



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JONATAS CAMPOS DE ALMEIDA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Cryptosporidium spp. E *Giardia* spp. EM ÁGUA BRUTA E
TRATADA DE UMA ESTAÇÃO PÚBLICA DE TRATAMENTO
DE ÁGUA.**

JONATAS CAMPOS DE ALMEIDA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Cryptosporidium spp. E *Giardia* spp. EM ÁGUA BRUTA E
TRATADA DE UMA ESTAÇÃO PÚBLICA DE TRATAMENTO
DE ÁGUA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciência Agrárias (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Roberta Lemos Freire

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A447d Almeida, Jonatas Campos de.
Detecção e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. e
Giardia spp. em água bruta e tratada de uma estação pública de
tratamento de água/ Jonatas Campos de Almeida. – Londrina,
2014.
67 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, 2014.
Inclui bibliografia

1. Água – Análise – Teses. 2. Protozoário – Água – Teses. 3.
Zoonoses – Teses. 4. Saúde pública – Teses. I. Freire, Roberta Lemos.
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias.
Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU 616.993

JONATAS CAMPOS DE ALMEIDA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Cryptosporidium spp. E *Giardia* spp. EM ÁGUA BRUTA E TRATADA
DE UMA ESTAÇÃO PÚBLICA DE TRATAMENTO DE ÁGUA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciência Agrárias (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora. Prof^a. Dra. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Walfrido Kuhl Svoboda
Universidade Federal da Integração Latino-
Americana – UNILA

Londrina, 14 de fevereiro de 2014.

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

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos juntos às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1. CAPES – Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior/ MEC.**
- 2. CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.**
- 3. FA – Fundação Araucária.**

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha família por ter compreendido meus sonhos e anseios e ter sido meu apoio e base para realizar todas as minhas conquistas. Todo o amor, carinho, paciência e saudade motivaram a minha jornada e, continuamente, me proveram forças. Mesmo com a distância e as visitas com uma frequência menor que a desejada sempre senti vocês ao meu lado.

À professora Roberta Lemos Freire. Não tenho palavras suficientes para definir a pessoa que me orientou. Só gostaria de agradecer do fundo da minha alma por todo o tipo de apoio que me deu. Orientador não é apenas aquele que cobra resultados, mas principalmente aquele que participa, comemora e apoia independente do momento. Sua ajuda foi vital para a conclusão de todo esse processo. Sua fé na minha capacidade e no que eu poderia realizar me estimulou sempre. Obrigado por todo o apoio e conversas que tivemos. Jamais vou esquecer.

Ao professor Italmir Teodorico Navarro, exemplo de profissional e de ser humano. Minha admiração só cresceu desde o momento em que tive a oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa. Agradeço por me mostrar que não é só de publicações e protocolos que é feito um verdadeiro Veterinário e que pesquisa também se faz com o “coração”.

Ao professor Walfrido Svoboda, que me indicou a UEL como uma opção para continuar meu desenvolvimento acadêmico e iniciar minha carreira de veterinário. Também

sou grato por me orientar na UFPR para que eu trilhasse o caminho certo para atingir meus objetivos ao fim da graduação.

À professora Emília Kiyomi Kuroda por acolher nosso projeto com entusiasmo e mostrar disposição, interesse e dedicação para que tudo sempre ocorresse bem e a pesquisa pudesse ser levada adiante.

Aos professores Odilon Vidotto e João Luis Garcia pela ajuda na execução de diferentes etapas do projeto, pelo apoio e incentivo diários, além da contribuição para minha evolução profissional.

Ao “Roberta’s Team”: Felipe Martins, Maira Moreira, José Maurício e Filipe Aguera que toparam o desafio das coletas e jamais perderam o ânimo, se doando ao projeto do começo ao fim. Não existiria esse trabalho sem o apoio dado por vocês. Não poderia ter existido uma melhor equipe para executar esse mestrado.

Aos colegas de residência: Fernando Hamada, Sérgio Cardim e Victor Tabacow (e estes últimos dois, depois como colegas no mestrado), por dividirem comigo a vida de residente, passando por momentos críticos, situações absurdas e engraçadas e fases boas e ruins que só a residência nos proporciona.

Aos estagiários: Ana Sue, João Pedro, Nelson Rodrigues, Dennys Higashi, Carol Constantino, Hugo Luca, Juliana Petruscke, Marielen de Souza, Keila Clarine, Fernando Galdino, Stela Desto, Aline Ticiani, Lucas Lincoln, Igor Perecin, Bárbara Emi e Raissa Guidi e tantos outros por tornarem os dias no Laboratório de Protozoologia mais divertidos.

Aos amigos de pós-graduação: Rafael Vieira, Thállitha Vieira, Denise Nascimento, Michele Frehse, Gislaine Ferreira, Roberta Toledo, Patrícia Lopes, Luiz Daniel, Carol Miura, Daniele Araújo, Elisângela Olegário, Thais Cabral, Dauton Zulpo, Ivo Alexandre, Fernanda Evers, Sthefany Pagliari, Alessandra Taroda, Aline Pasquali, Maria Paula Ewald e Keila Torrico. Cada um com seu próprio projeto e preocupações, mas sempre por perto para ajudar ou apoiar de alguma forma.

Aos técnicos de laboratório: Beatriz, Aldair e Elizabete e às residentes Fernanda Ferreira e Hannah pela ajuda na execução do projeto e interesse e apoio nas minhas atividades. À Maristela, Maria José e Neusa pelo café, fonte de vida e força motora do meu dia.

Aos meus amigos em Curitiba: Pedro, Roberson, Carlos, Rogério, André, Henry, Guilherme, Uriel. Anos de histórias e companheirismo. Cada um seguiu um destino. No entanto, ainda são caminhos muito próximos aos meus. Que venham mais anos de amizade.

