, PMA-
24 qPCR pode ser uma alternativa menos onerosa e mais viável quando associada a
25 concentração e purificação prévia, se comparada a técnicas mais dispendiosas como
26 citometria de fluxo e qRT-PCR.

27

28 2.4.1 Propídio-monoazida PCR para detecção de viabilidade

29 Propídio-monoazida (PMA) é um corante não seletivo de
30 característica impermeável a membranas celulares, o que o faz ser impermeável a
31 células de membranas intactas. Uma vez dentro de uma célula, o corante se liga ao
32 DNA de forma não permanente. Quando a molécula é excitada por forte luz visível (λ
33 = 530 nm) ela forma ligação covalente com o DNA, gerando uma ligação permanente.
34 Com essa ligação, as moléculas de DNA são modificadas e a reação enzimática de

1 replicação é impossibilitada. Essa impermeabilidade a células de membrana intacta e
2 a ligação permanente ao DNA permitem com que técnicas de coloração com PMA
3 associadas a análises moleculares sejam utilizadas para a detecção de células viáveis
4 (BIOTIUM, 2014).

5 A técnica de PMA-PCR começou a ser usada recentemente para
6 detecção de protozoários como alternativa a técnicas de *Reverse Transcriptase*-PCR,
7 por exemplo, o que a coloca em período de experimentação (LIANG; KEELEY, 2012).
8 Nesse período, suas limitações e vantagens são apontadas e verificadas. Quanto as
9 principais limitações têm-se: (i) a ausência de seletividade a tipos celulares, o que
10 pode gerar o consumo do corante antes de atingir o tipo celular alvo; (ii) a
11 impossibilidade de aplicação a amostras de alta turbidez, por essas impedirem a
12 penetração de luz; (iii) a avaliação de viabilidade por meio da integridade da
13 membrana celular, já que é impermeável. As vantagens do uso dessa técnica estão
14 associadas a maior sensibilidade de detecção, gerada por seu princípio de verificação
15 da viabilidade, baseado na integridade de membrana celular; e maior amplitude de
16 aplicação a estudos, por não ser seletivo a células específicas (LIANG; KEELEY,
17 2012; ALONSO; AMORÓS; GUY, 2014; TAYLOR; BENTHAM; ROSS, 2014).

18 Essas limitações podem gerar erros no diagnóstico de viabilidade tais
19 como: superestimação de viabilidade, quando há presença de células inviáveis de
20 membrana intacta; e subestimação de viabilidade de células alvo, quando há alta
21 turbidez ou grande abundância de outros tipos celulares de membrana danificada
22 (LIANG; KEELEY, 2012; MA et al., 2016). Para evitar esses erros, procedimentos que
23 promovam a limpeza da amostra e seletividade as células alvo são essenciais e
24 podem permitir que ela seja usada em detecções de viabilidade, considerando suas
25 vantagens quanto a sensibilidade e baixo custo da técnica.

26
27

3 REFERÊNCIAS

- ADEYEMO, F. E. et al. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. **Acta Tropica**, v. 184, n. February, p. 15–28, ago. 2018.
- ALONSO, J. L.; AMORÓS, I.; GUY, R. A. Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. **Parasitology Research**, v. 113, n. 7, p. 2671–2678, 2014.
- ALVAREZ-PELLITERO, P. et al. *Cryptosporidium scopthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 62, n. 1–2, p. 133–145, 2004.
- ASSIS, D. C. et al. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 3, p. 149–154, jun. 2013.
- AYED, L. B. et al. Survey and genetic characterization of wastewater in Tunisia for *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Cyclospora cayetanensis* and *Eimeria* spp. **Journal of Water and Health**, v. 10, n. 3, p. 431–444, 2012.
- BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6603–6614, dez. 2011.
- BAQUE, R. H. et al. A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters. **Water Research**, v. 45, n. 10, p. 3175–3184, 2011.
- BEER, K. D. et al. Giardiasis Diagnosis and Treatment Practices Among Commercially Insured Persons in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 9, p. 1244–1250, 1 maio 2017.
- BELOSEVIC, M. et al. Observations on natural and experimental infections with *Giardia* isolated from cats. **Canadian journal of comparative medicine and veterinary science**, v. 48, n. 3, p. 241–244, 1984.
- BERRILLI, F. et al. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Côte d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 3, p. 191–195, mar. 2012.
- BERTRAND, I.; SCHWARTZBROD, J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis*

- 1 in wastewater: Relation between assemblages and faecal contamination origin. **Water**
2 **Research**, v. 41, n. 16, p. 3675–3682, 2007.
- 3 BIOTIUM. **Cell Viability and Cell Death**. Disponível em: <[https://biotium.com/wp-](https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/Cell-Viability-and-Cell-Death.pdf)
4 [content/uploads/2013/07/Cell-Viability-and-Cell-Death.pdf](https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/Cell-Viability-and-Cell-Death.pdf)>. Acesso em: 2 jun. 2019.
- 5 BOLLAND, S. J. et al. *Cryptosporidium bollandi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae)
6 from angelfish (*Pterophyllum scalare*) and Oscar fish (*Astronotus ocellatus*).
7 **Experimental Parasitology**, v. 217, n. March, p. 107956, out. 2020.
- 8 BRASIL. **Resolução CONAMA N° 357 de 17 De Março De 2005 Conselho Nacional**
9 **do Meio Ambiente** Brasil, 2005.
- 10 BRASIL. **Atlas Esgotos - Despoluição de bacias hidrográficas**. Brasília, Brasil:
11 [s.n.].
- 12 BRASIL. **Lei nº6 14.026 de 15 de julho de 2020**, 2020.
- 13 BUDU-AMOAKO, E. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* on beef farms
14 and water sources within the vicinity of the farms on Prince Edward Island, Canada.
15 **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 1–9, fev. 2012.
- 16 CANO, L. et al. Identification and genotyping of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp.
17 isolates in aquatic birds in the Salburua wetlands, Álava, Northern Spain. **Veterinary**
18 **Parasitology**, v. 221, p. 144–148, 2016.
- 19 CAVALIER-SMITH, T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of
20 gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa.
21 **European Journal of Protistology**, v. 50, n. 5, p. 472–495, 2014.
- 22 CERTAD, G. et al. Identification of *Cryptosporidium* Species in Fish from Lake Geneva
23 (Lac Lemán) in France. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, jul. 2015.
- 24 CHAGAS, C. F. R. et al. *Giardia* spp ., ten years of parasitological data in the biggest
25 zoo of Latin America. **Annals of Parasitology**, v. 65, n. April, p. 35–51, 2019.
- 26 CHAURET, C.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Fate of *Cryptosporidium* oocysts,
27 *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic
28 sludge digestion. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 257–262, 1999.
- 29 COLLI, C. M. et al. Food handlers as a link in the chain of transmission of *Giardia*
30 *duodenalis* and other protozoa in public schools in southern Brazil. **Transactions of**
31 **The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 9, p. 601–603, set.
32 2015.
- 33 ČONDLOVÁ, Š. et al. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp.
34 n. (Apicomplexa: Cryptosporididae) in Apodemus spp. **European Journal of**

- 1 **Protistology**, v. 63, p. 1–12, abr. 2018.
- 2 DA CUNHA, M. J. R.; CURY, M. C.; SANTÍN, M. Molecular identification of
3 *Enterocytozoon bieneusi*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Brazilian captive birds.
4 **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 487–493, 4 fev. 2017.
- 5 DA CUNHA, M. J. R.; CURY, M. C.; SANTÍN, M. Molecular characterization of
6 *Cryptosporidium* spp. in poultry from Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 118,
7 n. October 2017, p. 331–335, jun. 2018.
- 8 DANIELS, M. E. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* in humans, domestic animals, and
9 village water sources in rural India. **American Journal of Tropical Medicine and**
10 **Hygiene**, v. 93, n. 3, p. 596–600, 2015.
- 11 DE MEDEIROS, G. A. et al. Water quality, pollutant loads, and multivariate analysis of
12 the effects of sewage discharges into urban streams of Southeast Brazil. **Energy,**
13 **Ecology and Environment**, v. 2, n. 4, p. 259–276, 28 ago. 2017.
- 14 DOMENECH, E. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* safety margin increase in leafy
15 green vegetables irrigated with treated wastewater. **International Journal of Hygiene**
16 **and Environmental Health**, v. 221, n. 1, p. 112–119, 2018.
- 17 DURIGAN, M. et al. Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus genotyping
18 reveals zoonotic potential between clinical and environmental sources in a
19 metropolitan region of Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014.
- 20 EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Evolution of monitoring for *Giardia*
21 and *Cryptosporidium* in water. **Water Research**, v. 123, p. 96–112, out. 2017.
- 22 FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary**
23 **Parasitology**, v. 126, n. 1–2, p. 37–56, dez. 2004.
- 24 FENG, Y.; RYAN, U. M.; XIAO, L. Genetic Diversity and Population Structure of
25 *Cryptosporidium*. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 11, p. 997–1011, 2018.
- 26 FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species
27 and Giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110–140, 1 jan. 2011.
- 28 FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. **Veterinary**
29 **Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 13–36, 2009.
- 30 GARCIA-R, J. C. et al. Local and global genetic diversity of protozoan parasites:
31 Spatial distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes. **PLoS Neglected**
32 **Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, 2017.
- 33 GAUT, S. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Norwegian
34 groundwater wells in bedrock. **Journal of Water and Health**, v. 6, n. 3, p. 383–388,

- 1 set. 2008.
- 2 GRANDJEAN, A. **Water Requirements, Impinging Factors, and Recommended**
3 **IntakesWorld Health Organization**. Genebra: [s.n.]. Disponível em:
4 <https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/nutwaterrequir.pdf>.
- 5 HELMY, Y. A. et al. Molecular diagnosis and characterization of *Cryptosporidium* spp.
6 in turkeys and chickens in Germany reveals evidence for previously undetected
7 parasite species. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 2017.
- 8 HEYWORTH, M. F. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. **Parasite**, v.
9 23, p. 13, 16 mar. 2016.
- 10 HILLMAN, A. et al. Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda
11 (*Isoodon obesulus*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**,
12 v. 5, n. 1, p. 110–115, 2016.
- 13 HOLUBOVÁ, N. et al. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae)
14 in birds. **Parasitology Research**, v. 115, n. 6, p. 2243–2251, 2016.
- 15 HOLUBOVÁ, N. et al. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa:
16 Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. **European Journal of Protistology**, v. 69,
17 p. 70–87, 2019.
- 18 HOLUBOVÁ, N. et al. Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp.
19 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. **Parasites & Vectors**, v. 13, n.
20 1, p. 340, 8 dez. 2020.
- 21 JENKINS, M. B. et al. Concentrations, viability, and distribution of *Cryptosporidium*
22 genotypes in lagoons of swine facilities in the southern Piedmont and in coastal plain
23 watersheds of Georgia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 17, p.
24 5757–5763, 2010.
- 25 JEŽKOVÁ, J. et al. *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci*
26 Traversa, 2010 and *Cryptosporidium* tortoise genotype III (Apicomplexa:
27 Cryptosporidiidae) in tortoises. **Folia Parasitologica**, v. 63, 2016.
- 28 JEŽKOVÁ, J. et al. *Cryptosporidium ratti* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and
29 genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in the
30 Czech Republic. **Parasitology**, v. 148, n. 1, p. 84–97, 28 jan. 2021.
- 31 JIANG, W. et al. Contribution of hospitals to the occurrence of enteric protists in urban
32 wastewater. **Parasitology Research**, v. 119, n. 9, p. 3033–3040, 4 set. 2020.
- 33 KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan
34 parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and**

- 1 **Health**, v. 5, p. 1–18, 2007.
- 2 KATES, L. N.; KNAPP, C. W.; KEENAN, H. E. Acute and chronic environmental effects
3 of clandestine methamphetamine waste. **Science of The Total Environment**, v. 493,
4 p. 781–788, set. 2014.
- 5 KESERUE, H.-A.; FÜCHSLIN, H. P.; EGLI, T. Rapid Detection and Enumeration of
6 *Giardia lamblia* Cysts in Water Samples by Immunomagnetic Separation and Flow
7 Cytometric Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p.
8 5420–5427, 1 ago. 2011.
- 9 KHAN, A.; SHAIK, J. S.; GRIGG, M. E. Genomics and molecular epidemiology of
10 *Cryptosporidium* species. **Acta Tropica** Elsevier, , 2018. Disponível em:
11 <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.023>>
- 12 KHURANA, S.; CHAUDHARY, P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. **Tropical**
13 **Parasitology**, v. 8, n. 1, p. 2–7, 2018.
- 14 KIRK, M. D. et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional
15 Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A
16 Data Synthesis. **PLOS Medicine**, v. 12, n. 12, p. e1001921, 3 dez. 2015.
- 17 KOOH, P. et al. Microbial Risk Analysis Risk factors for sporadic cryptosporidiosis : A
18 systematic review and meta- analysis. **Microbial Risk Analysis**, n. November 2019,
19 p. 100116, 2020.
- 20 KVÁČ, M. et al. Cryptosporidiosis in Other Vertebrates. In: **Cryptosporidium:**
21 **parasite and disease**. Vienna: Springer Vienna, 2014a. p. 237–323.
- 22 KVÁČ, M. et al. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in
23 hedgehogs. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1–2, p. 9–17, mar. 2014b.
- 24 KVÁČ, M. et al. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae):
25 Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of
26 mammals. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016.
- 27 KVÁČ, M. et al. *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in
28 rats. **European Journal of Protistology**, v. 63, p. 96–104, abr. 2018.
- 29 LAKE, I. R. et al. Case-control study of environmental and social factors influencing
30 cryptosporidiosis. **European Journal of Epidemiology**, v. 22, n. 11, p. 805–811,
31 2007.
- 32 LI, N. et al. Molecular Surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and
33 *Enterocytozoon bieneusi* by Genotyping and Subtyping Parasites in Wastewater.
34 **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, 2012.

- 1 LI, X. et al. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple
2 Spermophilus ground squirrel species. **International Journal for Parasitology:
3 Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 3, p. 343–350, 2015.
- 4 LIANG, Z.; KEELEY, A. Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and
5 reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium*
6 oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. **Water
7 Research**, v. 46, n. 18, p. 5941–5953, 2012.
- 8 LIN, Q. et al. *Cryptosporidium suis* infection in post-weaned and adult pigs in Shaanxi
9 Province, Northwestern China. **Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 1, p. 113–
10 117, 2015.
- 11 LIU, A. et al. Molecular identification and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia*
12 *duodenalis* in raw urban wastewater in Harbin, China. **Parasitology Research**, v. 109,
13 n. 3, p. 913–918, 2011.
- 14 LYU, Z. et al. A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcomastigophora:
15 Hexamitidae) in hamsters. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 202, 20 dez. 2018.
- 16 MA, J. et al. Human infective potential of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and
17 *Enterocytozoon bieneusi* in urban wastewater treatment plant effluents. **Journal of
18 Water and Health**, v. 14, n. 3, p. 411–423, jun. 2016.
- 19 MARTINS, F. D. C. et al. Surveillance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage from
20 an urban area in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2961, p.
21 1–7, 2019.
- 22 MEDEMA, G. et al. **WHO Guidelines for Drinking Water Quality:
23 Cryptosporidium** World Health Organization. Geneva: [s.n.].
- 24 MONIS, P. T.; CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Giardia*: towards a
25 taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 93–100, fev.
26 2009.
- 27 MURPHY, H. M. et al. Review: Epidemiological evidence of groundwater contribution
28 to global enteric disease, 1948–2015. **Hydrogeology Journal**, v. 25, n. 4, p. 981–
29 1001, 18 jun. 2017.
- 30 NAKADA, L. Y. K. **Cistos de *Giardia* spp.: detecção em água bruta de estações de
31 tratamento de água e avaliação de eficiência de desinfetantes químicos por
32 Reação de Imunofluorescência Direta, Propídio Monoazida conjugado com a
33 Reação em Cadeia da Polimerase, e ensaio in vi.** [s.l.] Universidade Estadual de
34 Campinas, 2018.

- 1 NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infections in birds -a review.
2 **Braz. J. Vet. Parasitol. Jaboticabal**, v. 24, n. 3, p. 253–267, 2015.
- 3 NASSER, A. M. Removal of *Cryptosporidium* by wastewater treatment processes: A
4 review. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2016.
- 5 PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and
6 epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene and
7 Environmental Health**, v. 213, n. 5, p. 321–333, 2010.
- 8 RADSTROM, P. et al. Strategies for Overcoming PCR Inhibition. **Cold Spring Harbor
9 Protocols**, v. 2008, n. 4, p. pdb.top20-pdb.top20, 1 mar. 2008.
- 10 RAMO, A. et al. Occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium* and *Giardia* in
11 urban wastewater treatment plants in north-eastern Spain. **Science of the Total
12 Environment**, v. 598, p. 628–638, 2017.
- 13 ROBERTSON, L. J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B. K. Occurrence of
14 *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. **Applied and
15 Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5297–5303, 2006.
- 16 ROUSSEAU, A. et al. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne
17 stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma
18 gondii*: a review of methods. **Parasite**, v. 25, n. 14, p. 14, 19 mar. 2018.
- 19 RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**,
20 v. 124, n. 1, p. 113–120, 2010.
- 21 RYAN, U. et al. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy
22 (*Poecilia reticulata*). **Experimental Parasitology**, v. 150, p. 31–35, 2015.
- 23 RYAN, U. et al. It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications
24 for the water industry? **Water Research**, v. 105, p. 305–313, 2016.
- 25 RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal for
26 Parasitology**, v. 43, n. 12–13, p. 943–956, nov. 2013.
- 27 RYAN, U.; HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research.
28 **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 6, p. 367–373, maio 2015.
- 29 RYAN, U.; LAWLER, S.; REID, S. Limiting swimming pool outbreaks of
30 cryptosporidiosis -the roles of regulations, staff, patrons and research. **Journal of
31 Water and Health**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2017.
- 32 RYAN, U.; ZAHEDI, A.; PAPANINI, A. *Cryptosporidium* in humans and animals-a one
33 health approach to prophylaxis. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 9, p. 535–547, set.
34 2016.

- 1 SANTANA, B. N. et al. Detection and characterization of *Cryptosporidium* species and
2 genotypes in three chicken production systems in Brazil using different molecular
3 diagnosis protocols. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 151, n. September 2017, p.
4 73–78, mar. 2018.
- 5 SANTOS, L. U. DOS et al. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de
6 *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos.
7 **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 115–120, jun. 2011.
- 8 SEVÁ, A. DA P. et al. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium*
9 spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest
10 fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista**
11 **Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 249–253, 2012.
- 12 ŠLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans:
13 A thirty colour rainbow? **International Journal for Parasitology**, nov. 2013.
14 Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751913002026>>.
15 Acesso em: 1 nov. 2017
- 16 SOARES, R.; TASCA, T. *Giardiasis*: an update review on sensitivity and specificity of
17 methods for laboratorial diagnosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 129, p.
18 98–102, out. 2016.
- 19 SQUIRE, S. A.; RYAN, U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future
20 challenges. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 195, 20 dez. 2017.
- 21 TAYLOR, M. J.; BENTHAM, R. H.; ROSS, K. E. Limitations of Using Propidium
22 Monoazide with qPCR to Discriminate between Live and Dead *Legionella* in Biofilm
23 Samples. **Microbiology insights**, v. 7, p. 15–24, 2014.
- 24 THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and
25 *Cryptosporidium* infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, p. 315–323,
26 jun. 2016.
- 27 THOMPSON, R. C. A.; SMITH, A. Zoonotic enteric protozoa. **Veterinary**
28 **Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 70–78, 2011.
- 29 THOMSON, S. et al. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and
30 control strategies. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 42, 11 dez. 2017.
- 31 TIYO, R. et al. Water from different sources used for the irrigation of vegetables to be
32 marketed: research on *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., and coliforms in Paraná,
33 Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 333–
34 336, 2015.