Aos meus cães Fênix, Meg e Nick, que faleceram enquanto eu estava em Londrina buscando os meus sonhos, mas que certamente “entenderam” minha ausência. À Nina que espero que tenha vindo para ficar com a minha família por muitos anos e dar muitas alegrias.

A Capes pela bolsa.

A todos que lerem isso futuramente e se lembrarem de mim e da minha passagem pela UEL de forma positiva.

“Não diga que a vitória está perdida.
Tenha fé em Deus, tenha fé na vida.
Tente outra vez!”

(Raul Seixas)

“Talento é mais barato do que sal.
O que separa a pessoa
talentosa da bem-sucedida
é muito trabalho duro”.

(Stephen King)

ALMEIDA, JC. **Detecção e Caracterização Molecular de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em Água Bruta e Tratada de uma Estação Pública de Tratamento de Água.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A água é um dos principais veículos de patógenos que causam doenças na população. Em muitos países em desenvolvimento a infraestrutura para fornecimento de água potável é incompleto ou ausente e existem elevados níveis endêmicos de doenças transmitidas pela água. Os protozoários zoonóticos *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. possuem uma grande capacidade de impactos negativos na população humana e animal. Ambas as espécies resistem ao tratamento convencional da água. O risco representado pela presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* tornou-se uma grande preocupação para as autoridades sanitárias e empresas responsáveis pelo fornecimento de água potável para consumo humano e animal. A Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde exige um padrão de ausência desses dois protozoários em águas destinadas ao consumo humano. O objetivo desse estudo foi detectar *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água bruta e tratada em um sistema público de tratamento de água, situado no município de Londrina, Paraná, Brasil. Entre setembro de 2012 e setembro de 2013, foram coletadas amostras de água bruta (30L) e água tratada (100L), quinzenalmente, em um total de 48 amostras. As amostras foram examinadas por meio da Técnica da Membrana Filtrante, utilizando-se membranas com 47mm de diâmetro e 1,2µm de porosidade e um kit portátil de filtração à vácuo ajustado para 4L/min. O material retido na membrana foi mecanicamente extraído pela raspagem da sua superfície, eluído em solução de Tween 80 a 1%, centrifugado duas vezes e o sedimento resultante utilizado para as análises. A partir das amostras foi realizada a imunofluorescência direta para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., utilizando-se o kit comercial Merifluor® (Meridian Bioscience). Realizou-se a extração de DNA com o kit comercial NucleoSpin Tissue® (Macherey-Nagel) e a reação de *nested*-PCR (*n*-PCR) para a detecção dos protozoários e eletroforese em gel de agarose. Os genes alvos foram o 18S rRNA para *Cryptosporidium* (produto final de 819-825 pares de bases) e 16S rRNA para *Giardia* (produto final de 292-297 pares de bases). Na imunofluorescência as amostras de água bruta foram positivas, sendo detectada *Giardia* spp. em 2/24 (8.33%) amostras analisadas. Na *n*-PCR, 6/24 (25%) das amostras de água bruta foram positivas para *Giardia* spp. e 2/24 (8.33%) para *Cryptosporidium* spp. Das amostras de água tratada, na *n*-PCR, 1/24 (4.16%) foi positiva para *Giardia* spp. e todas foram negativas para *Cryptosporidium* spp. O sequenciamento demonstrou *C. parvum* em ambas as amostras de água bruta. Após o sequenciamento foi identificada DNA de *Giardia duodenalis* em duas amostras de água bruta. Nas três amostras de água bruta e na amostra de água tratada inicialmente positivas à *n*-PCR, após o sequenciamento, demonstrou-se que o DNA pertencia à bactéria ambiental *Nakamurella multipartita*. Houve correlação moderada entre turbidez ($r = 0.5422$; $p = 0.0061$) e cor ($r = 0.4491$; $p = 0.0277$) e a presença de *Cryptosporidium* spp. na água bruta, e entre turbidez ($r = 0.5809$; $p = 0.0029$) e a presença de *Giardia* spp. em

água bruta. A presença desses protozoários em águas de manancial de abastecimento aponta a real necessidade de monitoramento e especial atenção das companhias de tratamento de água da região, considerando a Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde.

Palavras-chave: Protozoários. ETA. *Nested-PCR*. Sequenciamento.