- 1 TOLEDO, R. D. S. et al. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in feces and water and
2 the associated exposure factors on dairy farms. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175311,
3 12 abr. 2017.
- 4 TONANI, K. A. A. et al. Persistence of *Giardia* , *Cryptosporidium* , Rotavirus, and
5 Adenovirus in Treated Sewage in São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**,
6 v. 99, n. 6, p. 1144–1147, 2013.
- 7 TYSNES, K. R.; ROBERTSON, L. J. Establishment of Canine-Derived *Giardia*
8 *duodenalis* Isolates in Culture. **Journal of Parasitology**, v. 102, n. 3, p. 342–348, jun.
9 2016.
- 10 ULLOA-STANOJLOVIĆ, F. M. et al. Occurrence of *Giardia intestinalis* and
11 *Cryptosporidium* sp. in wastewater samples from São Paulo State, Brazil, and Lima,
12 Peru. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 21, p. 22197–
13 22205, 9 nov. 2016.
- 14 UNITED STATES OF AMERICA. **Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in**
15 **Water by Filtration/IMS/FA**. Cincinnati, Ohio: [s.n.].
- 16 UPTON, S. J.; ZIEN, C. A. Description of a *Giardia varani*-like flagellate from a water
17 monitor, *Varanus salvator*, from Malaysia. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 5,
18 p. 970–971, 1997.
- 19 WANG, L. et al. Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China:
20 Molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. **Parasite**, v. 21, 2014.
- 21 WHO. **Guidelines for the Safe Use of Wastewater Excreta and Greywater**. 1. ed.
22 Switzerland: WHO Press, 2006. v. IV
- 23 WHO. **Guidelines on sanitation and health**. Switzerland: WHO, 2018.
- 24 WHO. **Sanitation**.
- 25 WINKWORTH, C. L.; MATTHAEI, C. D.; TOWNSEND, C. R. Using native riparian
26 barriers to reduce *Giardia* in agricultural runoff to freshwater ecosystems. **Journal of**
27 **Water and Health**, v. 8, n. 4, p. 631–645, dez. 2010.
- 28 WOODS, K. M.; NESTERENKO, M. V.; UPTON, S. J. Development of a microtitre
29 ELISA to quantify development of *Cryptosporidium parvum* in vitro. **FEMS**
30 **Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, p. 89–94, 15 abr. 1995.
- 31 XIAO, L.; FENG, Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens
32 *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Food and Waterborne Parasitology**,
33 2017.
- 34 XIAO, S. et al. Influence of sewage treatment plant effluent discharge into multipurpose

- 1 river on its water quality: A quantitative health risk assessment of *Cryptosporidium* and
2 *Giardia*. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 797–805, fev. 2018.
- 3 YANG, R. et al. Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in fish. **International**
4 **Journal for Parasitology**, v. 40, n. 7, p. 779–785, jun. 2010.
- 5 ZAHEDI, A. et al. *Cryptosporidium homai* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidii) from
6 the guinea pig (*Cavia porcellus*). **Veterinary Parasitology**, v. 245, p. 92–101, 2017.
- 7 ZAHEDI, A. et al. Identification of eukaryotic microorganisms with 18S rRNA next-
8 generation sequencing in wastewater treatment plants, with a more targeted NGS
9 approach required for *Cryptosporidium* detection. **Water Research**, v. 158, p. 301–
10 312, 2019.
- 11 ZOU, Y. et al. Prevalence and risk factors of *Cryptosporidium* infection in farmed pigs
12 in Zhejiang, Guangdong, and Yunnan provinces, China. **Tropical Animal Health and**
13 **Production**, v. 49, n. 3, p. 653–657, 2017.
- 14
- 15

1 **4 HIPÓTESE**

2

3

4

5

6

7

Devido a frequência e resistência de oocistos e cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em esgoto doméstico há oocistos e cistos viáveis dos protozoários em afluentes e efluentes de estação de tratamento de esgoto doméstico que são lançados para corpos hídricos.

1 **5 OBJETIVOS**

2

3 **5.1 OBJETIVO GERAL**

4

5 Detectar e verificar a viabilidade de oocistos e cistos de
6 *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de afluente e efluente de esgoto
7 doméstico de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) em Ibiporã, Paraná.

8

9 **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

10

11 Quantificar oocistos de *Cryptosporidium* spp. afluente e efluente de
12 ETE;

13 Avaliar viabilidade de oocistos e cistos antes e após o tratamento do
14 esgoto;

15 Propor metodologia adaptada de concentração e purificação em
16 matriz de esgoto para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* por meio de Propídio-
17 monoazida-PCR;

18

19

1 **6 ARTIGO – VIABILIDADE DE *CRYPTOSPORIDIUM* E *GIARDIA* EM ESGOTO**
2 **DOMÉSTICO NO INTERIOR DO BRASIL.**

3
4 Winni Alves Ladeia^{1*}, Felipe Danyel Cardoso Martins¹, Beatriz de Souza Lima Nino¹,
5 Arielle da Cunha Silvério¹, Ana Clécia da Silva¹, Raul Ossada²; Douglas Aparecido da
6 Silva¹, João Luis Garcia¹, Roberta Lemos Freire¹.

7
8 ¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de
9 Londrina.

10 ²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de
11 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

12 *Autor por correspondência: winnialvesladeia@gmail.com

13
14 **Resumo**

15 *Cryptosporidium* e *Giardia* são os protozoários que mais causam surtos transmitidos
16 pela água. Os parasitas são frequentemente detectados em águas residuais, no
17 entanto, há pouco conhecimento sobre a concentração de formas viáveis em esgoto
18 tratado. O objetivo foi verificar a presença de oocistos e cistos viáveis e quantificar a
19 concentração de oocistos viáveis em afluente e efluente de Estação de Tratamento
20 de Esgoto (ETE) no interior do Brasil. Dez coletas de afluente e efluente da ETE foram
21 realizadas com periodicidade semanal, durante dois meses de 2020 e dessa forma foi
22 possível acompanhar sete processos de tratamento, da chegada até a saída do
23 esgoto, considerando o tempo de detenção. As amostras foram concentradas por
24 centrifugação, filtração do sobrenadante e purificadas por flutuação em sacarose.
25 Para verificar viabilidade, uma alíquota de cada amostra por coleta foi corada com
26 Propídio-monoazida (PMA). A detecção foi realizada por nPCR para *Cryptosporidium*
27 e *Giardia* e a quantificação de oocistos por qPCR. Ambos os protozoários
28 apresentaram 100% de positividade no afluente da ETE em formas viáveis e a
29 concentração média de oocistos viáveis foi 8.769 oocistos/L. *Cryptosporidium* ocorreu
30 em 100% das amostras de efluente com concentração média de 1.855 oocistos
31 viáveis/L e *Giardia* ocorreu em 70% delas com cistos viáveis em 30%. Considerando
32 os acompanhamentos, em média 31,17% dos oocistos viáveis permaneceram no
33 efluente após tratamento. É provável que os protozoários sejam endêmicos na
34 população que abastece a ETE caso não ocorram despejos ilegais de fontes

1 desconhecidas de águas residuais. *Cryptosporidium* foi mais resistente ao tratamento
2 por lagoas de estabilização que *Giardia*, todavia oocistos e cistos viáveis de ambos
3 chegam à estação e são despejados no corpo hídrico receptor. Este fato demonstra
4 risco à saúde e a necessidade de monitoramento para auxiliar no estabelecimento de
5 medidas que previnam infecção.

6
7 Palavras-chave: ETE, Propídio-monoazida, diagnóstico molecular, quantificação,
8 águas residuais, remoção.

9 10 6.1 INTRODUÇÃO

11
12 *Cryptosporidium* e *Giardia* são os protozoários que mais causam
13 surtos de veiculação hídrica no mundo. Esses parasitas causam gastroenterites em
14 seus hospedeiros, o que frequentemente acarreta quadros graves em pacientes
15 imunocomprometidos e moderados a assintomáticos em imunocompetentes
16 (BALDURSSON; KARANIS, 2011). Os protozoários são amplamente distribuídos no
17 mundo e isso está associado: a sua baixa dose infectante (10 a 100 oocistos e cistos);
18 ao potencial de transmissão indireta por via hídrica e alimentar; as altas cargas
19 parasitárias eliminadas nas fezes (1.10^7 oocistos e 1.10^6 cistos); a ampla variedade
20 de hospedeiros; ao potencial zoonótico e a alta resistência, tanto a condições
21 ambientais quanto a tratamentos de água convencionais (FENG; XIAO, 2011; RYAN;
22 HIJJAWI, 2015).

23 As características de persistência e disseminação de *Cryptosporidium*
24 associadas a sua transmissão pela água proporcionam sua classificação como
25 patógeno de referência para qualidade da água (MEDEMA et al., 2006). Esses
26 protozoários foram verificados em todos os tipos de água, todavia, apresentam maior
27 frequência e concentração em águas residuais, sobretudo em esgoto doméstico
28 (NGUYEN et al., 2016; DARAEI et al., 2020). O esgoto é o local de encontro de
29 excrementos da população urbana, e conseqüentemente, local onde todas as
30 substâncias, metabólitos e patógenos, que sejam passíveis de excreção, convergem.
31 Por conta disso, o monitoramento do esgoto para verificar a saúde da população tem
32 sido empregado recentemente como ferramenta epidemiológica (VAN NUIJS et al.,
33 2011; XIAO et al., 2018).

1 A epidemiologia baseada em esgoto demonstra resultados
2 promissores para acompanhar e predizer tanto doenças como hábitos ilícitos que
3 possam prejudicar a saúde da população. Para tais verificações, análises que podem
4 detectar e quantificar espécies de agentes patogênicos e substâncias químicas são
5 realizadas em esgoto bruto (EMCDDA, 2016; MAO et al., 2020). No entanto, estudos
6 no esgoto tratado que buscam entender se esses agentes infecciosos e subprodutos
7 químicos podem ser lançados no ambiente e de como eles afetam a saúde dos
8 indivíduos, são escassos, principalmente para *Cryptosporidium* e *Giardia*, que
9 apresentam poucas metodologias diagnósticas estabelecidas (XIAO et al., 2018).

10 Para avaliar o lançamento desses parasitas no ambiente e os
11 prejuízos a saúde, a viabilidade de suas formas infectantes em esgoto tratado precisa
12 ser verificada (MA et al., 2016; MARTINS et al., 2019). Metodologias para a detecção
13 de viabilidade de parasitas são descritas, todavia, sua acurácia é comprometida
14 quando aplicadas em amostras ambientais. Neste sentido, as análises moleculares
15 apresentam maior sensibilidade e especificidade que análises de microscopia, mas
16 demandam purificação da amostra, o que pode aumentar os custos. Como alternativa
17 de custo e performance de análise de viabilidade em amostras ambientais, PMA-PCR
18 vem sendo estudada para uso diagnóstico (LIANG; KEELEY, 2012; ROUSSEAU et al.,
19 2018). Para entender os riscos ambientais e riscos à saúde que podem ser causados
20 pela contaminação do ambiente com formas viáveis de *Cryptosporidium* e *Giardia*, o
21 objetivo deste estudo foi verificar a presença de oocistos e cistos totais e viáveis dos
22 protozoários em afluente e efluente de ETE no interior da região sul do Brasil e
23 quantificar oocistos totais e viáveis de *Cryptosporidium* que podem atingir o corpo
24 hídrico receptor do efluente.

25 26 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

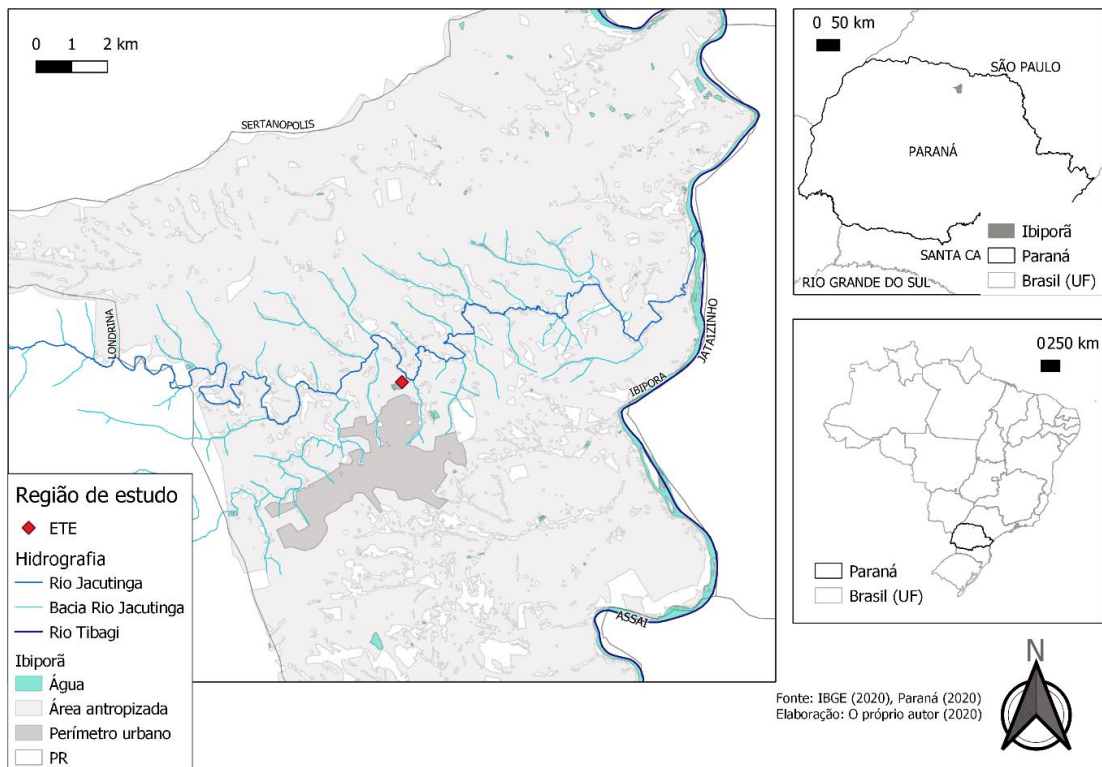
27 28 6.2.1. Descrição do Local de Estudo: Aspectos socioeconômicos e de saneamento

29 Ibiporã é um município localizado na região metropolitana de
30 Londrina, mesorregião Norte Central do estado do Paraná, Brasil (SIRGAS 2000: -
31 23.2695; -51.0437) (Figura 1). O município possui 54.558 habitantes, com o 94º
32 melhor Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do estado (0,726) e uma taxa de
33 Internações por Diarreia de 1,7/mil habitantes (BRASIL, 2019). O clima da localidade

1 é mesotérmico úmido, dentro do bioma Mata Atlântica, com temperaturas médias
2 variando de 16,8°C a 26,8°C (IBIPORÃ, 2020a).

3 O recolhimento de esgoto abrange 96% do município tal como o
4 abastecimento de água potável, obtida de manancial superficial em tratamento
5 secundário. O esgoto recolhido do município é tratado em três Estações de
6 Tratamento de Esgoto (ETEs) por meio de sistema pré-tratamento, composto por
7 gradeamento, e, sistema de tratamento por lagoas de estabilização, que somam 14
8 dias de detenção (IBIPORÃ, 2010, 2020b). A ETE onde o estudo foi realizado é
9 responsável por 56% do recolhimento da cidade e possui três lagoas anaeróbicas e
10 uma lagoa facultativa oxigenada por algas. A média anual de vazão em 2019 foi de
11 171,57 m³/h para o afluente e 129,78 m³/h para efluente que é lançado no Rio
12 Jacutinga (comunicação pessoal).

13
14 **Figura 1** - Descrição espacial do local de coleta (ETE) de afluente e efluente de esgoto
15 de Ibiporã e Bacia do Rio Jacutinga, 2020.



6.2.2. Coleta das amostras

Foi realizada uma coleta por semana, durante 10 semanas, do afluente e efluente de ETE. As dez coletas ocorreram as quartas-feiras de setembro

1 a novembro de 2020, com exceção do dia 28 de outubro, que foi coletado em uma
2 quinta-feira, impossibilitando o acompanhamento do processo de tratamento entre a
3 sétima e nona coletas. Dessa forma, sete acompanhamentos do esgoto na chegada e
4 saída da ETE foram possíveis respeitando o tempo de detenção de 14 dias. Galões
5 plásticos foram utilizados para o acondicionamento e transporte das amostras obtidas
6 do afluente após gradeamento e do efluente previamente ao despejo no manancial
7 hídrico superficial. Os galões foram acondicionados em caixas isotérmicas com
8 temperatura entre 4 a 7°C até o processamento das amostras. A mensuração da
9 turbidez (NTU) foi realizada por turbidímetro AP2000 (PoliControl, São Paulo, Brasil).

10 Para desinfecção dos galões, foi adicionado hipoclorito de sódio (62,5
11 ppm) para atuação por 12 horas. A solução foi descartada, adicionou-se 2% do volume
12 total de Tween 80 1% (100 mL) e o galão foi submetido a agitação mecânica vigorosa
13 por 5 min. A solução residual foi descartada e o recipiente enxaguado para remoção
14 da espuma e submetido a três enxagues com água destilada para remoção de
15 resíduos químicos (MARTINS et al., 2019).

16 17 6.2.3. Concentração e Purificação

18 A concentração das amostras foi obtida por associação de
19 centrifugação e filtração, visando aprimorar a recuperação. Foram centrifugados
20 600mL do afluente e 400mL do efluente em dois ciclos a 1500 x *g* por 15min e o *pellet*
21 foi reservado até a purificação (SANTOS et al., 2011). Do sobrenadante da primeira
22 centrifugação, foram filtrados de 200 a 400mL do afluente e 400mL do efluente em
23 membrana de éster de celulose (1,2 µm de porosidade) acoplada a sistema de vácuo.
24 O resíduo retido na membrana foi recolhido por 20 min de raspagem em solução
25 Tween 80 0,1% utilizando alças plásticas. O produto da raspagem foi centrifugado a
26 1500 x *g* por 15 min e o *pellet* reservado até a purificação (CANTUSIO NETO et al.,
27 2010).

28 A purificação dos *pellets* ocorreu por centrifugo-flutuação em solução
29 de sacarose. Foi adicionado 85% de solução de sacarose (densidade de 1,208 g/mL)
30 a tubo(s) cônico(s) (15mL) e 15% de *pellet* das amostras concentradas. Os tubos
31 foram submetidos a centrifugação a 1250 x *g* por 10 min em rotor tipo *swing* (KIMURA
32 et al., 2000). O sobrenadante foi transferido para tubo de 50mL com adição de água
33 destilada até o volume total, centrifugados em dois ciclos a 1500 x *g* por 15 min para
34 remoção da sacarose.

1 O *pellet* resultante foi dividido em duas alíquotas para o esgoto bruto
2 e tratado, para possibilitar a verificação de (oo)cistos totais e viáveis. Quatro alíquotas
3 foram obtidas por coleta: uma alíquota sem adição de Propídio-monoazida (PMA) (BS
4 – esgoto bruto sem PMA; TS – esgoto tratado sem PMA) e uma alíquota com adição
5 de PMA (BP – esgoto bruto com PMA; TP – esgoto tratado com PMA). As alíquotas
6 foram armazenadas a 4°C por menos de 24 horas até a coloração com PMA.