ALMEIDA, JC. **Detection and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Raw and Treated Water in A Public Water-Treatment System.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Water is one of the main sources of pathogens that cause diseases in the population. In many developing countries the infrastructure for providing safe drinking water is fragmentary or absent and there are high endemic levels of waterborne disease. The zoonotic protozoan *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. have a great infective capacity of causing a negative impact on human and animal health. Both parasites are resistant to conventional water treatment. The risk posed by the presence of *Cryptosporidium* and *Giardia* has become a major concern for the sanitary authorities and companies responsible for providing safe drinking water supplies for human and animal consumption. The Brazilian law n.2914/11 from Ministry Health requires a standard of absence of these two protozoans in water for human consumption. The aim of this study was to detect the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in raw and treated water in a public water treatment system, located in Londrina city, Parana State, Brazil. From September 2012 to September 2013, samples of raw (30L) and treated water (100L) were collected every two weeks, in a total of 48 samples. The samples were examined by Membrane Filtration Technique, using membranes with 47mm in diameter and 1.2µm porosity with a filtration kit and a portable vacuum pump, adjusted to 4L/min. The material retained on the membrane was mechanically extracted by scraping its surface with a solution of 1% Tween 80 for elution. The material was centrifuged twice and the sediment resulting was analyzed. Was performed direct immunofluorescence for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts, using the commercial kit Merifluor® (Meridian Bioscience) Also performed DNA extraction using a commercial kit NucleoSpin Tissue® (Macherey-Nagel). The DNA extracted was submitted to nested-PCR reaction (n-PCR) for the detection of protozoans and electrophoresis in agarose gel. The target genes were 18S rRNA for *Cryptosporidium* (final product 819-825 base pairs) and 16S rRNA for *Giardia* (final product 292-297 base pairs). In the immunofluorescence, samples of raw water were positive to *Giardia* spp. in 2/24 (8.33%) from the analyzed samples. In n-PCR, raw water samples were positive in 6/24 (25%) for *Giardia* spp. and in 2/24 (8.33%) for *Cryptosporidium* spp. In treated water 1/24 (4.16%) of the samples was positive to *Giardia* spp. and all samples were negative for *Cryptosporidium* spp. The sequencing showed *C. parvum* DNA in both samples of raw water. After the sequencing was identified *G. duodenalis* DNA in two samples of raw water. Three positive samples of raw water and the positive sample of treated water to *Giardia* spp. in n-PCR, after sequencing, showed DNA concerning to the environmental bacteria *Nakamurella multipartita*. There was moderate correlation between turbidity ($r = 0.5422$; $p = 0.0061$) and colour ($r = 0.4491$; $p = 0.0277$) and presence of *Cryptosporidium* spp. in raw water and between turbidity ($r = 0.5809$; $p = 0.0029$) and presence of *Giardia* spp in raw water. The n-PCR proved to be a highly sensitive technique for the diagnosis of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. The presence of these protozoans in the water supply indicates the need of monitoring and special attention considering the law n.2914/11 by water treatment companies of region.

Key-words: Protozoans. WTS. Nested-PCR. Sequencing.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO

Figura 1 – Proporção de domicílios nas grandes cidades do mundo ligadas à sistemas de abastecimento de água e coleta de esgotos	17
Figura 2 – Distribuição dos recursos hídricos por região do Planeta	18
Figura 3 – Distribuição dos recursos hídricos da superfície e da população em porcentagem do total do Brasil.....	20
Figura 4 – Ciclo biológico <i>Cryptosporidium</i> spp	28
Figura 5 – Ciclo biológico <i>Giardia</i> spp.....	34

LISTA DE QUADROS DA REVISÃO

Quadro 1 – Informações básicas sobre as bacias hidrográficas brasileiras.....	19
Quadro 2 –Espécies de <i>Cryptosporidium</i> , seus respectivos hospedeiros e interesse na Saúde Pública.....	25
Quadro 3 –Espécies de <i>Giardia</i> , seus respectivos grupos e hospedeiros	31
Quadro 4 –Distribuição em porcentagem(%) dos diferentes <i>assemblages</i> de <i>Giardia duodenalis</i> dentro de cada espécie	32
Quadro 5 –Distribuição em porcentagem (%) dos diferentes sub- <i>assemblages</i> de <i>Giardia duodenalis</i> dentro de cada espécie	33

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

- Tabela 1** – Comparação dos resultados obtidos na reação de imunofluorescência direta (RIFD), *nested*-PCR e sequenciamento para os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp em amostras de água bruta e tratada de uma Estação Pública de Tratamento de Água, em Londrina, Paraná, Brasil, entre setembro de 2012 a setembro de 2013.....52
- Tabela 2** – Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros físico-químicos e de sazonalidade para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água bruta de uma Estação Pública de Tratamento de Água do município de Londrina, Paraná, Brasil, entre Setembro de 2012 a Setembro de 2013.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNA	Deoxyribonucleic Acid
et al	e outros
ETA	Estação de Tratamento de Água
EUA	Estados Unidos da América
gdh	Glutamato Desidrogenase
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IAPAR	Instituto Agrônômico do Paraná
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MG	Minas Gerais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico / Potencial de Hidrogênio
PR	Paraná
RIFD	Reação de Imunofluorescência Direta
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ribonucleic Acid
rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic Acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
SANEPAR	Companhia de Saneamento do Paraná
SC	Santa Catarina
SD	desvio padrão
SE	Sergipe
SIH	Superintendência de Estudos e Informações Hidrológicas
SP	São Paulo
spp.	Espécies
UNESCO	United Nation Educational, Scientific and Cultural Organization
UNICEF	United Nations Childres's Fund
WHO	World Health Organization
USEPA	United States Environmental Protection Agency

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
oC	graus celsius
X	vezes
km ²	quilômetros quadrados
min	minutos
seg	segundos
®	registered
™	trade mark
V	volume
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
±	desvio padrão
β	beta
μm	micrometros
μL	microlitros
L	litros
mm	milímetros
mL	mililitros
nm	nanômetros
mM	mili Molar
r	correlação

SUMÁRIO

REVISÃO	17
Qualidade da Água.....	17
Doenças de Veiculação Hídrica	21
Protozoonoses de Veiculação Hídrica.....	23
<i>Cryptosporidium</i> spp	24
<i>Giardia</i> spp	30
Saúde Pública	36
Referências	37
OBJETIVO	42
Objetivo Geral	42
Objetivos Específicos	42
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	43
Resumo.....	44
Abstract.....	45
Introdução	46
Material e Métodos.....	47
1. Local do Estudo	47
2. Coleta das Amostras.....	47
3. Concentração das Amostras de Água.....	48
4. Reação de Imunofluorescência Direta	48
5. Nested-PCR de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.....	48
6. Parâmetros Físico-Químicos.....	50
7. Parâmetros de Sazonalidade.....	50
8. Análise Estatística.....	50
Resultados	51
Discussão.....	53
Conclusão	57
Agradecimentos	57
Conflito de Interesses.....	57
Referências	58
CONCLUSÃO	63
ANEXOS	64

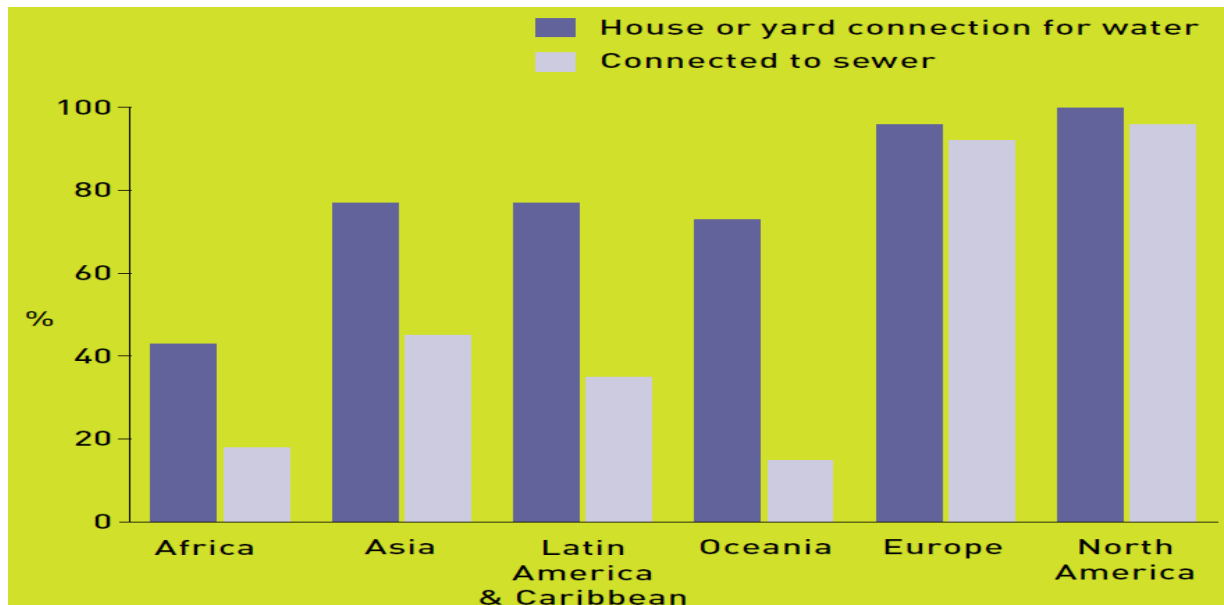
REVISÃO

Qualidade da Água

A disponibilidade e qualidade da água são fatores determinantes para a qualidade da vida e da estabilidade da sociedade do século XXI, para o seu desenvolvimento econômico, para a qualidade de vida das populações humanas e para a sustentabilidade dos ciclos no Planeta. Portanto o uso dos recursos hídricos requer profunda reflexão ética dos governos e da sociedade (RESTELLO, 2007).

Aproximadamente 25% da população terrestre não dispõe de água ou, quando a possui, não apresenta os padrões mínimos de potabilidade (Figura 1), sendo, essa uma das mais importantes causas de mortalidade humana (UNESCO, 2001).

Figura 1 – Proporção de domicílios nas grandes cidades do mundo ligadas à sistemas de abastecimento de água e coleta de esgotos.



Fonte: WHO/UNICEF, 2000.

Somente 2.53% da água do Planeta estão disponíveis como água-doce e, desse total, 66% estão congelados nas calotas polares, em estado sólido (UNESCO, 2003). A distribuição de água por região é mostrada na Figura 2.

Figura 2 – Distribuição em porcentagem dos recursos hídricos e da distribuição da população humana por região do Planeta.



Fonte: UNESCO, 2003.

Até mesmo os países que possuem grandes reservas de água-doce já enfrentam problemas, como é o caso do Brasil. De maneira geral, o Brasil é um país privilegiado quanto ao volume de recursos hídricos, abrigando 13.7% da água doce do mundo. O problema é que a disponibilidade desses recursos não é uniforme (Quadro 1). Mais de 73% da água doce disponível no país encontra-se na bacia Amazônica, que é habitada por menos de 5% da população (UNESCO, 2003).

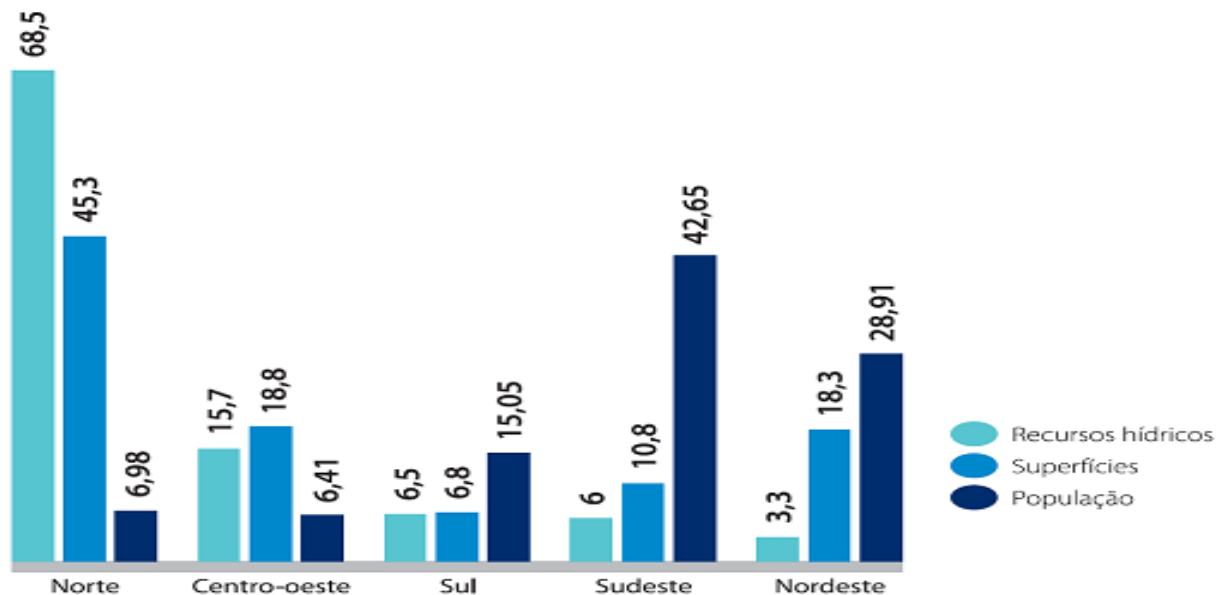
Quadro 1– Informações básicas sobre as bacias hidrográficas brasileiras.