7 8 6.2.4. Viabilidade de oocistos e cistos por Propídio-monoazida

9 O corante PMA (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) foi diluído em
10 solução de Dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 20%
11 para obtenção de concentração de solução de estoque a 2 mM. Para coloração das
12 amostras, 195 µL das alíquotas destinadas a adição de PMA (BP e TP) foram
13 transferidas para microtubos de 1,5 mL e 15 µL de PMA (2 mM) foram adicionados,
14 resultando em concentração de 143 µM de PMA por amostra (LIANG; KEELEY, 2012;
15 ALONSO; AMORÓS; GUY, 2014).

16 Para penetração do corante em células com membrana danificada, a
17 solução foi mantida em abrigo de luz em temperatura ambiente, por 30 min com
18 agitação manual lenta a cada 5 min. Após esse período, foi realizada fotoativação do
19 corante para obter ligação covalente entre PMA e DNA. Para isso, os microtubos
20 foram depositados em uma cama de gelo na posição horizontal e submetidos a
21 incidência de luz de LED de 100 W (λ : 450 - 500), a 20 cm de distância da solução,
22 por 10 min, com agitação mecânica lenta a cada 2 min por 30s (ALONSO; AMORÓS;
23 GUY, 2014). As soluções foram centrifugadas a 5.000 x *g* por 10 min, o *pellet* foi
24 ressuspensionado em água destilada e as amostras foram armazenadas a – 20°C até o
25 momento da extração de DNA (LIANG; KEELEY, 2012).

26 27 6.2.5. Curva padrão para *quantitative*PCR de *Cryptosporidium*

28 Oocistos provenientes de amostras de fezes em estoque a 4°C,
29 utilizadas como controle positivo, foram quantificados em câmara de Neubauer e
30 Imunofluorescência Direta utilizando kit Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian
31 Bioscience, Cincinnati, Ohio, USA). Posteriormente, oocistos de *Cryptosporidium*
32 (5.10^3 oocistos/µL) foram tratados com álcool 70% por 5 min, para destruição de
33 microrganismos sensíveis, e centrifugados a 5000 x *g* por 15 min. O *pellet* foi
34 ressuspensionado em TE HCl (pH 8,0) e a extração do DNA foi obtida por kit *DNeasy*®

1 *PowerSoil*[®] (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com o protocolo do fabricante com
 2 adição de um ciclo de congelamento (-80°C) e descongelamento (56°C) a etapa de
 3 extração. Após obtenção do DNA, cinco pontos de diluição com base cinco foram
 4 realizados, os quais derivaram seis pontos para curva padrão de *Cryptosporidium* com
 5 as concentrações: 5.10³ oocistos/μL; 1.10³ oocistos/μL; 2.10² oocistos/ μL; 4.10
 6 oocistos/μL; 8 oocistos/μL e 1,6 oocistos/μL.

8 6.2.6. Análise Molecular

9 O DNA das amostras foi extraído conforme descrito anteriormente.
 10 Para verificação da presença dos (oo)cistos totais e viáveis no esgoto, *nested*-PCR
 11 para gene 18S rDNA de *Cryptosporidium* e *Giardia* foi realizada. Os primers *forward* e
 12 *reverse* para a primeira e segunda reação foram obtidos de Xiao et al. (1999), para
 13 *Cryptosporidium* e de Langkjaer et al. (2007), para *Giardia* (Quadro 3).

14 A quantificação dos oocistos totais e viáveis de *Cryptosporidium* foi
 15 obtida por qPCR tipo TaqMan utilizando o equipamento *StepOnePlus*[™] (Applied
 16 Biosystems, Foster City, CA, USA). Os oocistos foram detectados utilizando *primers*
 17 *forward* e *reverse* e probe tipo FAM descritos por Burnet et al. (2013) (Quadro 3).

19 **Quadro 3** - Oligonucleotídeos utilizados na nPCR, do gene 18S rDNA para detecção
 20 de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. e na qPCR para gene 18S rDNA para
 21 *Cryptosporidium* em esgoto, 2020.

Análise Molecular	Protozoário	Gene	Sequências	Amplicon	Referências
nPCR	<i>Cryptosporidium</i> spp.	18S rDNA	Primeira reação	1325 pb	(XIAO et al., 1999)
			5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'		
			5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'		
			Secunda reação	826 a 864 pb	
			5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'		
	5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'				
	<i>Giardia</i> spp.	18S rDNA	Primeira reação	292 pb	(LANGKJAER et al., 2007)
			5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3'		
			5'-GTCGAACCCTGATTCTCCG-3'		
			Secunda reação	130 pb	
5'-GACGCTCTCCCAAGGAC-3'					
5'-CTGCGTCACGCTGCTCG-3'					

qPCR	<i>Cryptosporidium</i> spp.	18S rDNA	Primer forward	106 pb	(BURNET et al., 2013)
			5'-GTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGG-3'		
			Primer reverse		
			5'-GAGTAAGGAACAACCTCCAATCTCTAG-3'		
			Probe		
			5'FAM-TCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCC-3' TAMRA		

1
2
3 A reação de qPCR para *Cryptosporidium* foi composta por: 3mM de
4 MgCl₂ (MasterMix HOT FIREPol® qPCR Mix Plus ROX - 15 mM de MgCl₂); 150 nM
5 dos *primers forward* e *reverse*; 250 nM da probe FAM; 12,9µL de água ultrapura e 2µL
6 de DNA da amostra, com volume total de 20µL. Os ciclos de amplificação do DNA
7 foram: Desnaturação inicial a 95°C por 10 min; 50 ciclos de desnaturação a 95°C por
8 15s e anelamento conjugado à amplificação a 60°C por 60s. A quantificação absoluta
9 foi realizada por meio da comparação entre as reações em duplicata das amostras e
10 as diluições na base 5 da curva padrão descrita anteriormente.

11 6.2.7. Quantificação de oocistos no esgoto

12 Para quantificar o número total de oocistos recuperados por amostra
13 de esgoto (oAq), os oocistos totais que tiveram seu DNA extraído (oq e ve) foram
14 divididos pelos volumes totais obtidos em cada uma das etapas de purificação e
15 diagnóstico (vaq, vEs e vP) (Equação 1). A concentração de oocistos/L nas amostras
16 de esgoto (oWW) foi calculada pelo total de oocistos recuperados sobre o volume total
17 de esgoto usado para concentração multiplicado por um milhão (Equação 2).
18
19

$$oAq = oq \times \left(\frac{ve}{vaq} \times \frac{vP}{vEs} \right) \quad (1)$$

$$oWW = \left(\frac{oAq}{vWW} \right) \times 1.000.000 \quad (2)$$

20
21 Onde: oAq é o total de oocistos recuperados por amostra; oq, o número de oocistos
22 obtidos pela quantificação absoluta da qPCR; ve, o volume total obtido na extração de
23 DNA (µL); vaq, o volume de DNA utilizado na qPCR; vEs, o volume de amostra
24 purificada utilizado para extração de DNA; vP, o volume total obtido da purificação;

1 oWW, a concentração de oocistos no esgoto/L e vWW, o volume total de esgoto
2 utilizado para concentração (μL).

4 6.2.8. Análise Estatística

5 A análise estatística descritiva e inferencial foi realizada por meio do
6 *software* R (R Foundation, Vienna, Austria). Foram executados: teste de normalidade
7 (Shapiro-Wilk); teste de homogeneidade de variâncias (teste F); Teste t para duas
8 amostras; Teste de Wilcoxon não-pareado e pareado para duas amostras; Correlação
9 de Spearman e Regressão Linear Simples. Todos os testes tiveram nível de
10 significância de 5%.

12 6.2.9. Descrição Espacial

13 Por meio de geoprocessamento, utilizando o *software* QGIS
14 (QGIS.org Association - Free Software Foundation, Massachusetts, New York, USA),
15 os resultados de quantificação de (oo)cistos viáveis no afluente e no efluente da ETE
16 foram relacionados a mapa que apresente a ETE, a região da qual o esgoto é
17 recolhido e o corpos hídrico receptor do efluente despejado. A disposição geográfica
18 dos locais contactantes à água superficial receptora foi obtido no portal do Instituto
19 Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019) e portal do Governo do Estado do
20 Paraná (PARANÁ, 2019).

22 6.3 RESULTADOS

23
24 Com a periodicidade semanal entre as coletas que ocorreram durante
25 10 semanas, 10 amostras de afluente e de efluente da ETE foram obtidas, as quais
26 derivaram duas alíquotas por coleta para o esgoto bruto (BS: n = 10; BP: n = 10) e
27 para esgoto tratado (TS: n = 10; TP: n = 10). Dessas amostras, respeitando o tempo
28 de detenção, foi possível acompanhar o mesmo esgoto que chega à estação e após
29 o tratamento, por sete vezes. De acordo com nPCR, *Cryptosporidium* e *Giardia*
30 ocorreram em 100% (10/10) das coletas do afluente de esgoto, com (oo)cistos viáveis.
31 No esgoto tratado a frequência de *Cryptosporidium* foi de 100% (10/10) e a de *Giardia*
32 foi de 70% (7/10) nas amostras, nas quais em 60% (6/10) e 30% (3/10) delas,
33 respectivamente, foram detectados (oo)cistos viáveis por meio da PMA-nPCR.

1 Comparando os métodos de detecção de viabilidade de
2 *Cryptosporidium*, PMA-nPCR apresentou 20% (4/20) de resultados negativos,
3 observados nas amostras de esgoto tratado, em detrimento da PMA-qPCR, a qual
4 não apresentou resultado negativo. A concentração de *Cryptosporidium* no afluente
5 da ETE foi em média 3,7 vezes menor que no efluente (Tabela 1 e Figura 2). Essa
6 contagem de oocistos no esgoto tratado não apresentou distribuição normal (Shapiro-
7 Wilk: p-valor 0,001), o que foi evidenciado por alto desvio-padrão (sd: 78.977,4
8 oocistos/L). Para as alíquotas com PMA, a contagem de oocistos viáveis no afluente
9 da ETE (BP) foi 5,6 vezes maior que no efluente (TP) (Tabela 1 e Figura 2), no qual,
10 em todos os acompanhamentos, esgoto bruto com PMA (BP) apresentou maior
11 concentração de oocistos que esgoto tratado com PMA (TP) (Tabela 2). Em média,
12 50% dos oocistos no afluente da ETE estavam viáveis e, após o tratamento, 6,34%
13 deles permaneceram viáveis.

14

15

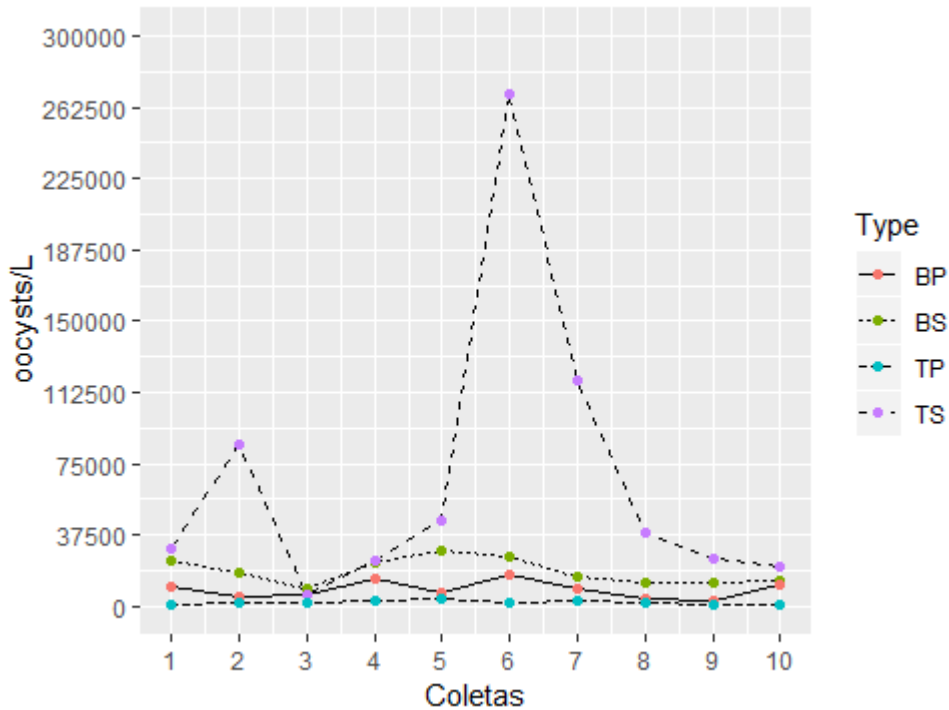
16

Tabela 1 - Frequência de (oo)cistos totais e viáveis de *Cryptosporidium* e *Giardia* com concentrações médias de *Cryptosporidium* em afluente e efluente de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) em Ibiporã, Paraná, Brasil, 2020.

Amostra	<i>Giardia</i>		<i>Cryptosporidium</i>							
	nPCR		nPCR		qPCR		Oocistos/L de esgoto			
	%	(n/N)	%	(n/N)	%	(n/N)	Média	(IC 95%)	Min	Máx
BS	100	(10/10)	100	(10/10)	100	(10/10)	18.164,0	(11.335,0 24.993,0)	9.045,0	29.129,0
BP	100	(10/10)	100	(10/10)	100	(10/10)	8.769,0	(4.159,4 13.378,6)	3.020,0	16.985,0
TS	70	(07/10)	100	(10/10)	100	(10/10)	66.476,0	(12.501,4 145.453,4)	6.121,0	269.840,0
TP	30	(03/10)	60	(06/10)	100	(10/10)	1.855,1	(786,6 2.923,6)	597,7	3.687,2

Nota: BS (Afluente de estação de tratamento de esgoto sem PMA; oocistos e cistos totais); BP (Afluente de estação de tratamento de esgoto com PMA; oocistos e cistos viáveis); TS (Efluente de estação de tratamento de esgoto sem PMA; oocistos e cistos totais); TP (Efluente de estação de tratamento de esgoto com PMA; oocistos e cistos viáveis); PMA (corante Propídio-monoazida para detecção de oocistos e cistos viáveis)

1 **Figura 2** - Concentração de oocistos de *Cryptosporidium*, totais e viáveis, em afluente
 2 e efluente de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), em 10 coletas semanais de
 3 setembro a novembro de 2020 em Ibiporã, Paraná, Brasil.



4
 5 Nota: Type (Tipo de alíquota); BP (Afluente de estação de tratamento de esgoto com PMA); BS
 6 (Afluente de estação de tratamento de esgoto sem PMA); TP (Efluente de estação de tratamento de
 7 esgoto com PMA); TS (Efluente de estação de tratamento de esgoto sem PMA); PMA (corante
 8 Propídio-monoazida para detecção de oocistos e cistos viáveis).

9

10 Tabela 2 - Acompanhamentos da concentração de oocistos de *Cryptosporidium*, de
 11 acordo com tempo de detenção, em afluente e efluente de Estação de Tratamento de
 12 Esgoto, relacionados a remoção e persistência de oocistos após tratamento, Ibiporã,
 13 Paraná, BR, 2020.

Coletas	Acompanhamento (detenção: 14 dias)	Oocistos viáveis/L de esgoto		Remoção (%)	Persistência (%)
		Bruto	Tratado		
1 e 3	1	10.501,88	1.480,78	85,90	14,10
2 e 4	2	4.491,67	2.978,91	33,68	66,32
3 e 5	3	6.285,42	3.687,19	41,34	58,66
4 e 6	4	14.672,50	1.407,81	90,41	9,59
5 e 7	5	6.723,75	2.995,31	55,45	44,55
6 e 8	6	16.984,69	1.943,44	88,56	11,44
8 e 10	7	4.423,54	597,66	86,49	13,51

14

1
2 O nível de turbidez entre o esgoto bruto e tratado foi estatisticamente
3 diferente (test t - p-valor: 0,00004). A média observada em esgoto bruto foi de 332
4 NTU (IC 0,95: 221,55 – 442,45) e em esgoto tratado foi de 75,25 NTU (IC 0,95: 56,7
5 – 93,8). Houve correlação positiva baixa entre concentração de oocistos e turbidez
6 para o esgoto bruto (Regressão linear simples: $Y = 125,44 + 0,01 * NTU$; $R^2 = 0,4312$).
7 Para o esgoto tratado, não houve correlação com significância estatística (Correlação
8 de Spearman - p-valor: 0,89).

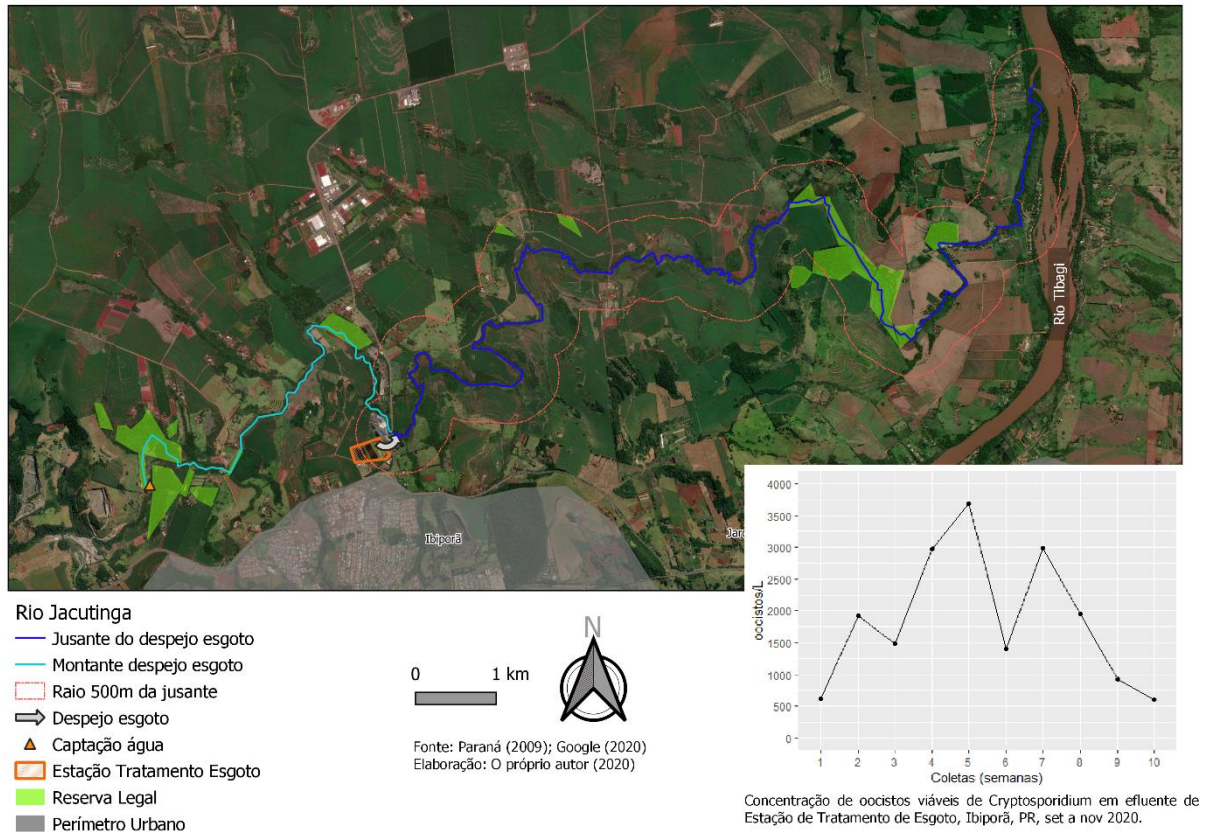
9 Respeitando o tempo de detenção de 14 dias, foi possível verificar
10 significância estatística do tratamento para remoção de oocistos viáveis (Teste
11 Wilcoxon pareado - p-valor: 0,01). A redução média de oocistos viáveis, da chegada
12 até o despejo foi de 68,83%. Dessa forma, a média de persistência de oocistos viáveis
13 que chegaram ao corpo hídrico receptor foi de 31,17%. A concentração média de
14 oocistos inviabilizados pelo tratamento, de acordo com os acompanhamentos foi de
15 6.998,9 (IC 0,95: 1.548,27 – 12.449,54) (Tabela 2).