Nº	BACIA HIDROGRÁFICA	Área		População*		Densidade hab/km ²	Vazão m ³ /s	Disponibilidad e Hídrica**		Disponibilidad e Per Capita m ³ /hab.ano
		10 ³ km ²	%	hab.	%			km ³ /an o	%	
1	Amazônica**	3.900	45,8	6.687.893	4,3	1,7	133.380	4206	73,2	628.940
2	Tocantins	757	8,9	3.503.365	2,2	4,6	11.800	372	6,5	106.220
3a	Atlântico Norte/Nordeste	1.029	12,1	31.253.068	19, 9	30,4	9.050	285	5,0	9.130
4	São Francisco	634	7,4	11.734.966	7,5	18,5	2.850	90	1,6	7.660
5	Atlântico Leste	545	6,4	35.880.413	22, 8	65,8	4.350	137	2,4	3.820
6a	Paraguai**	368	4,3	1.820.569	1,2	4,9	1.290	41	0,7	22.340
6b	Paraná	877	10,3	49.924.540	31, 8	56,9	11.000	347	6,0	6.950
7	Uruguai**	178	2,1	3.837.972	2,4	21,6	4.150	131	2,3	34.100
8	Atlântico Sudeste	224	2,6	12.427.377	7,9	55,5	4.300	136	2,-4	10.910
	BRASIL	8.512	100	157.070.163	100	18,5	182.170	5.745	100	36.580

Fonte: SIH/ANEEL, 1999.

Apenas 27% dos recursos hídricos brasileiros estão disponíveis para as demais regiões, onde residem 95% da população do país (LIMA, 1999). A maior parte das regiões brasileiras já apresentam problemas sérios de poluição de mananciais, de falta de água, processos de desertificação e de seca. A Figura 4 mostra a distribuição dos recursos hídricos no Brasil por região.

Figura 3 – Gráfico da distribuição dos recursos hídricos da superfície e da população em porcentagem do total do Brasil.



Fonte: http://www.mma.gov.br/estruturas/sedr_proecotur/_publicacao/140_publicacao09062009025910.pdf. Acesso em 08 de novembro 2013.

Nas últimas décadas, o crescimento urbano acelerado e acima da média mundial, tem causado impactos sobre todo o aparelhamento urbano relativo a recursos hídricos: abastecimento de água, transporte e tratamento de esgotos cloacal e urbano. Além disso, o crescimento das cidades modifica a cobertura vegetal e, como conseqüência, transforma os componentes do ciclo hidrológico natural. A tendência do desenvolvimento urbano é a contaminação dos corpos hídricos por esgotos cloacais e pluviais, muitas vezes poluindo mananciais que resultarão em fontes captadoras de água para outras cidades (UNESCO, 2001)

A proteção dos mananciais de recursos hídricos deve ser questão de alta prioridade na sociedade atual. Estes mananciais situam-se em córregos, rios, lagos e lagunas ou aquíferos subterrâneos e são utilizados para suprir a maioria das atividades básicas e rotineiras da população humana. Evitar a contaminação de fontes de água potável é importante para uma adequada Saúde Pública, pois reduz os gastos com o tratamento de doenças de veiculação hídrica, e também assegura a integridade e manutenção da vida silvestre (GOULART e CALLISTO, 2003).

Os mananciais destinados ao abastecimento público devem apresentar uma distância das cidades a serem abastecidas, viáveis em termos econômicos sem nunca esquecer a importância de sua preservação. Esta relativa proximidade

apresenta um sério dilema quando considerada a expansão espontânea da urbanização sobre os referidos mananciais, com sua inevitável degradação. Esta dinâmica resulta no abandono dos investimentos realizados e o surgimento de verdadeiros cadáveres hídricos, que poluem e envergonham as cidades. Por maior que seja a distância, a definição de uma bacia como manancial de abastecimento define a mais nobre e importante aptidão desta área: produzir água de boa qualidade a qual, todos os demais usos devem estar subordinados (ANDREOLI et al., 2000).

Vários são os fatores com impacto sobre a qualidade dos corpos hídricos (domésticos, industriais e agrícolas), trazendo como consequências problemas com relação aos aspectos da vida diária da população, à economia regional e nacional e, naturalmente, à saúde humana. A precariedade ou, até mesmo, a ausência de saneamento afeta a saúde uma vez que o saneamento é o controle de todos os fatores do meio físico do homem, que exercem ou podem exercer efeito deletério sobre seu bem estar físico, mental e social (CASTRO et al., 1996).