16 O Rio Jacutinga recebeu, em média, 1.855 oocistos viáveis/L durante
17 as 10 semanas de estudo, com uma vazão anual média de 129,78 m³/h para o efluente
18 da ETE. À montante do ponto de descarga do esgoto tratado que apresentou as
19 formas viáveis de *Cryptosporidium*, se localizou o ponto de captação de água da
20 cidade de Ibiporã, este por sua vez, fica a jusante da cidade de Londrina. O curso do
21 rio a jusante do despejo do efluente da ETE, encontra-se em região de atividade
22 agropecuária, onde não há regiões de perímetro urbano até a sua foz no Rio Tibagi
23 (Figura 3).

24

25

- 1 **Figura 3** - Imagem de satélite de região de estudo com a representação do Rio
 2 Jacutinga a montante e a jusante do local do despejo de efluente da Estação de
 3 Tratamento de Esgoto com a concentração de oocistos viáveis de *Cryptosporidium*,
 4 Ibiporã, PR, 2020.



5

6

7 6.4 DISCUSSÃO

8

9

10 A presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em 100% das amostras do
 11 afluente da ETE indicam que ambos os protozoários são eliminados pela população
 12 que abastece a estação. A quantificação de *Cryptosporidium* demonstrou que alta
 13 concentração de oocistos (média: 18164 oocistos/L) chega à estação. Ambos os
 14 protozoários foram constantemente encontrados no esgoto, inclusive no Brasil, no
 15 entanto, as frequências e a concentração de oocistos apresentadas por esse estudo,
 16 supera as encontradas em outros estudos os quais apresentaram amplitude de 0 a
 17 6.000 oocistos/L para *Cryptosporidium* em esgoto bruto e 10 a 12.225 cistos/L para
 18 *Giardia* (SANTOS et al., 2011; TONANI et al., 2013; TARAN-BENSHOSHAN et al.,
 19 2015; RAMO et al., 2017; XIAO et al., 2018). Essa comparação não é precisa por
 conta de a metodologia de detecção predominante utilizada nesses tipos de estudos

1 ser por Imunofluorescência direta (IFA) e por terem como alvo ETEs com sistema de
2 tratamento mais complexos como reatores anaeróbicos, lodo ativado e até
3 ultrafiltração (UNITED STATES OF AMERICA, 2012; ROUSSEAU et al., 2018).

4 Além de metodologia de detecção e tratamento de esgoto, as
5 características da população e das atividades econômicas da região do presente
6 estudo diferem dos demais. A população apresenta uma baixa densidade demográfica
7 e um recolhimento de esgoto e abastecimento de água tratada abrangentes (96%),
8 enquanto a atividade econômica predominante é agroindustrial, composta por micro a
9 médias indústrias, características essas que são comuns no interior da região sul do
10 Brasil. Devido aos bons níveis de saneamento básico da população e a baixa
11 ocorrência de diarreia (1,7 internações/1000 habitantes), altas concentrações de
12 *Cryptosporidium* não eram esperadas. Por conta disso pode-se supor que despejos
13 ilegais de agroindústrias ocorram no esgoto doméstico, o que explicaria a presença
14 do protozoário em grandes quantidades já que este parasita apresenta alta
15 prevalência em bovinos não somente na região, mas também no país (SILVA JÚNIOR
16 et al., 2011; SILVA; LOPES; ARAÚJO-JUNIOR, 2013; TOLEDO et al., 2017). Esses
17 despejos ilegais, além de prejudicarem a eficiência do sistema de tratamento, por
18 promover saturação de matéria orgânica e inorgânica, ainda comprometem a
19 caracterização da situação de saúde da população, provocando equívocos em
20 avaliações de Epidemiologia Baseada em Esgoto (DURIGAN et al., 2014; KATES;
21 KNAPP; KEENAN, 2014; DE MEDEIROS et al., 2017).

22 Considerando que ambos os protozoários apresentaram formas
23 viáveis em 100% das amostras de esgoto bruto e que, em média, metade dos oocistos
24 de *Cryptosporidium* quantificados eram viáveis, o tratamento de esgoto provavelmente
25 estava saturado, o que dificultava a eliminação desses parasitas. Isso pôde ser
26 percebido nas altas frequências dos protozoários e altas concentrações de
27 *Cryptosporidium* no efluente da ETE. A ocorrência de *Cryptosporidium* em 100% das
28 amostras do efluente da ETE em detrimento de *Giardia* que foi encontrada em 70%,
29 provavelmente ocorreu devido a maior resistência dos oocistos ao tratamento. Isso é
30 ressaltado nos resultados de viabilidade, nos quais *Cryptosporidium* apresentou o
31 dobro de frequência que *Giardia* no efluente de esgoto. Outros estudos demonstram
32 maior eliminação de *Giardia* em amostras de água residuais quando comparado a
33 *Cryptosporidium* (TARAN-BENSHOSHAN et al., 2015; RAMO et al., 2017).

1 Ambos os protozoários são majoritariamente encontrados em águas
2 residuais quando comparados a outros tipos de água, e são detectados em efluentes
3 de ETEs (NGUYEN et al., 2016; DARAEI et al., 2020). Essa detecção alerta para o
4 potencial desses protozoários atingirem os corpos hídricos em concentrações que
5 gerem riscos à saúde humana e de animais (XIAO et al., 2018). Potencial esse que é
6 comprovado pelo montante de surtos transmitidos pela água ocasionados pelos
7 parasitas, dos quais *Cryptosporidium* é o maior causador, seguido por *Giardia*, que
8 provavelmente está em posição secundária devido a maior sensibilidade aos
9 tratamentos (BALDURSSON; KARANIS, 2011). Considerando o despejo e,
10 consequente contaminação de corpos hídricos com efluentes da ETE que contenham
11 os parasitas, o esgoto pode apresentar um papel de reservatório ambiental desses
12 protozoários, podendo contribuir para a manutenção da endemicidade dessas
13 parasitoses na população.

14 A quantificação de oocistos totais de *Cryptosporidium* foi maior no
15 esgoto tratado que no esgoto bruto, o que não era um resultado esperado (RAMO et
16 al., 2017; XIAO et al., 2018). Para elucidar as causas desse resultado é necessário
17 considerar que menor variação nas concentrações em esgoto bruto foi verificada em
18 detrimento das concentrações no efluente da ETE, que neste sentido, não apresentou
19 distribuição normal. A nova classificação taxonômica do gênero, relata a capacidade
20 de *Cryptosporidium* de se replicar em biofilmes fora de um hospedeiro (CAVALIER-
21 SMITH, 2014; RYAN et al., 2016). Todavia, essa replicação não foi considerada tão
22 relevante de forma que possa explicar uma concentração média de oocistos 3,7 vezes
23 superior no esgoto tratado em relação ao esgoto bruto como a encontrada nesse
24 estudo. Portanto, esse resultado foi observado possivelmente por influência do
25 ambiente, já que o sistema de tratamento é por lagoas de estabilização, e, pela
26 diferença de composição entre afluente e efluente de esgoto (NASSER, 2016;
27 DEVAULT; LÉVI; KAROLAK, 2017). Com a incidência solar diária de 12 horas nas
28 lagoas de estabilização, pode ter ocorrido concentração de oocistos devido a
29 evaporação da água. Esse fato associado a menor nível de inibidores e maior
30 concentração de DNA alvo disponível, permitiu maior quantificação no esgoto tratado,
31 gerada pela qPCR. Dessa forma, a coerência observada por conta das menores
32 concentrações de oocistos viáveis no esgoto tratado quando comparado ao esgoto
33 bruto corroboram para o levantamento desta hipótese.

1 Essa coerência nas frequências e concentrações de (oo)cistos
2 viáveis, que foi observada por maiores valores em esgoto bruto quanto comparado ao
3 tratado, expressa a aplicabilidade da metodologia de detecção de viabilidade utilizada
4 neste estudo. Os métodos de concentração e purificação permitiram detecção de
5 (oo)cistos tanto da nPCR quanto de qPCR. Considerando a maior positividade de
6 *Cryptosporidium* obtida na qPCR em detrimento da nPCR, há indicação da qPCR ser
7 mais sensível para pesquisa desse protozoário no esgoto. Isso se ressalta pelo fato
8 de as quatro amostras negativas na nPCR, mas positivas na qPCR, terem
9 apresentado menos de 13 oocistos na quantificação absoluta. Neste sentido, em
10 detrimento de outros estudos, PMA-qPCR, associada as técnicas de concentração e
11 purificação empregadas neste estudo, mostrou ser uma boa metodologia para
12 quantificação de oocistos viáveis de *Cryptosporidium* no esgoto (MA et al., 2016;
13 ADEYEMO et al., 2018).

14 Para o uso de PMA associado as análises moleculares para detecção
15 de viabilidade dos protozoários foram consideradas, neste estudo, as limitações da
16 técnica buscando minimizar os erros de diagnóstico. Essas limitações estão
17 relacionadas a: (i) tratamentos de esgoto que inviabilizem (oo)cistos sem
18 comprometer suas membranas celulares (e.g.: UV na superfície das lagoas de
19 estabilização da ETE); (ii) concentração alta de partículas que possam dificultar a
20 ligação do PMA ao dsDNA alvo (e.g.: dsDNA não-alvo); e, (iii) soluções com altos
21 níveis de turbidez, que possam impedir a fotoativação do corante (LIANG; KEELEY,
22 2012; TAYLOR; BENTHAM; ROSS, 2014). Neste estudo, tanto a presença de outros
23 microrganismos quanto o nível de turbidez foram reduzidos por meio da metodologia
24 de concentração específica para os protozoários, associando centrifugação e filtração
25 e pela purificação em solução de sacarose. Considerando a correção desses erros,
26 oocistos de parede íntegra, todavia inviáveis, podem ter sido diagnosticados como
27 viáveis. Isso por conta da impossibilidade da metodologia utilizada corrigir o erro de
28 tratamentos que agem apenas na desestruturação do material genético e não na
29 desestruturação de membranas celulares.

30 Considerando a coerência e boa acurácia da metodologia de
31 detecção de viabilidade utilizada, associada ao monitoramento em esgoto bruto e
32 tratado, foi possível constatar que (oo)cistos e cistos viáveis persistem no esgoto após
33 o tratamento e são lançados no rio. As quantificações de viabilidade são essenciais
34 para entender os riscos de doença na população que podem ser acarretados por

1 contaminação do ambiente com esgoto, ainda mais no caso desses protozoários que
2 apresentam formas infectantes altamente resistentes a tratamentos de água e
3 esgoto.(BALDURSSON; KARANIS, 2011; TROEGER et al., 2018) Estimativas de
4 riscos de infecção da população por modelos inferenciais, baseados nas contagens
5 de oocistos em esgoto bruto ocorrem, todavia, essas inferências podem estar sujeitas
6 a erros não previstos devido ao desconhecimento de concentrações reais em esgoto
7 tratado (XIAO et al., 2018). Dessa forma, é importante caracterizar as variações de
8 concentração dos (oo)cistos na chegada e saída de esgoto, para o estabelecimento
9 de modelos preditivos mais acurados que possam ser empregados em análises de
10 Epidemiologia Baseada em Esgoto desde que tenham contextos sociais e sanitários
11 similares.

12 As variações no nível de remoção e a persistência de formas viáveis
13 tanto de *Cryptosporidium* quanto *Giardia* evidenciam a necessidade do monitoramento
14 da viabilidade desses protozoários em efluente de ETEs. O monitoramento possibilita
15 acompanhar o nível de despejo dos patógenos em corpo hídrico, de forma que níveis
16 de concentração de (oo)cistos acima do potencial depurador do rio possam ser
17 reconhecidos e o planejamento de ação para evitar riscos à saúde possa ser
18 executado (XIAO et al., 2018; MAO et al., 2020). Neste estudo foi observada maior
19 persistência de oocistos viáveis de *Cryptosporidium* (60% das amostras TP) em
20 comparação a *Giardia* (30% das amostras TP) o que indica que o tratamento por
21 lagoas de estabilização com detenção de 14 dias é mais eficiente para remoção de
22 *Giardia*. A maior susceptibilidade dos cistos, em comparação aos oocistos, é
23 relacionada, principalmente, ao seu maior tamanho (10 a 12 µm cistos; 3 a 8 µm
24 oocistos) e a composição estrutural (parede dos oocistos: dupla camada ácido-álcool
25 resistente e camada proteica) (PLUTZER; ONGERTH; KARANIS, 2010; CAVALIER-
26 SMITH, 2014). Por esses fatores, *Giardia* está mais relacionada a remoções físicas
27 (e.g. filtração e decantação) e *Cryptosporidium* a remoções biológicas (e.g. predação
28 por ciliados) (SIQUEIRA-CASTRO et al., 2016; KING et al., 2017). Por conta disso,
29 maior remoção de oocistos foi relatada em sistema de lodo ativado e lagoas de
30 estabilização. Todavia, para lagoas de estabilização apresentarem remoção efetiva
31 do protozoário, são necessários pelo menos 20 dias de detenção (TARAN-
32 BENSOSHAN et al., 2015; NASSER, 2016). O que corrobora com os resultados
33 obtidos neste estudo, que demonstrou persistência média de 1.855 oocistos/L.

1 Os níveis de remoção de oocistos viáveis apresentaram alta
2 variabilidade, o que é esperado para sistemas de tratamento de águas residuais
3 (TARAN-BENSHOSHAN et al., 2015; SIQUEIRA-CASTRO et al., 2016).
4 Considerando a composição do esgoto, derivada da população que abastece a ETE
5 e, do tratamento empregado, fatores como: saturação do sistema por despejos
6 clandestinos; variações de temperatura; e variações de incidência solar podem ter
7 influenciado os níveis de remoção obtidos (YOUNG; SMITH; FAZIL, 2015; MA et al.,
8 2019). Para prevenir a influência negativa desses fatores, indicadores como turbidez
9 e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) são utilizados. Ambos já foram
10 correlacionados com a presença de oocistos no esgoto, no entanto, essas correlações
11 não são altas tampouco constantes (MEDEMA et al., 2006; VAN DYKE et al., 2012).
12 Neste estudo, correlação moderada foi encontrada entre turbidez e oocistos no
13 afluente da ETE, enquanto para o efluente, não houve correlação, demonstrando a
14 interferência multifatorial tanto aos níveis de turbidez quanto aos níveis de
15 *Cryptosporidium*.

16 Foi possível constatar que o Rio Jacutinga recebe formas viáveis dos
17 parasitas no despejo do efluente da ETE. Esses parasitas presentes no corpo hídrico
18 podem causar risco à saúde de animais e humanos que se abastecem da água do rio
19 (MOK; BARKER; HAMILTON, 2014). Aparentemente, a maior preocupação está no
20 uso dessa água para irrigação de cultivos e hidratação animal, isso considerando o
21 predomínio de atividades agropecuárias, do despejo do efluente até a foz do rio. Para
22 evitar ou reduzir as concentrações de protozoários despejados no rio é necessário
23 associar: (i) a redução da concentração de parasitas que chegam a ETE, por meio do
24 rastreio e impedimento de possíveis despejos ilegais; e (ii) aprimoramento do
25 tratamento para remoção desses protozoários resistentes, por meio do aumento do
26 tempo de detenção para 20 dias, por exemplo.

27 28 6.5 CONCLUSÃO

29
30 *Cryptosporidium* e *Giardia* apresentam característica endêmica na
31 população que abastece a ETE estudada, que pode sofrer influência de despejos
32 agroindustriais. Os (oo)cistos desses protozoários chegam viáveis pelo afluente e
33 persistem viáveis no efluente da ETE, no qual, *Cryptosporidium* é mais resistente ao
34 tratamento por lagoas de estabilização. De acordo com o esperado, os resultados de

1 maior frequência e concentração dos parasitas encontrados nas amostras sem PMA
 2 em relação as amostras com o corante demonstram que a metodologia empregada
 3 para quantificação de viabilidade é aplicável a matrizes de esgoto, mesmo em alta
 4 turbidez.

5 Oocistos viáveis de *Cryptosporidium* chegam em altas concentrações
 6 à ETE e com redução da concentração ocasionada pelo tratamento, esses oocistos
 7 atingem o corpo hídrico receptor ainda em altas cargas. Apesar do baixo número de
 8 acompanhamentos que foram realizados, a variabilidade entre os valores de
 9 persistência ressalta a necessidade do monitoramento de oocistos de
 10 *Cryptosporidium* em efluente de esgoto, para evitar prejuízos à saúde humana e
 11 animal.

12 6.6 AGRADECIMENTOS

13 Ao fomento da CAPES e Fundação Araucária e assistência essencial de todos os
 14 colaboradores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UEL e do
 15 Serviço Autônomo Municipal de Água e Esgoto de Ibiporã para a realização deste
 16 estudo.
 17

18 6.7 REFERÊNCIAS

19 ADEYEMO, F. E.; SINGH, G.; REDDY, P.; STENSTRÖM, T. A. Methods for the
 20 detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based
 21 tools in clinical and environmental regimes. **Acta Tropica**, v. 184, n. February, p. 15–
 22 28, ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.011>>.

23 ALONSO, J. L.; AMORÓS, I.; GUY, R. A. Quantification of viable *Giardia* cysts and
 24 *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-
 25 time PCR. **Parasitology Research**, v. 113, n. 7, p. 2671–2678, 2014.

26 BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites:
 27 Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. **Water Research**, v. 45, n.
 28 20, p. 6603–6614, dez. 2011. Disponível em:
 29 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>>.

30 BRASIL. **Panorama - Ibiporã**. Disponível em:
 31 <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/ibipora/panorama>>. Acesso em: 28 jul. 2020.