O controle de qualidade de água destinada ao consumo dos seres humanos, desde os sistemas produtores (mananciais, captação, tratamento) aos sistemas de distribuição (reservatório, redes), normalmente é realizado pela empresa responsável de saneamento local (BRASIL, 1990). Porém, não se conhece a qualidade de água nos reservatórios domiciliares, de onde o produto tratado e monitorado é realmente consumido pela população. A manutenção da qualidade da água distribuída requer recursos de pessoal especializado para chegar potável ao consumidor, no entanto, leigos no assunto administram, no dia-a-dia, os prédios e a maioria das residências (d'AGUILA et al., 2000).

Doenças de Veiculação Hídrica

A água destinada ao consumo humano e animal deve estar isenta de contaminantes químicos e biológicos, além de apresentar certos requisitos de ordem estética (SOUZA et al., 1983).

A finalidade primária para a exigência de qualidade da água é a proteção à Saúde Pública. A água de consumo humano é um dos importantes veículos de enfermidades diarreicas de natureza infecciosa, o que torna primordial a avaliação de sua qualidade microbiológica (ISAAC-MARQUEZ et al., 1994).

Diversas doenças de origem infecciosa e parasitária apresentam no meio ambiente uma fase de seu ciclo de transmissão como, exemplo, uma doença de veiculação hídrica, com transmissão oral-fecal. A implantação de um sistema de saneamento, nesse exemplo, significa interferir no meio ambiente, de maneira a interromper o ciclo de transmissão da doença (RESTELLO, 2007).

Entre os diferentes tipos de contaminantes biológicos são citados organismos patogênicos compreendendo bactérias, vírus, protozoários e helmintos, que uma vez, veiculados pela água podem, através da sua ingestão, infectar o organismo humano ou animal. É crescente o interesse pela reavaliação do papel desempenhado pela água na transmissão de agentes causadores de zoonoses (SOUZA et al., 1983).

As doenças infecciosas veiculadas pela água podem ser classificadas conforme os modos de sua propagação e englobadas dentro de quatro categorias básicas (HESPANHOL, 1999):

1. Com suporte na água: quando os organismos patogênicos são carreados passivamente na água que é consumida por uma pessoa (ou animal) causando assim a infecção. Exemplos típicos: cólera e febre tifoide (*Vibrio cholera* e *Salmonella typhi*, respectivamente), que possuem baixa dose infectante e fácil transmissão hídrica. As medidas preventivas nesse caso envolvem a melhoria da qualidade de água através, principalmente, de desinfecção adequada, e evitar que consumidores utilizem fontes alternativas de água que possam estar contaminadas.
2. Associadas à higiene: infecções consequentes à falta de água e que podem ser controladas através da disponibilidade de água e melhoria de hábitos higiênicos. São exemplos práticos doenças de pele e doenças diarreicas. O controle é obtido por meio da provisão de quantidade suficiente de água para banho, lavagem de mãos, e de utensílios domésticos. A quantidade deve ser proporcionada em adição à água disponível para bebida. O mero acesso à disponibilidade de água e alguns preceitos básicos de higiene reduzem a transmissão de doenças dessa classe.
3. De contato com a água: infecções transmitidas por um animal invertebrado que vive na água, ou que passa parte de seu ciclo vital em moluscos aquáticos ou outros animais aquáticos, podendo causar infecção através de contato com a pele. Essas infecções não são passivamente transmitidas de

pessoa para pessoa, através da água. Ou seja, as larvas ou ovos que chegam à água não são imediatamente infectantes ao homem, mas são prontamente infectantes a espécies invertebrados, sobretudo crustáceos e moluscos que, após curto período nesses hospedeiros chamados intermediários, tornam-se infectantes ao homem através da ingestão com a água, ou através de contato com a pele. Um exemplo clássico é a esquistossomose, causada pelo *Schistosoma mansoni*.

4. Associadas a vetores desenvolvidos na água: infecções transmitidas por organismos patogênicos, através de insetos com desenvolvimento na água ou nas proximidades da água. No Brasil, as infecções associadas a vetores desenvolvidos na água são: a malária, febre amarela e a dengue.

A provisão de água segura e de sistemas, mesmo simplificados, de saneamento básico, reduz a incidência das doenças infecciosas citadas acima.

Muitos estudos sobre parasitos transmitidos por veiculação hídrica têm sido feitos em vários países, entretanto, no Brasil, dados sobre a frequência destes patógenos no meio ambiente ainda são escassos (HELLER et al., 2004).

Além de doenças de origem biológica, segundo CASTRO et al. (1996) a água pode ainda ser veículo de inúmeras substâncias químicas, capazes de provocar problemas graves para a saúde do indivíduo que os consumir durante um período prolongado ou em quantidades elevadas.

Dentre os químicos com ação prejudicial sobre a saúde humana têm-se os inorgânicos (arsênio, cádmio, chumbo, cianetos, cromo, fluoretos, mercúrio, nitratos e prata) e os orgânicos, na sua maioria sintéticos e presentes em agrotóxicos (aldrin, benzeno, clordano, lindano e o DDT).

Protozoonoses de Veiculação Hídrica

As doenças de veiculação hídrica, principalmente aquelas causadas pelos protozoários intestinais, emergiram como um dos principais problemas na área da Saúde Pública nos últimos anos, contrapondo-se da adoção de regulamentos e medidas cada vez mais restritivas e dos avanços em tecnologia de tratamento (SMITH et al., 2006).

Antes da década de 80, febre tifóide e paratifóide e a disenteria eram as principais doenças correlacionadas à água, contudo os avanços nos processos de

tratamento de água, notadamente a cloração, foram altamente eficazes em diminuir os patógenos entéricos de origem bacteriana (SMITH et al., 2006). Após 1980, os protozoários parasitos *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. surgiram como os principais contaminantes de veiculação hídrica: no mínimo, 325 surtos epidêmicos associados aos protozoários parasitos e transmitidos pela água foram reportados, globalmente (KARANIS et al., 2007).