32 BURNET, J. B.; OGORZALY, L.; TISSIER, A.; PENNY, C.; CAUCHIE, H. M. Novel
 33 quantitative TaqMan real-time PCR assays for detection of *Cryptosporidium* at the
 34

- 1 genus level and genotyping of major human and cattle-infecting species. **Journal of**
2 **Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 1211–1222, abr. 2013. Disponível em:
3 <<http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12103>>.
- 4 CANTUSIO NETO, R.; DOS SANTOS, L. U.; SATO, M. I. Z.; FRANCO, R. M. B.
5 *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, Southeast
6 Brazil. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 217–222, 2010.
- 7 CAVALIER-SMITH, T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of
8 gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa.
9 **European Journal of Protistology**, v. 50, n. 5, p. 472–495, 2014. Disponível em:
10 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84907558926&doi=10.1016%2Fj.ejop.2014.07.002&partnerID=40&md5=f1f512bb99e2e25acbc5351f170750f5)
11 [84907558926&doi=10.1016%2Fj.ejop.2014.07.002&partnerID=40&md5=f1f512bb99](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84907558926&doi=10.1016%2Fj.ejop.2014.07.002&partnerID=40&md5=f1f512bb99e2e25acbc5351f170750f5)
12 [e2e25acbc5351f170750f5](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84907558926&doi=10.1016%2Fj.ejop.2014.07.002&partnerID=40&md5=f1f512bb99e2e25acbc5351f170750f5)>.
- 13 DARAEI, H.; CONTI, G. O.; SAHLABADI, F.; THAI, V. N.; GHOLIPOUR, S.; TURKI,
14 H. Prevalence of *Cryptosporidium* spp . in water: a global systematic review and meta-
15 analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 10, 2020. Disponível
16 em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-020-11261-6>>.
- 17 DE MEDEIROS, G. A.; DE LIMA TRESMONDI, A. C. C.; DE QUEIROZ, B. P. V.;
18 FENGLER, F. H.; ROSA, A. H.; FIALHO, J. M.; LOPES, R. S.; NEGRO, C. V.; DOS
19 SANTOS, L. F.; RIBEIRO, A. I. Water quality, pollutant loads, and multivariate analysis
20 of the effects of sewage discharges into urban streams of Southeast Brazil. **Energy,**
21 **Ecology and Environment**, v. 2, n. 4, p. 259–276, 28 ago. 2017. Disponível em:
22 <<http://link.springer.com/10.1007/s40974-017-0062-y>>.
- 23 DEVAULT, D. A.; LÉVI, Y.; KAROLAK, S. Applying sewage epidemiology approach to
24 estimate illicit drug consumption in a tropical context: Bias related to sewage
25 temperature and pH. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 252–258,
26 abr. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.114>>.
- 27 DURIGAN, M.; ABREU, A. G.; ZUCCHI, M. I.; FRANCO, R. M. B.; DE SOUZA, A. P.
28 Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus genotyping reveals zoonotic
29 potential between clinical and environmental sources in a metropolitan region of brazil.
30 **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014. Disponível em:
31 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84920265250&doi=10.1371%2Fjournal.pone.0115489&partnerID=40&md5=f6aea78cef1015d0b40013a652a39745)
32 [84920265250&doi=10.1371%2Fjournal.pone.0115489&partnerID=40&md5=f6aea78](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84920265250&doi=10.1371%2Fjournal.pone.0115489&partnerID=40&md5=f6aea78cef1015d0b40013a652a39745)
33 [cef1015d0b40013a652a39745](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84920265250&doi=10.1371%2Fjournal.pone.0115489&partnerID=40&md5=f6aea78cef1015d0b40013a652a39745)>.
- 34 EMCDDA. **Assessing illicit drugs in wastewater: advances in wastewater-based**

- 1 **drug epidemiology**. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2016.
- 2 FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species
3 and *Giardiasis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110–140, 1 jan. 2011.
- 4 Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-78751544529&doi=10.1128%252FCMR.00033-10&partnerID=40&md5=8c46fddd127992c5ad2e486b21147a16>>. Acesso em: 1 nov.
7 2017.
- 8 IBIPORÃ. **Dados Geográficos**. Disponível em:
9 <<https://www.ibipora.pr.gov.br/pagina/1229/dados-geograficos>>. Acesso em: 28 jul.
10 2020a.
- 11 IBIPORÃ. **Sistema de esgoto - Ibiporã**. Disponível em:
12 <http://samaeibi.com.br/pagina/157_Sistema-de-Esgoto.html>. Acesso em: 28 jul.
13 2020b.
- 14 KATES, L. N.; KNAPP, C. W.; KEENAN, H. E. Acute and chronic environmental effects
15 of clandestine methamphetamine waste. **Science of The Total Environment**, v. 493,
16 p. 781–788, set. 2014. Disponível em:
17 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.066>>.
- 18 KIMURA, A.; KARANIS, P.; MALTEZOS, E.; SEITZ, H. M. Bench Scale Experiments
19 to Evaluate the Usefulness of Sucrose Flotation Techniques for Separation of
20 *Cryptosporidium* Oocysts from Water. **The Journal of Protozoology Research**, v. 10,
21 n. 3, p. 155–165, 2000.
- 22 KING, B.; FANOK, S.; PHILLIPS, R.; LAU, M.; VAN DEN AKKER, B.; MONIS, P.
23 *Cryptosporidium* Attenuation across the Wastewater Treatment Train: Recycled Water
24 Fit for Purpose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 5, p.
25 AEM.03068-16, 1 mar. 2017. Disponível em:
26 <<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03068-16>>.
- 27 LANGKJAER, R. B.; VIGRE, H.; ENEMARK, H. L.; MADDOX-HYTTEL, C. Molecular
28 and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle
29 in Denmark. **Parasitology**, v. 134, n. 03, p. 339, 1 mar. 2007. Disponível em:
30 <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182006001533>.
- 31 LIANG, Z.; KEELEY, A. Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and
32 reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium*
33 oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. **Water
34 Research**, v. 46, n. 18, p. 5941–5953, 2012. Disponível em:

- 1 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.014>>.
- 2 MA, J.; FENG, Y.; HU, Y.; VILLEGAS, E. N.; XIAO, L. Human infective potential of
3 *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in urban
4 wastewater treatment plant effluents. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 3, p.
5 411–423, jun. 2016. Disponível em:
6 <[https://iwaponline.com/jwh/article/14/3/411/28472/Human-infective-potential-of-](https://iwaponline.com/jwh/article/14/3/411/28472/Human-infective-potential-of-Cryptosporidium-spp)
7 *Cryptosporidium*-spp>.
- 8 MA, L.; ZHANG, X.; JIAN, Y.; LI, X.; WANG, G.; HU, Y.; KARANIS, P. Detection of
9 *Cryptosporidium* and *Giardia* in the slaughterhouse, sewage and river waters of the
10 Qinghai Tibetan plateau area (QTPA), China. **Parasitology Research**, v. 118, n. 7, p.
11 2041–2051, 17 jul. 2019. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/s00436-](http://link.springer.com/10.1007/s00436-019-06330-w)
12 019-06330-w>.
- 13 MAO, K.; ZHANG, K.; DU, W.; ALI, W.; FENG, X.; ZHANG, H. The potential of
14 wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious
15 disease outbreaks. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 17, n.
16 January, p. 1–7, out. 2020. Disponível em:
17 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468584420300337>>.
- 18 MARTINS, F. D. C.; LADEIA, W. A.; TOLEDO, R. dos S.; GARCIA, J. L.; NAVARRO,
19 I. T.; FREIRE, R. L. Surveillance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage from an
20 urban area in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2961, p. 1–
21 7, 2019. Disponível em:
22 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612019005007112&tlng=en)
23 29612019005007112&tlng=en>.
- 24 MEDEMA, G.; TEUNIS, P.; BLOKKER, M.; DEERE, D.; DAVISON, A.; CHARLES, P.;
25 LORET, J.-F. **WHO Guidelines for Drinking Water Quality: *Cryptosporidium***
26 **World Health Organization**. [s.l.: s.n.].
- 27 MOK, H.-F.; BARKER, S. F.; HAMILTON, A. J. A probabilistic quantitative microbial
28 risk assessment model of norovirus disease burden from wastewater irrigation of
29 vegetables in Shepparton, Australia. **Water Research**, v. 54, p. 347–362, maio 2014.
30 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.060>>.
- 31 NASSER, A. M. Removal of *Cryptosporidium* by wastewater treatment processes: A
32 review. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2016.
- 33 NGUYEN, T. T.; TRAUB, R.; PHAM, P. D.; NGUYEN, H. V.; NGUYEN, K. C.; PHUNG,
34 C. D.; DALSGAARD, A. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium*

- 1 spp. and *Giardia* spp. in environmental samples in Hanam province, Vietnam. **Food**
2 **and Waterborne Parasitology**, v. 3, p. 13–20, 2016. Disponível em:
3 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.03.003>>.
- 4 PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and
5 epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene and**
6 **Environmental Health**, v. 213, n. 5, p. 321–333, 2010. Disponível em:
7 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.06.005>>.
- 8 RAMO, A.; DEL CACHO, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; QUÍLEZ, J. Occurrence and
9 genetic diversity of *Cryptosporidium* and *Giardia* in urban wastewater treatment plants
10 in north-eastern Spain. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 628–638, 2017.
11 Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85018632535&doi=10.1016%2Fj.scitotenv.2017.04.097&partnerID=40&md5=8d3a95053229d172b1e8f8d6a73a11e0>>.
- 14 ROUSSEAU, A.; LA CARBONA, S.; DUMÈTRE, A.; ROBERTSON, L. J.; GARGALA,
15 G.; ESCOTTE-BINET, S.; FAVENNEC, L.; VILLENA, I.; GÉRARD, C.; AUBERT, D.
16 Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts)
17 of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of
18 methods. **Parasite**, v. 25, n. 14, p. 14, 19 mar. 2018. Disponível em:
19 <<https://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2018009>>.
- 20 RYAN, U.; HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research.
21 **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 6, p. 367–373, maio 2015.
22 Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751915000478>>.
23 Acesso em: 1 nov. 2017.
- 24 RYAN, U.; PAPANINI, A.; MONIS, P.; HIJJAWI, N. It's official – *Cryptosporidium* is a
25 gregarine: What are the implications for the water industry? **Water Research**, v. 105,
26 p. 305–313, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.013>>.
- 27 SANTOS, L. U. dos; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R. M. B.; GUIMARÃES, J. R.
28 Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras
29 de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. **Engenharia Sanitaria e**
30 **Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 115–120, jun. 2011. Disponível em:
31 <http://www.scielo.br/pdf/esa/v16n2/v16n2a03.pdf%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522011000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.
- 33 SILVA, F. M. P. e; LOPES, R. S.; ARAÚJO-JUNIOR, J. P. Identification of
34 *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. **Revista Brasileira de**

- 1 **Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 22–28, mar. 2013. Disponível em:
2 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612013000100022&lng=en&tlng=en)
3 29612013000100022&lng=en&tlng=en>.
- 4 SILVA JÚNIOR, F. A.; CARVALHO, A. H. O.; ROCHA, C. M. B. M.; GUIMARÃES, A.
5 M. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia*
6 *duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das
7 Vertentes de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 690–696,
8 ago. 2011. Disponível em:
9 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000800010&lng=pt&tlng=pt)
10 736X2011000800010&lng=pt&tlng=pt>.
- 11 SIQUEIRA-CASTRO, I. C. V.; GREINERT-GOULART, J. A.; BONATTI, T. R.;
12 YAMASHIRO, S.; FRANCO, R. M. B. First report of predation of *Giardia* sp. cysts by
13 ciliated protozoa and confirmation of predation of *Cryptosporidium* spp. oocysts by
14 ciliate species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p.
15 11357–11362, 2016. Disponível em:
16 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84964336902&doi=10.1007%2Fs11356-016-6689-y&partnerID=40&md5=e99e7cd5120b666d54e2c279a53dfeb1)
17 84964336902&doi=10.1007%2Fs11356-016-6689-
18 y&partnerID=40&md5=e99e7cd5120b666d54e2c279a53dfeb1>.
- 19 TARAN-BENSHOSHAN, M.; OFER, N.; DALIT, V.; AHARONI, A.; REVHUN, M.;
20 NITZAN, Y.; NASSER, A. M. *Cryptosporidium* and *Giardia* removal by secondary and
21 tertiary wastewater treatment. **Journal of Environmental Science and Health, Part**
22 **A**, v. 50, n. 12, p. 1265–1273, 15 out. 2015. Disponível em:
23 <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10934529.2015.1055152>>.
- 24 TAYLOR, M. J.; BENTHAM, R. H.; ROSS, K. E. Limitations of Using Propidium
25 Monoazide with qPCR to Discriminate between Live and Dead *Legionella* in Biofilm
26 Samples. **Microbiology insights**, v. 7, p. 15–24, 2014. Disponível em:
27 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288885>>. Acesso em: 9 maio. 2019.
- 28 TOLEDO, R. D. S.; MARTINS, F. D. C.; FERREIRA, F. P.; DE ALMEIDA, J. C.;
29 OGAWA, L.; DOS SANTOS, H. L. E. P. L.; DOS SANTOS, M. M.; PINHEIRO, F. A.;
30 NAVARRO, I. T.; GARCIA, J. L.; FREIRE, R. L. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp.
31 in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. **PLOS ONE**, v.
32 12, n. 4, p. e0175311, 12 abr. 2017. Disponível em:
33 <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0175311>>.
- 34 TONANI, K. A. A.; PADULA, J. A.; JULIÃO, F. C.; FREGONESI, B. M.; ALVES, R. I.

1 S.; SAMPAIO, C. F.; BEDA, C. F.; HACHICH, E. M.; SEGURA-MUÑOZ, S. I.
2 Persistence of *Giardia*, *Cryptosporidium*, Rotavirus, and Adenovirus in Treated
3 Sewage in São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 6, p. 1144–
4 1147, 2013. Disponível em:
5 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23718640>%5Cn[http://www.bioone.org/doi/abs/](http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/12-121.1)
6 10.1645/12-121.1%5Cn[http://www.bioone.org/doi/10.1645/12-121.1?url_ver=Z39.88-](http://www.bioone.org/doi/10.1645/12-121.1?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed)
7 2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed>.
8 TROEGER, C.; BLACKER, B. F.; KHALIL, I. A.; RAO, P. C.; CAO, S.; ZIMSEN, S. R.;
9 ALBERTSON, S. B.; STANAWAY, J. D.; DESHPANDE, A.; ABEBE, Z.; ALVIS-
10 GUZMAN, N.; AMARE, A. T.; ASGEDOM, S. W.; ANTENEH, Z. A.; ANTONIO, C. A.
11 T.; AREMU, O.; ASFAW, E. T.; ATEY, T. M.; ATIQUE, S.; AVOKPAHO, E. F. G. A.;
12 AWASTHI, A.; AYELE, H. T.; BARAC, A.; BARRETO, M. L.; BASSAT, Q.; BELAY, S.
13 A.; BENSENOR, I. M.; BHUTTA, Z. A.; BIJANI, A.; BIZUNEH, H.; CASTAÑEDA-
14 ORJUELA, C. A.; DADI, A. F.; DANDONA, L.; DANDONA, R.; DO, H. P.; DUBEY, M.;
15 DUBLJANIN, E.; EDESSA, D.; ENDRIES, A. Y.; ESHRATI, B.; FARAG, T.; FEYISSA,
16 G. T.; FOREMAN, K. J.; FOROUZANFAR, M. H.; FULLMAN, N.; GETHING, P. W.;
17 GISHU, M. D.; GODWIN, W. W.; GUGNANI, H. C.; GUPTA, R.; HAILU, G. B.;
18 HASSEN, H. Y.; HIBSTU, D. T.; ILESANMI, O. S.; JONAS, J. B.; KAHSAY, A.; KANG,
19 G.; KASAEIAN, A.; KHADER, Y. S.; KHALIL, I. A.; KHAN, E. A.; KHAN, M. A.; KHANG,
20 Y.-H.; KISSOON, N.; KOCHHAR, S.; KOTLOFF, K. L.; KOYANAGI, A.; KUMAR, G.
21 A.; MAGDY ABD EL RAZEK, H.; MALEKZADEH, R.; MALTA, D. C.; MEHATA, S.;
22 MENDOZA, W.; MENGISTU, D. T.; MENOTA, B. G.; MEZGEBE, H. B.; MLASHU, F.
23 W.; MURTHY, S.; NAIK, G. A.; NGUYEN, C. T.; NGUYEN, T. H.; NINGRUM, D. N. A.;
24 OGBO, F. A.; OLAGUNJU, A. T.; PAUDEL, D.; PLATTS-MILLS, J. A.; QORBANI, M.;
25 RAFAY, A.; RAI, R. K.; RANA, S. M.; RANABHAT, C. L.; RASELLA, D.; RAY, S. E.;
26 REIS, C.; RENZAHO, A. M.; REZAI, M. S.; RUHAGO, G. M.; SAFIRI, S.; SALOMON,
27 J. A.; SANABRIA, J. R.; SARTORIUS, B.; SAWHNEY, M.; SEPANLOU, S. G.;
28 SHIGEMATSU, M.; SISAY, M.; SOMAYAJI, R.; SREERAMAREDDY, C. T.; SYKES,
29 B. L.; TAFFERE, G. R.; TOPOR-MADRY, R.; TRAN, B. X.; TUEM, K. B.; UKWAJA, K.
30 N.; VOLLSET, S. E.; WALSON, J. L.; WEAVER, M. R.; WELDEGWERGS, K. G.;
31 WERDECKER, A.; WORKICHO, A.; YENESEW, M.; YIRSAW, B. D.; YONEMOTO,
32 N.; EL SAYED ZAKI, M.; VOS, T.; LIM, S. S.; NAGHAVI, M.; MURRAY, C. J.;
33 MOKDAD, A. H.; HAY, S. I.; REINER, R. C. Estimates of the global, regional, and
34 national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic

- 1 analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Infectious**
2 **Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1211–1228, nov. 2018. Disponível em:
3 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918303621>>.
- 4 UNITED STATES OF AMERICA. **Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in**
5 **Water by Filtration/IMS/FA.** [s.l.: s.n.].
- 6 VAN DYKE, M. I.; ONG, C. S. L. L.; PRYSTAJECKY, N. A.; ISAAC-RENTON, J. L.;
7 HUCK, P. M. Identifying host sources, human health risk and indicators of
8 *Cryptosporidium* and *Giardia* in a Canadian watershed influenced by urban and rural
9 activities. **Journal of Water and Health**, v. 10, n. 2, p. 311–323, 1 jun. 2012.
10 Disponível em: <[https://iwaponline.com/jwh/article/10/2/311/2621/Identifying-host-](https://iwaponline.com/jwh/article/10/2/311/2621/Identifying-host-sources-human-health-risk-and)
11 [sources-human-health-risk-and](https://iwaponline.com/jwh/article/10/2/311/2621/Identifying-host-sources-human-health-risk-and)>.
- 12 VAN NUIJS, A. L. N.; MOUGEL, J.-F.; TARCOMNICU, I.; BERVOETS, L.; BLUST, R.;
13 JORENS, P. G.; NEELS, H.; COVACI, A. Sewage epidemiology — A real-time
14 approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium.
15 **Environment International**, v. 37, n. 3, p. 612–621, abr. 2011. Disponível em:
16 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.12.006>>.
- 17 XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; FAYER, R.;
18 LAL, A. a; MORGAN, U. N. a M.; ESCALANTE, A. Genetic Diversity within
19 *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. **Applied and**
20 **Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3386–3391, 1999.
- 21 XIAO, S.; HU, S.; ZHANG, Y.; ZHAO, X.; PAN, W. Influence of sewage treatment plant
22 effluent discharge into multipurpose river on its water quality: A quantitative health risk
23 assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Environmental Pollution**, v. 233, p.
24 797–805, fev. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.010>>.
- 25 YOUNG, I.; SMITH, B. A.; FAZIL, A. A systematic review and meta-analysis of the
26 effects of extreme weather events and other weather-related variables on
27 *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh surface waters. **Journal of Water and Health**,
28 v. 13, n. 1, p. 1–17, 1 mar. 2015. Disponível em:
29 <[https://iwaponline.com/jwh/article/13/1/1/28212/A-systematic-review-and-](https://iwaponline.com/jwh/article/13/1/1/28212/A-systematic-review-and-metaanalysis-of-the)
30 [metaanalysis-of-the](https://iwaponline.com/jwh/article/13/1/1/28212/A-systematic-review-and-metaanalysis-of-the)>.
- 31

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A verificação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em afluente de ETE permitiu entender que possivelmente ambos se apresentam de forma endêmica na população que abastece o esgoto. A quantificação de oocistos permitiu o levantamento de um alerta quanto a caracterização dessa população abastecedora, porque o esgoto pode ter sofrido interferência de despejos ilegais de águas residuais. A alta frequência de parasitas viáveis no esgoto tratado evidencia a constante contaminação do corpo hídrico com (oo)cistos.

A persistência de (oo)cistos viáveis é suficiente para questionar a influência desses parasitas em sistemas de irrigação adjacentes ao rio receptor. Isso porque dificilmente esses protozoários podem atingir sistemas de abastecimentos de água devido à proximidade do despejo de esgoto a foz do corpo hídrico receptor e a ausência de perímetro urbano na região. Mesmo não atingindo diretamente o consumo humano, esses parasitas podem ser transmitidos de forma indireta, por consumo de alimentos irrigados ou lavados com água contaminada. Esses alertas indicam a necessidade da continuidade do monitoramento associado: a avaliação de risco de infecção, para evitar riscos à saúde pública; e ao potencial de depuração do rio receptor, considerando esses protozoários mais resistentes, para evitar risco a saúde ambiental.