Esses dois protozoários destacam-se por permanecerem viáveis por vários meses na água entre 4 e 10°C (HSU et al., 1999). As principais fontes de contaminação de mananciais por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia lamblia*, são os esgotos sanitários, bem como os dejetos e efluentes de atividades agropecuárias, principalmente nos países em desenvolvimento (HELLER et al., 2004).

***Cryptosporidium* spp.**

Cryptosporidium é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa e a família Cryptosporidiidae. Atualmente, são reconhecidas 30 espécies de *Cryptosporidium* (SLAPETA, 2013). É um parasito coccídeo entérico obrigatório, que infecta as células epiteliais do trato gastrointestinal, podendo também causar infecções extra-intestinais no pâncreas, vesícula biliar, ductos biliares e pulmões, figurando como um dos patógenos entéricos mais importantes dentro do gênero (LOPES, 2002).

C. parvum, apresenta um aspecto que merece ser ressaltado: aparentemente é a espécie que apresenta menor especificidade de hospedeiro uma vez que foi identificada em camundongos, rebanhos, humanos, cavalos e outros hospedeiros mamíferos, sendo considerado zoonótico e de grande interesse em Saúde Pública (FAYER, 2004).

No Quadro 2 encontram-se descritas as espécies de *Cryptosporidium*, seus respectivos hospedeiros e sua respectiva importância na Saúde Pública:

Quadro 2 – Espécies de *Cryptosporidium*, seus respectivos hospedeiros e interesse na Saúde Pública.

ESPÉCIE	PRINCIPAIS HOSPEDEIROS	INFECÇÃO EM HUMANOS	INTERESSE NA SAÚDE PÚBLICA
<i>C. muris</i>	Mamíferos e pássaros	sim	Pequeno
<i>C. parvum</i>	Mamíferos	sim	Pequeno
<i>C. andersoni</i>	Mamíferos	sim	Pequeno
<i>C. canis</i>	Mamíferos	sim	Pequeno
<i>C. suis</i>	Mamíferos	sim	Pequeno
<i>C. fayeri</i>	Mamíferos	sim	Pequeno
<i>C. ubiquitum</i>	Mamíferos	sim	Pequeno
<i>C. scrofarum</i>	Mamíferos	sim	Pequeno
<i>C. meleagridis</i>	Mamíferos e pássaros	sim	Moderado
<i>C. cuniculus</i>	Mamíferos	sim	Moderado
<i>C. felis</i>	Mamíferos	sim	Moderado
<i>C. viatorum</i>	Mamíferos	sim	Moderado
<i>C. hominis</i>	Mamíferos	sim	Importante
<i>C. pestis</i>	Mamíferos	sim	Importante
<i>C. wrairi</i>	Mamíferos	não	Nenhum
<i>C. agni</i>	Mamíferos	não	Nenhum
<i>C. bovis</i>	Mamíferos	não	Nenhum
<i>C. serpentis</i>	Mamíferos e répteis	não	Nenhum
<i>C. natoris</i>	Peixes	não	Nenhum
<i>C. baileyi</i>	Pássaros	não	Nenhum
<i>C. varanii</i>	Répteis	não	Nenhum
<i>C. cichlidis</i>	Peixes	não	Nenhum
<i>C. reichenbachklinkei</i>	Peixes	não	Nenhum

<i>C. ducismarci</i>	Répteis	não	Nenhum
<i>C. galli</i>	Pássaros	não	Nenhum
<i>C. molnari</i>	Peixes	não	Nenhum
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes	não	Nenhum
<i>C. ryanae</i>	Mamíferos	não	Nenhum
<i>C. fragile</i>	Não definido	não	Nenhum
<i>C. macropodum</i>	Mamíferos	não	Nenhum

Fonte: adaptado de SLAPETA (2013).