Tanto os dados qualitativos quanto os quantitativos comparando as alíquotas com e sem PMA apresentaram resultados coerentes. Isso por conta da observação de menores frequências e concentrações verificadas em alíquotas com PMA em detrimento de amostras sem PMA. Dessa forma, a metodologia de concentração e purificação propostas para o uso, em associação com PMA-PCR e PMA-qPCR, para avaliação de viabilidade de oocistos em esgoto, mostrou-se aplicável a matriz de esgoto.

REFERÊNCIAS

- 1
- 2 ADEYEMO, F. E.; SINGH, G.; REDDY, P.; STENSTRÖM, T. A. Methods for the
3 detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based
4 tools in clinical and environmental regimes. **Acta Tropica**, v. 184, n. February, p. 15–
5 28, ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.011>>.
- 6 ALONSO, J. L.; AMORÓS, I.; GUY, R. A. Quantification of viable *Giardia* cysts and
7 *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-
8 time PCR. **Parasitology Research**, v. 113, n. 7, p. 2671–2678, 2014.
- 9 ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M. I.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M.
10 J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁZQUEZ, S.; NIETO, J. M. *Cryptosporidium*
11 *scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot
12 *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and
13 histopathological study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 62, n. 1–2, p. 133–145,
14 2004. Disponível em: <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
15 11144315367&partnerID=40&md5=3d0a020b70b7fb10417160b5ffca9579](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-11144315367&partnerID=40&md5=3d0a020b70b7fb10417160b5ffca9579)>.
- 16 ASSIS, D. C.; RESENDE, D. V.; CABRINE-SANTOS, M.; CORREIA, D.; OLIVEIRA-
17 SILVA, M. B. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and
18 *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. **Revista do Instituto de Medicina**
19 **Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 3, p. 149–154, jun. 2013. Disponível em:
20 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
21 84886935687&partnerID=40&md5=281d133f0f7be328ab2fe9b24d68aaa4](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84886935687&partnerID=40&md5=281d133f0f7be328ab2fe9b24d68aaa4)>.
- 22 AYED, L. B.; YANG, W.; WIDMER, G.; CAMA, V.; ORTEGA, Y.; XIAO, L. Survey and
23 genetic characterization of wastewater in Tunisia for *Cryptosporidium* spp., *Giardia*
24 *duodenalis*, *Enterocytozoon bienersi*, *Cyclospora cayentanensis* and *Eimeria* spp.
25 **Journal of Water and Health**, v. 10, n. 3, p. 431–444, 2012. Disponível em:
26 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
27 84866302344&doi=10.2166%2Fwh.2012.204&partnerID=40&md5=351545ba0be9c4
28 131e8baa27219519cb](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84866302344&doi=10.2166%2Fwh.2012.204&partnerID=40&md5=351545ba0be9c4131e8baa27219519cb)>.
- 29 BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites:
30 Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. **Water Research**, v. 45, n.
31 20, p. 6603–6614, dez. 2011. Disponível em:
32 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>>.
- 33 BAQUE, R. H.; GILLIAM, A. O.; ROBLES, L. D.; JAKUBOWSKI, W.; SLIFKO, T. R. A
34 real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental

- 1 waters. **Water Research**, v. 45, n. 10, p. 3175–3184, 2011. Disponível em:
2 <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-79955456565&doi=10.1016%2Fj.watres.2011.03.032&partnerID=40&md5=7965acaf1068a2012b14dec7e1df9807>>.
- 3
4
5 BEER, K. D.; COLLIER, S. A.; DU, F.; GARGANO, J. W. *Giardiasis* Diagnosis and
6 Treatment Practices Among Commercially Insured Persons in the United States.
7 **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 9, p. 1244–1250, 1 maio 2017. Disponível em:
8 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>>.
- 9 BELOSEVIC, M.; FAUBERT, G. M.; GUY, R.; MACLEAN, J. D. Observations on
10 natural and experimental infections with *Giardia* isolated from cats. **Canadian journal**
11 **of comparative medicine and veterinary science**, v. 48, n. 3, p. 241–244, 1984.
12 Disponível em:
13 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6478295>.
- 14
15 BERRILLI, F.; D'ALFONSO, R.; GIANGASPERO, A.; MARANGI, M.; BRANDONISIO,
16 O.; KABORÉ, Y.; GLÉ, C.; CIANFANELLI, C.; LAURO, R.; DI CAVE, D. *Giardia*
17 *duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals
18 in Côte d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination.
19 **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 3,
20 p. 191–195, mar. 2012. Disponível em:
21 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.12.005>>.
- 22 BERTRAND, I.; SCHWARTZBROD, J. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis*
23 in wastewater: Relation between assemblages and faecal contamination origin. **Water**
24 **Research**, v. 41, n. 16, p. 3675–3682, 2007. Disponível em:
25 <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-34547458636&doi=10.1016%2Fj.watres.2007.02.043&partnerID=40&md5=170921a6b03b588bba002b91e1b9bea9>>.
- 26
27
28 BIOTIUM. **Cell Viability and Cell Death**. Disponível em: <<https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/Cell-Viability-and-Cell-Death.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2019.
- 29
30 BOLLAND, S. J.; ZAHEDI, A.; OSKAM, C.; MURPHY, B.; RYAN, U. *Cryptosporidium*
31 *bollandi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiae) from angelfish (*Pterophyllum scalare*)
32 and Oscar fish (*Astronotus ocellatus*). **Experimental Parasitology**, v. 217, n. March,
33 p. 107956, out. 2020. Disponível em:
34 <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107956>>.

- 1 BRASIL. **Atlas Esgotos - Despoluição de bacias hidrográficas**. [s.l: s.n.].
- 2 BRASIL. **Panorama - Ibiporã**. Disponível em:
- 3 <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/ibipora/panorama>>. Acesso em: 28 jul. 2020.
- 4 BUDU-AMOAKO, E.; GREENWOOD, S. J.; DIXON, B. R.; BARKEMA, H. W.;
- 5 MCCLURE, J. T. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* on beef farms and water
- 6 sources within the vicinity of the farms on Prince Edward Island, Canada. **Veterinary**
- 7 **Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 1–9, fev. 2012. Disponível em:
- 8 <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401711006868>>. Acesso em: 1 nov.
- 9 2017.
- 10 BURNET, J. B.; OGORZALY, L.; TISSIER, A.; PENNY, C.; CAUCHIE, H. M. Novel
- 11 quantitative TaqMan real-time PCR assays for detection of *Cryptosporidium* at the
- 12 genus level and genotyping of major human and cattle-infecting species. **Journal of**
- 13 **Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 1211–1222, abr. 2013. Disponível em:
- 14 <<http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12103>>.
- 15 CANO, L.; DE LUCIO, A.; BAILO, B.; CARDONA, G. A.; MUADICA, A. S. O.; LOBO,
- 16 L.; CARMENA, D. Identification and genotyping of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium*
- 17 spp. isolates in aquatic birds in the Salburua wetlands, Álava, Northern Spain.
- 18 **Veterinary Parasitology**, v. 221, p. 144–148, 2016.
- 19 CANTUSIO NETO, R.; DOS SANTOS, L. U.; SATO, M. I. Z.; FRANCO, R. M. B.
- 20 *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, Southeast
- 21 Brazil. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 217–222, 2010.
- 22 CAVALIER-SMITH, T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of
- 23 gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa.
- 24 **European Journal of Protistology**, v. 50, n. 5, p. 472–495, 2014. Disponível em:
- 25 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84907558926&doi=10.1016%2Fj.ejop.2014.07.002&partnerID=40&md5=f1f512bb99e2e25acbc5351f170750f5)
- 26 [84907558926&doi=10.1016%2Fj.ejop.2014.07.002&partnerID=40&md5=f1f512bb99](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84907558926&doi=10.1016%2Fj.ejop.2014.07.002&partnerID=40&md5=f1f512bb99e2e25acbc5351f170750f5)
- 27 [e2e25acbc5351f170750f5](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84907558926&doi=10.1016%2Fj.ejop.2014.07.002&partnerID=40&md5=f1f512bb99e2e25acbc5351f170750f5)>.
- 28 CERTAD, G.; DUPOUY-CAMET, J.; GANTOIS, N.; HAMMOUMA-GHELBOUN, O.;
- 29 POTTIER, M.; GUYOT, K.; BENAMROUZ, S.; OSMAN, M.; DELAIRE, B.; CREUSY,
- 30 C.; VISCOGLIOSI, E.; DEI-CAS, E.; ALIOUAT-DENIS, C. M.; FOLLET, J. Identification
- 31 of *Cryptosporidium* Species in Fish from Lake Geneva (Lac Lemman) in France. **PLOS**
- 32 **ONE**, v. 10, n. 7, jul. 2015.
- 33 CHAGAS, C. F. R.; GONZALEZ, I. H. L.; SALGADO, P. A. B.; RODRIGUES, B.;
- 34 RAMOS, P. L. *Giardia* spp ., ten years of parasitological data in the biggest zoo of Latin

- 1 America. **Annals of Parasitology**, v. 65, n. April, p. 35–51, 2019.
- 2 CHAURET, C.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Fate of *Cryptosporidium* oocysts,
3 *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic
4 sludge digestion. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 257–262, 1999.
5 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10408099>>.
- 6 COLLI, C. M.; BEZAGIO, R. C.; NISHI, L.; FERREIRA, É. C.; FALAVIGNA-
7 GUILHERME, A. L.; GOMES, M. L. Food handlers as a link in the chain of transmission
8 of *Giardia duodenalis* and other protozoa in public schools in southern Brazil.
9 **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n.
10 9, p. 601–603, set. 2015. Disponível em:
11 <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84944057585&doi=10.1093%2Ftrstmh%2Ftrv062&partnerID=40&md5=7ce05e042e5aa13b3e9a2f23a6f9a1db>>.
- 12 ČONDLOVÁ, Š.; HORČIČKOVÁ, M.; SAK, B.; KVĚTOŇOVÁ, D.; HLÁSKOVÁ, L.;
13 KONEČNÝ, R.; STANKO, M.; MCEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium* apodemi sp.
14 n. and *Cryptosporidium* ditrichi sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Apodemus
15 spp. **European Journal of Protistology**, v. 63, p. 1–12, abr. 2018. Disponível em:
16 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0932473917301712>>.
- 17 DA CUNHA, M. J. R.; CURY, M. C.; SANTÍN, M. Molecular identification of
18 Enterocytozoon bienensei, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Brazilian captive birds.
19 **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 487–493, 4 fev. 2017. Disponível em:
20 <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5309-6>>.
- 21 DA CUNHA, M. J. R.; CURY, M. C.; SANTÍN, M. Molecular characterization of
22 *Cryptosporidium* spp. in poultry from Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 118,
23 n. October 2017, p. 331–335, jun. 2018. Disponível em:
24 <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.03.010>>.
- 25 DANIELS, M. E.; SHRIVASTAVA, A.; SMITH, W. A.; SAHU, P.; ODAGIRI, M.; MISRA,
26 P. R.; PANIGRAHI, P.; SUAR, M.; CLASEN, T.; JENKINS, M. W. *Cryptosporidium* and
27 *Giardia* in humans, domestic animals, and village water sources in rural India.
28 **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 3, p. 596–600, 2015.
29 Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84941627944&doi=10.4269%2Fajtmh.15-0111&partnerID=40&md5=5bd1ace55de120c066aed5d3d5bbd3f2>>.
- 30 DARAIEI, H.; CONTI, G. O.; SAHLABADI, F.; THAI, V. N.; GHOLIPOUR, S.; TURKI,
31
32
33
34

- 1 H. Prevalence of *Cryptosporidium* spp . in water: a global systematic review and meta-
2 analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 10, 2020. Disponível
3 em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-020-11261-6>>.
- 4 DE MEDEIROS, G. A.; DE LIMA TRESMONDI, A. C. C.; DE QUEIROZ, B. P. V.;
5 FENGLER, F. H.; ROSA, A. H.; FIALHO, J. M.; LOPES, R. S.; NEGRO, C. V.; DOS
6 SANTOS, L. F.; RIBEIRO, A. I. Water quality, pollutant loads, and multivariate analysis
7 of the effects of sewage discharges into urban streams of Southeast Brazil. **Energy,**
8 **Ecology and Environment**, v. 2, n. 4, p. 259–276, 28 ago. 2017. Disponível em:
9 <<http://link.springer.com/10.1007/s40974-017-0062-y>>.
- 10 DEVAULT, D. A.; LÉVI, Y.; KAROLAK, S. Applying sewage epidemiology approach to
11 estimate illicit drug consumption in a tropical context: Bias related to sewage
12 temperature and pH. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 252–258,
13 abr. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.114>>.
- 14 DOMENECH, E.; AMORÓS, I.; MORENO, Y.; ALONSO, J. L. *Cryptosporidium* and
15 *Giardia* safety margin increase in leafy green vegetables irrigated with treated
16 wastewater. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 221, n.
17 1, p. 112–119, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.009>>.
- 18 DURIGAN, M.; ABREU, A. G.; ZUCCHI, M. I.; FRANCO, R. M. B.; DE SOUZA, A. P.
19 Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus genotyping reveals zoonotic
20 potential between clinical and environmental sources in a metropolitan region of Brazil.
21 **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014. Disponível em:
22 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
23 84920265250&doi=10.1371%2Fjournal.pone.0115489&partnerID=40&md5=f6aea78
24 cef1015d0b40013a652a39745](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84920265250&doi=10.1371%2Fjournal.pone.0115489&partnerID=40&md5=f6aea78cef1015d0b40013a652a39745)>.
- 25 EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Evolution of monitoring for *Giardia*
26 and *Cryptosporidium* in water. **Water Research**, v. 123, p. 96–112, out. 2017.
27 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.042>>.
- 28 EMCDDA. **Assessing illicit drugs in wastewater: advances in wastewater-based
29 drug epidemiology**. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2016.
- 30 FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary
31 Parasitology**, v. 126, n. 1–2, p. 37–56, dez. 2004. Disponível em:
32 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401704004066>>.
- 33 FENG, Y.; RYAN, U. M.; XIAO, L. Genetic Diversity and Population Structure of
34 *Cryptosporidium*. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 11, p. 997–1011, 2018. Disponível

- 1 em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.07.009>>.
- 2 FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species
3 and *Giardiasis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110–140, 1 jan. 2011.
4 Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-78751544529&doi=10.1128%252FCMR.00033-10&partnerID=40&md5=8c46fddd127992c5ad2e486b21147a16>>. Acesso em: 1 nov.
5 2017.
6 FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. **Veterinary
7 Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 13–36, 2009.
8 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.013>>.
- 9 GARCIA-R, J. C.; FRENCH, N.; PITA, A.; VELATHANTHIRI, N.; SHRESTHA, R.;
10 HAYMAN, D. Local and global genetic diversity of protozoan parasites: Spatial
11 distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes. **PLoS Neglected Tropical
12 Diseases**, v. 11, n. 7, 2017. Disponível em:
13 <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85026705751&doi=10.1371%2Fjournal.pntd.0005736&partnerID=40&md5=633b7a6d19b9fc8fd447368a8f1fcf57>>.
- 14 GAUT, S.; ROBERTSON, L.; GJERDE, B.; DAGESTAD, A.; BRATTLI, B. Occurrence
15 of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Norwegian groundwater wells in
16 bedrock. **Journal of Water and Health**, v. 6, n. 3, p. 383–388, set. 2008. Disponível
17 em: <[https://iwaponline.com/jwh/article/6/3/383/7860/Occurrence-of-Cryptosporidium-
18 oocysts-and-Giardia](https://iwaponline.com/jwh/article/6/3/383/7860/Occurrence-of-Cryptosporidium-oocysts-and-Giardia)>.
- 19 GRANDJEAN, A. **Water Requirements, Impinging Factors, and Recommended
20 Intakes** World Health Organization. [s.l.: s.n.]. Disponível em:
21 <https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/nutwaterrequir.pdf>.
- 22 HELMY, Y. A.; KRÜCKEN, J.; ABDELWHAB, E.-S. M.; VON SAMSON-
23 HIMMELSTJERNA, G.; HAFEZ, H. M. Molecular diagnosis and characterization of
24 *Cryptosporidium* spp. in turkeys and chickens in Germany reveals evidence for
25 previously undetected parasite species. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 2017. Disponível em:
26 <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85020257551&doi=10.1371%2Fjournal.pone.0177150&partnerID=40&md5=dab7f476f7ba8b31a272b9ac9fbb9e8d>>.
- 27 HEYWORTH, M. F. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. **Parasite**, v.
28 23, p. 13, 16 mar. 2016. Disponível em: <[http://www.parasite-](http://www.parasite-
29 30 31 32 33 34)

- 1 journal.org/10.1051/parasite/2016013>. Acesso em: 1 nov. 2017.
- 2 HILLMAN, A.; ASH, A.; ELLIOT, A.; LYMBERY, A.; PEREZ, C.; THOMPSON, R. C. A.
3 Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isoodon*
4 *obesulus*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 5, n.
5 1, p. 110–115, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.01.002>>.
- 6 HOFSTRA, N.; BOUWMAN, A. F.; BEUSEN, A. H. W.; MEDEMA, G. J. Exploring
7 global *Cryptosporidium* emissions to surface water. **Science of The Total**
8 **Environment**, v. 442, p. 10–19, jan. 2013. Disponível em:
9 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.013>>.
- 10 HOLUBOVÁ, N.; SAK, B.; HORČIČKOVÁ, M.; HLÁSKOVÁ, L.; KVĚTOŇOVÁ, D.;
11 MENCHACA, S.; MCEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa:
12 Cryptosporidiidae) in birds. **Parasitology Research**, v. 115, n. 6, p. 2243–2251, 2016.
- 13 HOLUBOVÁ, N.; TŮMOVÁ, L.; SAK, B.; HEJZLAROVÁ, A.; KONEČNÝ, R.; MCEVOY,
14 J.; KVÁČ, M. Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa:
15 Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 340, 8 dez.
16 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04191-2>>.
- 17 HOLUBOVÁ, N.; ZIKMUNDOVÁ, V.; LIMPOUCHOVÁ, Z.; SAK, B.; KONEČNÝ, R.;
18 HLÁSKOVÁ, L.; RAJSKÝ, D.; KOPACZ, Z.; MCEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium*
19 *proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. **European**
20 **Journal of Protistology**, v. 69, p. 70–87, 2019.
- 21 IBIPORÃ. **Dados Geográficos**. Disponível em:
22 <<https://www.ibipora.pr.gov.br/pagina/1229/dados-geograficos>>. Acesso em: 28 jul.
23 2020a.
- 24 IBIPORÃ. **Sistema de esgoto - Ibioporã**. Disponível em:
25 <http://samaeibi.com.br/pagina/157_Sistema-de-Esgoto.html>. Acesso em: 28 jul.
26 2020b.
- 27 JENKINS, M. B.; LIOTTA, J. L.; LUCIO-FORSTER, A.; BOWMAN, D. D.
28 Concentrations, viability, and distribution of *Cryptosporidium* genotypes in lagoons of
29 swine facilities in the southern Piedmont and in coastal plain watersheds of Georgia.
30 **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 17, p. 5757–5763, 2010.
31 Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77956577797&doi=10.1128%2FAEM.00434-10&partnerID=40&md5=c505f756d47ebd10bdd86fc65c0353bf>>.
- 32
33
34 JEŽKOVÁ, J.; HOREČKOVÁ, M.; HLÁSKOVÁ, L.; SAK, B.; KVĚTONOVÁ, D.;

- 1 NOVÁK, J.; HOFMANNOVÁ, L.; MCEVOY, J.; KVÁC, M. *Cryptosporidium testudinis*
2 sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium tortoise*
3 genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. **Folia Parasitologica**, v. 63,
4 2016. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85013342475&doi=10.14411%2Ffp.2016.035&partnerID=40&md5=f7b0d963cf5f9250f9ed67dd960a307c>>.
- 7 JEŽKOVÁ, J.; PREDIGER, J.; HOLUBOVÁ, N.; SAK, B.; KONEČNÝ, R.; FENG, Y.;
8 XIAO, L.; ROST, M.; MCEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium ratti* n. sp.
9 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in
10 brown rats (*Rattus norvegicus*) in the Czech Republic. **Parasitology**, v. 148, n. 1, p.
11 84–97, 28 jan. 2021. Disponível em:
12 <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182020001833/type/journal](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182020001833/type/journal_article)
13 _article>.
- 14 JIANG, W.; ROELLIG, D. M.; LI, N.; WANG, L.; GUO, Y.; FENG, Y.; XIAO, L.
15 Contribution of hospitals to the occurrence of enteric protists in urban wastewater.
16 **Parasitology Research**, v. 119, n. 9, p. 3033–3040, 4 set. 2020. Disponível em:
17 <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-020-06834-w>>.
- 18 KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan
19 parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and**
20 **Health**, v. 5, p. 1–18, 2007.
- 21 KATES, L. N.; KNAPP, C. W.; KEENAN, H. E. Acute and chronic environmental effects
22 of clandestine methamphetamine waste. **Science of The Total Environment**, v. 493,
23 p. 781–788, set. 2014. Disponível em:
24 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.066>>.
- 25 KESERUE, H.-A.; FÜCHSLIN, H. P.; EGLI, T. Rapid Detection and Enumeration of
26 *Giardia lamblia* Cysts in Water Samples by Immunomagnetic Separation and Flow
27 Cytometric Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p.
28 5420–5427, 1 ago. 2011. Disponível em:
29 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-79961076740&doi=10.1128%2FAEM.00416-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-79961076740&doi=10.1128%2FAEM.00416-11&partnerID=40&md5=52bae39f59b495397797c904bd2d992f)
30 [11&partnerID=40&md5=52bae39f59b495397797c904bd2d992f](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-79961076740&doi=10.1128%2FAEM.00416-11&partnerID=40&md5=52bae39f59b495397797c904bd2d992f)>.
- 32 KHAN, A.; SHAIK, J. S.; GRIGG, M. E. **Genomics and molecular epidemiology of**
33 ***Cryptosporidium* species** *Acta Tropica* Elsevier, , 2018. . Disponível em:
34 <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.023>>.

- 1 KHURANA, S.; CHAUDHARY, P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. **Tropical**
2 **Parasitology**, v. 8, n. 1, p. 2–7, 2018.
- 3 KIMURA, A.; KARANIS, P.; MALTEZOS, E.; SEITZ, H. M. Bench Scale Experiments
4 to Evaluate the Usefulness of Sucrose Flotation Techniques for Separation of
5 *Cryptosporidium* Oocysts from Water. **The Journal of Protozoology Research**, v. 10,
6 n. 3, p. 155–165, 2000.
- 7 KING, B.; FANOK, S.; PHILLIPS, R.; LAU, M.; VAN DEN AKKER, B.; MONIS, P.
8 *Cryptosporidium* Attenuation across the Wastewater Treatment Train: Recycled Water
9 Fit for Purpose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 5, p.
10 AEM.03068-16, 1 mar. 2017. Disponível em:
11 <<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03068-16>>.
- 12 KIRK, M. D.; PIRES, S. M.; BLACK, R. E.; CAIPO, M.; CRUMP, J. A.;
13 DEVLEESSCHAUWER, B.; DÖPFER, D.; FAZIL, A.; FISCHER-WALKER, C. L.;
14 HALD, T.; HALL, A. J.; KEDDY, K. H.; LAKE, R. J.; LANATA, C. F.; TORGERSON, P.
15 R.; HAVELAAR, A. H.; ANGULO, F. J. World Health Organization Estimates of the
16 Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral
17 Diseases, 2010: A Data Synthesis. **PLOS Medicine**, v. 12, n. 12, p. e1001921, 3 dez.
18 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1001921>>.
- 19 KOOH, P.; THÉBAULT, A.; CADAVEZ, V.; GONZALES-BARRON, U.; VILLENA, I.
20 Microbial Risk Analysis Risk factors for sporadic cryptosporidiosis: A systematic
21 review and meta-analysis. **Microbial Risk Analysis**, n. November 2019, p. 100116,
22 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mran.2020.100116>>.
- 23 KVÁČ, M.; HAVRDOVÁ, N.; HLÁSKOVÁ, L.; DAŇKOVÁ, T.; KANDĚRA, J.; JEŽKOVÁ,
24 J.; VÍTOVEC, J.; SAK, B.; ORTEGA, Y.; XIAO, L.; MODRÝ, D.; JESUDOSS
25 CHELLADURAI, J. R. J.; PRANTLOVÁ, V.; MCEVOY, J. *Cryptosporidium* proliferans
26 n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic
27 species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016.
28 Disponível em: <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84955306478&doi=10.1371%2Fjournal.pone.0147090&partnerID=40&md5=49d325ff](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84955306478&doi=10.1371%2Fjournal.pone.0147090&partnerID=40&md5=49d325ff0a43d5457c80a6fe42e2fa01)
29 [0a43d5457c80a6fe42e2fa01](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84955306478&doi=10.1371%2Fjournal.pone.0147090&partnerID=40&md5=49d325ff0a43d5457c80a6fe42e2fa01)>.
- 30
31 KVÁČ, M.; HOFMANNOVÁ, L.; HLÁSKOVÁ, L.; KVĚTOŇOVÁ, D.; VÍTOVEC, J.;
32 MCEVOY, J.; SAK, B. *Cryptosporidium* erinacei n. sp. (Apicomplexa:
33 Cryptosporidiidae) in hedgehogs. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1–2, p. 9–17,
34 mar. 2014a. Disponível em:

- 1 <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401714000417>>. Acesso em: 1 nov.
2 2017.
- 3 KVÁČ, M.; MCEVOY, J.; STENGER, B.; CLARK, M. Cryptosporidiosis in Other
4 Vertebrates. In: ***Cryptosporidium: parasite and disease***. Vienna: Springer Vienna,
5 2014b. p. 237–323.
- 6 KVÁČ, M.; VLNATÁ, G.; JEŽKOVÁ, J.; HORČIČKOVÁ, M.; KONEČNÝ, R.;
7 HLÁSKOVÁ, L.; MCEVOY, J.; SAK, B. *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa:
8 Cryptosporidiidae) in rats. **European Journal of Protistology**, v. 63, p. 96–104, abr.
9 2018. Disponível em:
10 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0932473918300014>>.
- 11 LAKE, I. R.; HARRISON, F. C. D.; CHALMERS, R. M.; BENTHAM, G.; NICHOLS, G.;
12 HUNTER, P. R.; KOVATS, R. S.; GRUNDY, C. Case-control study of environmental
13 and social factors influencing cryptosporidiosis. **European Journal of Epidemiology**,
14 v. 22, n. 11, p. 805–811, 2007.
- 15 LANGKJAER, R. B.; VIGRE, H.; ENEMARK, H. L.; MADOOX-HYTTEL, C. Molecular
16 and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle
17 in Denmark. **Parasitology**, v. 134, n. 03, p. 339, 1 mar. 2007. Disponível em:
18 <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182006001533>.
- 19 LI, N.; XIAO, L.; WANG, L.; ZHAO, S.; ZHAO, X.; DUAN, L.; GUO, M.; LIU, L.; FENG,
20 Y. Molecular Surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and
21 *Enterocytozoon bieneusi* by Genotyping and Subtyping Parasites in Wastewater.
22 **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, 2012. Disponível em:
23 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
24 84866933652&doi=10.1371%2Fjournal.pntd.0001809&partnerID=40&md5=c3f60da5
25 ca55558f106274db07489615](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84866933652&doi=10.1371%2Fjournal.pntd.0001809&partnerID=40&md5=c3f60da5ca55558f106274db07489615)>.
- 26 LI, X.; PEREIRA, M. D. G. C.; LARSEN, R.; XIAO, C.; PHILLIPS, R.; STRIBY, K.;
27 MCCOWAN, B.; ATWILL, E. R. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa:
28 Cryptosporidiidae) in multiple Spermophilus ground squirrel species. **International
29 Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 3, p. 343–350, 2015.
30 Disponível em: <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
31 84941272654&doi=10.1016%2Fj.ijppaw.2015.08.005&partnerID=40&md5=fe9d887b9
32 058965b1a6acaf1786ae9bf](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84941272654&doi=10.1016%2Fj.ijppaw.2015.08.005&partnerID=40&md5=fe9d887b9058965b1a6acaf1786ae9bf)>.
- 33 LIANG, Z.; KEELEY, A. Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and
34 reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium*

- 1 oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. **Water**
2 **Research**, v. 46, n. 18, p. 5941–5953, 2012. Disponível em:
3 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.014>>.
- 4 LIN, Q.; WANG, X.-Y.; CHEN, J.-W.; DING, L.; ZHAO, G.-H. *Cryptosporidium suis*
5 infection in post-weaned and adult pigs in Shaanxi Province, Northwestern China.
6 **Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 1, p. 113–117, 2015. Disponível em:
7 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
8 84924410958&doi=10.3347%2Fkjp.2015.53.1.113&partnerID=40&md5=09e53e4006
9 1848206bee20e6a597cc60](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84924410958&doi=10.3347%2Fkjp.2015.53.1.113&partnerID=40&md5=09e53e40061848206bee20e6a597cc60)>.
- 10 LIU, A.; JI, H.; WANG, E.; LIU, J.; XIAO, L.; SHEN, Y.; LI, Y.; ZHANG, W.; LING, H.
11 Molecular identification and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis* in
12 raw urban wastewater in Harbin, China. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 913–
13 918, 2011. Disponível em: <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
14 80052325467&doi=10.1007%2Fs00436-011-2333-
15 4&partnerID=40&md5=68979e2d54d57ee3a7f9ff1ba6e434f8](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-80052325467&doi=10.1007%2Fs00436-011-2333-4&partnerID=40&md5=68979e2d54d57ee3a7f9ff1ba6e434f8)>.
- 16 LYU, Z.; SHAO, J.; XUE, M.; YE, Q.; CHEN, B.; QIN, Y.; WEN, J. A new species of
17 *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcomastigophora: Hexamitidae) in hamsters. **Parasites &**
18 **Vectors**, v. 11, n. 1, p. 202, 20 dez. 2018. Disponível em:
19 <[https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2786-
20 8](https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2786-8)>.
- 21 MA, J.; FENG, Y.; HU, Y.; VILLEGAS, E. N.; XIAO, L. Human infective potential of
22 *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bienersi* in urban
23 wastewater treatment plant effluents. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 3, p.
24 411–423, jun. 2016. Disponível em:
25 <[https://iwaponline.com/jwh/article/14/3/411/28472/Human-infective-potential-of-
26 Cryptosporidium-spp](https://iwaponline.com/jwh/article/14/3/411/28472/Human-infective-potential-of-Cryptosporidium-spp)>.
- 27 MA, L.; ZHANG, X.; JIAN, Y.; LI, X.; WANG, G.; HU, Y.; KARANIS, P. Detection of
28 *Cryptosporidium* and *Giardia* in the slaughterhouse, sewage and river waters of the
29 Qinghai Tibetan plateau area (QTPA), China. **Parasitology Research**, v. 118, n. 7, p.
30 2041–2051, 17 jul. 2019. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/s00436-
31 019-06330-w](http://link.springer.com/10.1007/s00436-019-06330-w)>.
- 32 MAO, K.; ZHANG, K.; DU, W.; ALI, W.; FENG, X.; ZHANG, H. The potential of
33 wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious
34 disease outbreaks. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 17, n.

- 1 January, p. 1–7, out. 2020. Disponível em:
2 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468584420300337>>.
- 3 MARTINS, F. D. C.; LADEIA, W. A.; TOLEDO, R. dos S.; GARCIA, J. L.; NAVARRO,
4 I. T.; FREIRE, R. L. Surveillance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage from an
5 urban area in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2961, p. 1–
6 7, 2019. Disponível em:
7 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612019005007112&tlng=en)
8 29612019005007112&tlng=en>.
- 9 MEDEMA, G.; TEUNIS, P.; BLOKKER, M.; DEERE, D.; DAVISON, A.; CHARLES, P.;
10 LORET, J.-F. **WHO Guidelines for Drinking Water Quality: *Cryptosporidium*** World
11 **Health Organization**. [s.l: s.n.].
- 12 MOK, H.-F.; BARKER, S. F.; HAMILTON, A. J. A probabilistic quantitative microbial
13 risk assessment model of norovirus disease burden from wastewater irrigation of
14 vegetables in Shepparton, Australia. **Water Research**, v. 54, p. 347–362, maio 2014.
15 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.060>>.
- 16 MONIS, P. T.; CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Giardia*: towards a
17 taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 93–100, fev.
18 2009. Disponível em:
19 <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492208002894>>. Acesso em: 1 nov.
20 2017.
- 21 MURPHY, H. M.; PRIOLEAU, M. D.; BORCHARDT, M. A.; HYNDIS, P. D. Review:
22 Epidemiological evidence of groundwater contribution to global enteric disease, 1948–
23 2015. **Hydrogeology Journal**, v. 25, n. 4, p. 981–1001, 18 jun. 2017. Disponível em:
24 <<http://link.springer.com/10.1007/s10040-017-1543-y>>.
- 25 NAKADA, L. Y. K. **Cistos de *Giardia* spp.: detecção em água bruta de estações de**
26 **tratamento de água e avaliação de eficiência de desinfetantes químicos por**
27 **Reação de Imunofluorescência Direta, Propídio Monoazida conjugado com a**
28 **Reação em Cadeia da Polimerase, e ensaio in vi**. 2018. Universidade Estadual de
29 Campinas, 2018.
- 30 NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. *Cryptosporidium* infections in birds -a review.
31 **Braz. J. Vet. Parasitol. Jaboticabal**, v. 24, n. 3, p. 253–267, 2015. Disponível em:
32 <www.cbpv.org.br/rbpv%5Cnwww.cbpv.org.br/rbpv>.
- 33 NASSER, A. M. Removal of *Cryptosporidium* by wastewater treatment processes: A
34 review. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2016.

- 1 NGUYEN, T. T.; TRAUB, R.; PHAM, P. D.; NGUYEN, H. V.; NGUYEN, K. C.; PHUNG,
2 C. D.; DALSGAARD, A. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium*
3 spp. and *Giardia* spp. in environmental samples in Hanam province, Vietnam. **Food**
4 **and Waterborne Parasitology**, v. 3, p. 13–20, 2016. Disponível em:
5 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.03.003>>.
- 6 PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and
7 epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene and**
8 **Environmental Health**, v. 213, n. 5, p. 321–333, 2010. Disponível em:
9 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.06.005>>.
- 10 RADSTROM, P.; LOFSTROM, C.; LOVENKLEV, M.; KNUTSSON, R.; WOLFFS, P.
11 Strategies for Overcoming PCR Inhibition. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2008, n.
12 4, p. pdb.top20-pdb.top20, 1 mar. 2008. Disponível em:
13 <<http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.top20>>.
- 14 RAMO, A.; DEL CACHO, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; QUÍLEZ, J. Occurrence and
15 genetic diversity of *Cryptosporidium* and *Giardia* in urban wastewater treatment plants
16 in north-eastern Spain. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 628–638, 2017.
17 Disponível em: <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
18 85018632535&doi=10.1016%2Fj.scitotenv.2017.04.097&partnerID=40&md5=8d3a95
19 053229d172b1e8f8d6a73a11e0](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85018632535&doi=10.1016%2Fj.scitotenv.2017.04.097&partnerID=40&md5=8d3a95053229d172b1e8f8d6a73a11e0)>.
- 20 ROBERTSON, L. J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B. K. Occurrence of
21 *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. **Applied and**
22 **Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5297–5303, 2006.
- 23 ROUSSEAU, A.; LA CARBONA, S.; DUMÈTRE, A.; ROBERTSON, L. J.; GARGALA,
24 G.; ESCOTTE-BINET, S.; FAVENNEC, L.; VILLENA, I.; GÉRARD, C.; AUBERT, D.
25 Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts)
26 of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of
27 methods. **Parasite**, v. 25, n. 14, p. 14, 19 mar. 2018. Disponível em:
28 <<https://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2018009>>.
- 29 RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**,
30 v. 124, n. 1, p. 113–120, 2010. Disponível em:
31 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
32 72449184619&doi=10.1016%2Fj.exppara.2009.02.002&partnerID=40&md5=639096f
33 2acc3d6d6aaf0d0e6c18a1df1](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-72449184619&doi=10.1016%2Fj.exppara.2009.02.002&partnerID=40&md5=639096f2acc3d6d6aaf0d0e6c18a1df1)>.
- 34 RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal for**

- 1 **Parasitology**, v. 43, n. 12–13, p. 943–956, nov. 2013. Disponível em:
2 <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84884702292&doi=10.1016%2Fj.ijpara.2013.06.001&partnerID=40&md5=5fda92754bc0a37e31b9a7739201f9db>>.
- 3
4
5 RYAN, U.; HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research.
6 **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 6, p. 367–373, maio 2015.
7 Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751915000478>>.
8 Acesso em: 1 nov. 2017.
- 9 RYAN, U.; LAWLER, S.; REID, S. Limiting swimming pool outbreaks of
10 cryptosporidiosis -the roles of regulations, staff, patrons and research. **Journal of**
11 **Water and Health**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2017.
- 12 RYAN, U.; PAPARINI, A.; MONIS, P.; HIJJAWI, N. It's official – *Cryptosporidium* is a
13 gregarine: What are the implications for the water industry? **Water Research**, v. 105,
14 p. 305–313, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.013>>.
- 15 RYAN, U.; PAPARINI, A.; TONG, K.; YANG, R.; GIBSON-KUEH, S.; O'HARA, A.;
16 LYMBERY, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium* huwi n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from
17 the guppy (*Poecilia reticulata*). **Experimental Parasitology**, v. 150, p. 31–35, 2015.
18 Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84927028072&doi=10.1016%2Fj.exppara.2015.01.009&partnerID=40&md5=e4da8743ea235eb86a9fe3441c3c3c91>>.
- 19
20
21 RYAN, U.; ZAHEDI, A.; PAPARINI, A. *Cryptosporidium* in humans and animals-a one
22 health approach to prophylaxis. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 9, p. 535–547, set.
23 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/pim.12350>>. Acesso em: 1 nov.
24 2017.
- 25 SANTANA, B. N.; KURAHARA, B.; NAKAMURA, A. A.; DA SILVA CAMARGO, V.;
26 FERRARI, E. D.; DA SILVA, G. S.; NAGATA, W. B.; MEIRELES, M. V. Detection and
27 characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in three chicken
28 production systems in Brazil using different molecular diagnosis protocols. **Preventive**
29 **Veterinary Medicine**, v. 151, n. September 2017, p. 73–78, mar. 2018. Disponível em:
30 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587717306451>>.
- 31 SANTOS, L. U. dos; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R. M. B.; GUIMARÃES, J. R.
32 Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras
33 de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. **Engenharia Sanitaria e**
34 **Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 115–120, jun. 2011. Disponível em:

- 1 <http://www.scielo.br/pdf/esa/v16n2/v16n2a03.pdf%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522011000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.
- 2
- 3 SATO, M. I. Z.; GALVANI, A. T.; PADULA, J. A.; NARDOCCI, A. C.; LAURETTO, M.
4 de S.; RAZZOLINI, M. T. P.; HACHICH, E. M. Assessing the infection risk of *Giardia*
5 and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in
6 Sao Paulo State, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 442, p. 389–396, 2013.
7 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.077>>.
- 8 SEVÁ, A. da P.; FUNADA, M. R.; SOUZA, S. de O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.;
9 SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp.
10 isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments
11 in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de**
12 **Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 249–253, 2012.
- 13 SILVA, F. M. P. e; LOPES, R. S.; ARAÚJO-JUNIOR, J. P. Identification of
14 *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. **Revista Brasileira de**
15 **Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 22–28, mar. 2013. Disponível em:
16 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-
17 29612013000100022&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612013000100022&lng=en&tlng=en)>.
- 18 SILVA JÚNIOR, F. A.; CARVALHO, A. H. O.; ROCHA, C. M. B. M.; GUIMARÃES, A.
19 M. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia*
20 *duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das
21 Vertentes de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 690–696,
22 ago. 2011. Disponível em:
23 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-
24 736X2011000800010&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000800010&lng=pt&tlng=pt)>.
- 25 SIQUEIRA-CASTRO, I. C. V; GREINERT-GOULART, J. A.; BONATTI, T. R.;
26 YAMASHIRO, S.; FRANCO, R. M. B. First report of predation of *Giardia* sp. cysts by
27 ciliated protozoa and confirmation of predation of *Cryptosporidium* spp. oocysts by
28 ciliate species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p.
29 11357–11362, 2016. Disponível em:
30 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
31 84964336902&doi=10.1007%2Fs11356-016-6689-
32 y&partnerID=40&md5=e99e7cd5120b666d54e2c279a53dfb1](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84964336902&doi=10.1007%2Fs11356-016-6689-y&partnerID=40&md5=e99e7cd5120b666d54e2c279a53dfb1)>.
- 33 ŠLAPETA, J. **Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and**
34 **humans: A thirty colour rainbow?** **International Journal for Parasitology**, nov.

- 1 2013. Disponível em:
 2 <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751913002026>>. Acesso em: 1 nov.
 3 2017.
- 4 SOARES, R.; TASCA, T. *Giardiasis*: an update review on sensitivity and specificity of
 5 methods for laboratorial diagnosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 129, p.
 6 98–102, out. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.017>>.
- 7 SQUIRE, S. A.; RYAN, U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future
 8 challenges. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 195, 20 dez. 2017. Disponível em:
 9 <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2111->
 10 [y](http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2111-y)>.
- 11 TARAN-BENSHOSHAN, M.; OFER, N.; DALIT, V.; AHARONI, A.; REVHUN, M.;
 12 NITZAN, Y.; NASSER, A. M. *Cryptosporidium* and *Giardia* removal by secondary and
 13 tertiary wastewater treatment. **Journal of Environmental Science and Health, Part**
 14 **A**, v. 50, n. 12, p. 1265–1273, 15 out. 2015. Disponível em:
 15 <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10934529.2015.1055152>>.
- 16 TAYLOR, M. J.; BENTHAM, R. H.; ROSS, K. E. Limitations of Using Propidium
 17 Monoazide with qPCR to Discriminate between Live and Dead *Legionella* in Biofilm
 18 Samples. **Microbiology insights**, v. 7, p. 15–24, 2014. Disponível em:
 19 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288885>>. Acesso em: 9 maio. 2019.
- 20 THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and
 21 *Cryptosporidium* infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, p. 315–323,
 22 jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.028>>. Acesso
 23 em: 1 nov. 2017.
- 24 THOMPSON, R. C. A.; SMITH, A. Zoonotic enteric protozoa. **Veterinary**
 25 **Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 70–78, 2011. Disponível em:
 26 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.016>>.
- 27 THOMSON, S.; HAMILTON, C. A.; HOPE, J. C.; KATZER, F.; MABBOTT, N. A.;
 28 MORRISON, L. J.; INNES, E. A. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite
 29 interaction and control strategies. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 42, 11 dez.
 30 2017. Disponível em:
 31 <<http://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-017-0447-0>>.
- 32 TIYO, R.; SOUZA, C. Z. de; NISHI, L.; BRUSTOLIN, C. F.; RATTI, B. A.; FALAVIGNA
 33 GUILHERME, A. L. Water from different sources used for the irrigation of vegetables
 34 to be marketed: research on *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., and coliforms in

- 1 Paraná, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4,
 2 p. 333–336, 2015. Disponível em:
 3 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652015000400333&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
 4 [46652015000400333&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652015000400333&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.
- 5 TOLEDO, R. D. S.; MARTINS, F. D. C.; FERREIRA, F. P.; DE ALMEIDA, J. C.;
 6 OGAWA, L.; DOS SANTOS, H. L. E. P. L.; DOS SANTOS, M. M.; PINHEIRO, F. A.;
 7 NAVARRO, I. T.; GARCIA, J. L.; FREIRE, R. L. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp.
 8 in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. **PLOS ONE**, v.
 9 12, n. 4, p. e0175311, 12 abr. 2017. Disponível em:
 10 <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0175311>>.
- 11 TONANI, K. A. A.; PADULA, J. A.; JULIÃO, F. C.; FREGONESI, B. M.; ALVES, R. I.
 12 S.; SAMPAIO, C. F.; BEDA, C. F.; HACHICH, E. M.; SEGURA-MUÑOZ, S. I.
 13 Persistence of *Giardia* , *Cryptosporidium* , Rotavirus, and Adenovirus in Treated
 14 Sewage in São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 6, p. 1144–
 15 1147, 2013. Disponível em:
 16 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23718640>%5Cn[http://www.bioone.org/doi/abs/](http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/12-121.1)
 17 [10.1645/12-121.1](http://www.bioone.org/doi/10.1645/12-121.1?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed)%5Cn[http://www.bioone.org/doi/10.1645/12-121.1?url_ver=Z39.88-](http://www.bioone.org/doi/10.1645/12-121.1?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed)
 18 [2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed](http://www.bioone.org/doi/10.1645/12-121.1?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed)>.
- 19 TROEGER, C.; BLACKER, B. F.; KHALIL, I. A.; RAO, P. C.; CAO, S.; ZIMSEN, S. R.;
 20 ALBERTSON, S. B.; STANAWAY, J. D.; DESHPANDE, A.; ABEBE, Z.; ALVIS-
 21 GUZMAN, N.; AMARE, A. T.; ASGEDOM, S. W.; ANTENEH, Z. A.; ANTONIO, C. A.
 22 T.; AREMU, O.; ASFAW, E. T.; ATEY, T. M.; ATIQUE, S.; AVOKPAHO, E. F. G. A.;
 23 AWASTHI, A.; AYELE, H. T.; BARAC, A.; BARRETO, M. L.; BASSAT, Q.; BELAY, S.
 24 A.; BENSENOR, I. M.; BHUTTA, Z. A.; BIJANI, A.; BIZUNEH, H.; CASTAÑEDA-
 25 ORJUELA, C. A.; DADI, A. F.; DANDONA, L.; DANDONA, R.; DO, H. P.; DUBEY, M.;
 26 DUBLJANIN, E.; EDESSA, D.; ENDRIES, A. Y.; ESHRATI, B.; FARAG, T.; FEYISSA,
 27 G. T.; FOREMAN, K. J.; FOROUZANFAR, M. H.; FULLMAN, N.; GETHING, P. W.;
 28 GISHU, M. D.; GODWIN, W. W.; GUGNANI, H. C.; GUPTA, R.; HAILU, G. B.;
 29 HASSEN, H. Y.; HIBSTU, D. T.; ILESANMI, O. S.; JONAS, J. B.; KAHSAY, A.; KANG,
 30 G.; KASAEIAN, A.; KHADER, Y. S.; KHALIL, I. A.; KHAN, E. A.; KHAN, M. A.; KHANG,
 31 Y.-H.; KISSOON, N.; KOCHHAR, S.; KOTLOFF, K. L.; KOYANAGI, A.; KUMAR, G.
 32 A.; MAGDY ABD EL RAZEK, H.; MALEKZADEH, R.; MALTA, D. C.; MEHATA, S.;
 33 MENDOZA, W.; MENGISTU, D. T.; MENOTA, B. G.; MEZGEBE, H. B.; MLASHU, F.
 34 W.; MURTHY, S.; NAIK, G. A.; NGUYEN, C. T.; NGUYEN, T. H.; NINGRUM, D. N. A.;

- 1 OGBO, F. A.; OLAGUNJU, A. T.; PAUDEL, D.; PLATTS-MILLS, J. A.; QORBANI, M.;
2 RAFAY, A.; RAI, R. K.; RANA, S. M.; RANABHAT, C. L.; RASELLA, D.; RAY, S. E.;
3 REIS, C.; RENZHO, A. M.; REZAI, M. S.; RUHAGO, G. M.; SAFIRI, S.; SALOMON,
4 J. A.; SANABRIA, J. R.; SARTORIUS, B.; SAWHNEY, M.; SEPANLOU, S. G.;
5 SHIGEMATSU, M.; SISAY, M.; SOMAYAJI, R.; SREERAMAREDDY, C. T.; SYKES,
6 B. L.; TAFFERE, G. R.; TOPOR-MADRY, R.; TRAN, B. X.; TUEM, K. B.; UKWAJA, K.
7 N.; VOLLSET, S. E.; WALSON, J. L.; WEAVER, M. R.; WELDEGWERGS, K. G.;
8 WERDECKER, A.; WORKICHO, A.; YENESEW, M.; YIRSAW, B. D.; YONEMOTO,
9 N.; EL SAYED ZAKI, M.; VOS, T.; LIM, S. S.; NAGHAVI, M.; MURRAY, C. J.;
10 MOKDAD, A. H.; HAY, S. I.; REINER, R. C. Estimates of the global, regional, and
11 national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic
12 analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Infectious**
13 **Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1211–1228, nov. 2018. Disponível em:
14 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918303621>>.
- 15 TYSNES, K. R.; ROBERTSON, L. J. Establishment of Canine-Derived *Giardia*
16 *duodenalis* Isolates in Culture. **Journal of Parasitology**, v. 102, n. 3, p. 342–348, jun.
17 2016. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/10.1645/15-910>>.
- 18 ULLOA-STANOJLOVIĆ, F. M.; AGUIAR, B.; JARA, L. M.; SATO, M. I. Z.;
19 GUERRERO, J. A.; HACHICH, E.; MATTÉ, G. R.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; DE
20 ARAÚJO, R. S. Occurrence of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* sp. in
21 wastewater samples from São Paulo State, Brazil, and Lima, Peru. **Environmental**
22 **Science and Pollution Research**, v. 23, n. 21, p. 22197–22205, 9 nov. 2016.
23 Disponível em: <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84986275103&doi=10.1007%2Fs11356-016-7537-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84986275103&doi=10.1007%2Fs11356-016-7537-9&partnerID=40&md5=7ba3403a7660da2c2ec78abaac932ae1)
24 [9&partnerID=40&md5=7ba3403a7660da2c2ec78abaac932ae1](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84986275103&doi=10.1007%2Fs11356-016-7537-9&partnerID=40&md5=7ba3403a7660da2c2ec78abaac932ae1)>.
- 25 UNITED STATES OF AMERICA. **Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in**
26 **Water by Filtration/IMS/FA.** [s.l: s.n.].
- 27 UPTON, S. J.; ZIEN, C. A. Description of a *Giardia* varani-like flagellate from a water
28 monitor, *Varanus salvator*, from Malaysia. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 5,
29 p. 970–971, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379313>>.
- 30 VAN DYKE, M. I.; ONG, C. S. L. L.; PRYSTAJECKY, N. A.; ISAAC-RENTON, J. L.;
31 HUCK, P. M. Identifying host sources, human health risk and indicators of
32 *Cryptosporidium* and *Giardia* in a Canadian watershed influenced by urban and rural
33 activities. **Journal of Water and Health**, v. 10, n. 2, p. 311–323, 1 jun. 2012.
34

- 1 Disponível em: <[https://iwaponline.com/jwh/article/10/2/311/2621/Identifying-host-](https://iwaponline.com/jwh/article/10/2/311/2621/Identifying-host-sources-human-health-risk-and)
2 [sources-human-health-risk-and](https://iwaponline.com/jwh/article/10/2/311/2621/Identifying-host-sources-human-health-risk-and)>.
- 3 VAN NUIJS, A. L. N.; MOUGEL, J.-F.; TARCOMNICU, I.; BERVOETS, L.; BLUST, R.;
4 JORENS, P. G.; NEELS, H.; COVACI, A. Sewage epidemiology — A real-time
5 approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium.
6 **Environment International**, v. 37, n. 3, p. 612–621, abr. 2011. Disponível em:
7 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.12.006>>.
- 8 WANG, L.; XUE, X.; LI, J.; ZHOU, Q.; YU, Y.; DU, A. Cryptosporidiosis in broiler
9 chickens in Zhejiang Province, China: Molecular characterization of oocysts detected
10 in fecal samples. **Parasite**, v. 21, 2014. Disponível em:
11 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84905255065&doi=10.1051%2Fparasite%2F2014035&partnerID=40&md5=32a10eb7adc8df6db5973887373b12a7)
12 [84905255065&doi=10.1051%2Fparasite%2F2014035&partnerID=40&md5=32a10eb](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84905255065&doi=10.1051%2Fparasite%2F2014035&partnerID=40&md5=32a10eb7adc8df6db5973887373b12a7)
13 [7adc8df6db5973887373b12a7](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84905255065&doi=10.1051%2Fparasite%2F2014035&partnerID=40&md5=32a10eb7adc8df6db5973887373b12a7)>.
- 14 WHO. **Guidelines for the Safe Use of Wastewater Excreta and Greywater**. 1. ed.
15 Switzerland: WHO Press, 2006. v. IV
- 16 WHO. **Guidelines on sanitation and health**. Switzerland: WHO, 2018.
- 17 WHO. **Sanitation**. June.
- 18 WINKWORTH, C. L.; MATTHAEI, C. D.; TOWNSEND, C. R. Using native riparian
19 barriers to reduce *Giardia* in agricultural runoff to freshwater ecosystems. **Journal of**
20 **Water and Health**, v. 8, n. 4, p. 631–645, dez. 2010. Disponível em:
21 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77956683894&doi=10.2166%2Fwh.2010.105&partnerID=40&md5=05539b59db07dea63c7f5a9999085158)
22 [77956683894&doi=10.2166%2Fwh.2010.105&partnerID=40&md5=05539b59db07de](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77956683894&doi=10.2166%2Fwh.2010.105&partnerID=40&md5=05539b59db07dea63c7f5a9999085158)
23 [a63c7f5a9999085158](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77956683894&doi=10.2166%2Fwh.2010.105&partnerID=40&md5=05539b59db07dea63c7f5a9999085158)>.
- 24 WOODS, K. M.; NESTERENKO, M. V.; UPTON, S. J. Development of a microtitre
25 ELISA to quantify development of *Cryptosporidium parvum* in vitro. **FEMS**
26 **Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, p. 89–94, 15 abr. 1995. Disponível em:
27 <[http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097\(95\)00088-M](http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097(95)00088-M)>.
- 28 XIAO, L.; FENG, Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens
29 *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Food and Waterborne Parasitology**,
30 2017. Disponível em: <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85030460599&doi=10.1016%2Fj.fawpar.2017.09.002&partnerID=40&md5=29cf503b9ddd2a2cce1028109792760c)
31 [85030460599&doi=10.1016%2Fj.fawpar.2017.09.002&partnerID=40&md5=29cf503b](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85030460599&doi=10.1016%2Fj.fawpar.2017.09.002&partnerID=40&md5=29cf503b9ddd2a2cce1028109792760c)
32 [9ddd2a2cce1028109792760c](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85030460599&doi=10.1016%2Fj.fawpar.2017.09.002&partnerID=40&md5=29cf503b9ddd2a2cce1028109792760c)>.
- 33 XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; FAYER, R.;
34 LAL, A. a; MORGAN, U. N. a M.; ESCALANTE, A. Genetic Diversity within

- 1 *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. **Applied and**
2 **Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3386–3391, 1999.
- 3 XIAO, S.; HU, S.; ZHANG, Y.; ZHAO, X.; PAN, W. Influence of sewage treatment plant
4 effluent discharge into multipurpose river on its water quality: A quantitative health risk
5 assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Environmental Pollution**, v. 233, p.
6 797–805, fev. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.010>>.
- 7 YANG, R.; REID, A.; LYMBERY, A.; RYAN, U. Identification of zoonotic *Giardia*
8 genotypes in fish. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 7, p. 779–785,
9 jun. 2010. Disponível em:
10 <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751909004512>>. Acesso em: 1 nov.
11 2017.
- 12 YOUNG, I.; SMITH, B. A.; FAZIL, A. A systematic review and meta-analysis of the
13 effects of extreme weather events and other weather-related variables on
14 *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh surface waters. **Journal of Water and Health**,
15 v. 13, n. 1, p. 1–17, 1 mar. 2015. Disponível em:
16 <[https://iwaponline.com/jwh/article/13/1/1/28212/A-systematic-review-and-](https://iwaponline.com/jwh/article/13/1/1/28212/A-systematic-review-and-metaanalysis-of-the)
17 [metaanalysis-of-the](https://iwaponline.com/jwh/article/13/1/1/28212/A-systematic-review-and-metaanalysis-of-the)>.
- 18 ZAHEDI, A.; DURMIC, Z.; GOFTON, A. W.; KUEH, S.; AUSTEN, J.; LAWSON, M.;
19 CALLAHAN, L.; JARDINE, J.; RYAN, U. *Cryptosporidium* homai n. sp. (Apicomplexa:
20 Cryptosporidii) from the guinea pig (*Cavia porcellus*). **Veterinary Parasitology**, v.
21 245, p. 92–101, 2017. Disponível em:
22 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85028551477&doi=10.1016%2Fj.vetpar.2017.08.014&partnerID=40&md5=8d0ee8335cb41a73624c3743e0adc983)
23 [85028551477&doi=10.1016%2Fj.vetpar.2017.08.014&partnerID=40&md5=8d0ee833](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85028551477&doi=10.1016%2Fj.vetpar.2017.08.014&partnerID=40&md5=8d0ee8335cb41a73624c3743e0adc983)
24 [5cb41a73624c3743e0adc983](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85028551477&doi=10.1016%2Fj.vetpar.2017.08.014&partnerID=40&md5=8d0ee8335cb41a73624c3743e0adc983)>.
- 25 ZAHEDI, A.; GREAY, T. L.; PAPANINI, A.; LINGE, K. L.; JOLL, C. A.; RYAN, U. M.
26 Identification of eukaryotic microorganisms with 18S rRNA next-generation sequencing
27 in wastewater treatment plants, with a more targeted NGS approach required for
28 *Cryptosporidium* detection. **Water Research**, v. 158, p. 301–312, 2019. Disponível
29 em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135419303495>>.
- 30 ZOU, Y.; MA, J.-G.; YUE, D.-M.; ZHENG, W.-B.; ZHANG, X.-X.; ZHAO, Q.; ZHU, X.-
31 Q. Prevalence and risk factors of *Cryptosporidium* infection in farmed pigs in Zhejiang,
32 Guangdong, and Yunnan provinces, China. **Tropical Animal Health and Production**,
33 v. 49, n. 3, p. 653–657, 2017. Disponível em:
34 <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

- 1 85011697818&doi=10.1007%2Fs11250-017-1230-
- 2 y&partnerID=40&md5=87bf583a37e7ace4af06b25a4441ae52>.
- 3