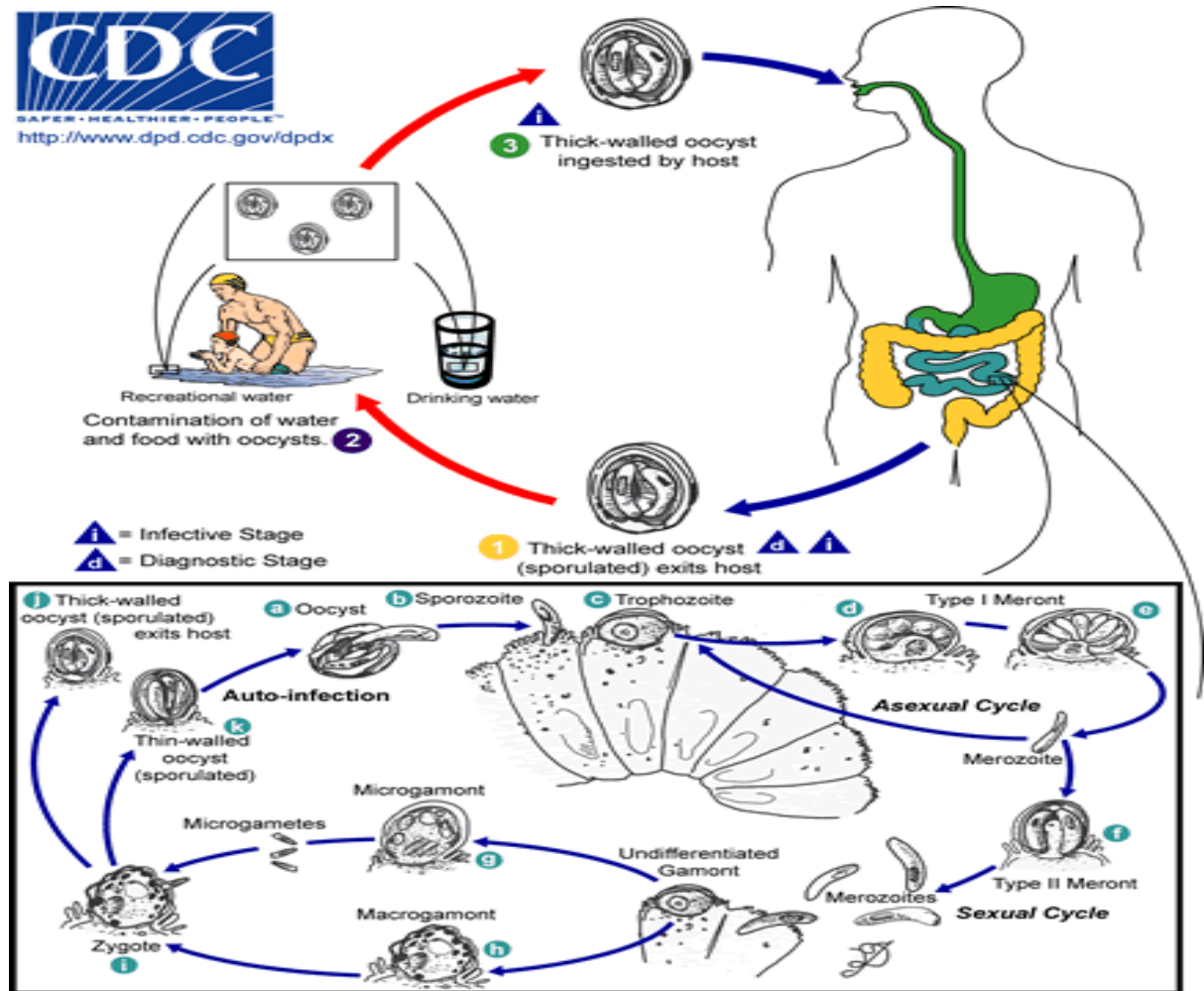
Existem vários genótipos diferentes de *C. parvum* (genótipo 1, genótipo 2, genótipo *guinea pig*, genótipo Monkey e Koala) com significativa importância epidemiológica. O genótipo 1 é a cepa considerada responsável pela maioria das infecções humanas, enquanto o genótipo 2 provavelmente é o que mais ocorre no ambiente, podendo infectar animais e homens. Assim, dois grandes genótipos estariam associados com os dois diferentes ciclos de transmissão, um dos quais sendo por transmissão antroponótica e o outro por transmissão zoonótica, significativamente do bovino ao homem (XIAO et al., 1999).

O ciclo de vida deste protozoário tem início através da ingestão do oocisto pelo hospedeiro e após a excitação, quatro esporozoítos são liberados no interior do intestino e invadem as células epiteliais do trato gastrointestinal e do trato respiratório. Os estádios que se seguem são intracelulares, contudo o parasito está na superfície da microvilosidade da célula epitelial hospedeira, em uma posição extracitoplasmática. Desse modo, *Cryptosporidium* spp. consegue ficar livre da resposta imunológica do hospedeiro. O desenvolvimento assexuado se dá por meio de duas gerações sucessivas de merogonia, liberando oito e quatro merozoítos, respectivamente. Os quatro merozoítos liberados da segunda merogonia dão origem aos estádios de desenvolvimento sexuado: os micro e macro-gamontes os quais, após unirem-se, formam o zigoto. Esse zigoto sofre duas divisões, completando o ciclo com a formação do oocisto que possui parede dupla. Os oocistos sofrem uma multiplicação assexuada, a esporulação, e dentro de cada oocisto formam-se quatro esporozoítos livres, ou seja, não há esporocisto. Os oocistos são eliminados já infectantes juntamente com as fezes do hospedeiro e são resistentes às condições

ambientais, garantindo desse jeito a continuidade do ciclo em novos hospedeiros. Dois tipos de oocistos são formados: aqueles de parede fina, responsáveis pela autoinfecção do hospedeiro (cerca de 20% da produção total) e aqueles de parede espessa, liberados nas fezes ou no trato respiratório, resistentes às condições ambientais adversas (equivalente a 80% do total). A Figura 4 ilustra o ciclo biológico desse protozoário. Um hospedeiro infectado, em fase sintomática pode eliminar aproximadamente 10^{10} oocistos (TZIPORI e WARD, 2002, ALMEIDA 2004). A ingestão de poucos oocistos pode causar infecção. De acordo com Chappell et al (2006) a dose infectante é de 9 a 1.042 oocistos, dependendo da cepa de *Cryptosporidium*.

Os oocistos medem cerca de 3-8,5 μm , tem formato esférico ou oval contendo quatro esporozoítos no seu interior, alongados e dispostos com formato de meia-lua. A parede externa do oocisto, que circunda os esporozoítos, proporciona proteção sob condições extremas de temperatura e umidade por vários meses (FAYER, 2004; LOPES, 2002). Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são capazes de resistir à desinfecção por cloro utilizada no tratamento convencional de água (MULLER, 2000), a ozonização e ao método de filtração (LIMA e STAMFORD, 2003).

Figura 4 – Ciclo biológico do *Cryptosporidium* spp.



Fonte: Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>. Acessado em 08 de novembro de 2013.

A criptosporidiose pode provocar surtos diarréicos de grande magnitude e deixou de ser considerado apenas um problema de pacientes imunocomprometidos. O estado imunológico não está relacionado à presença da doença, uma vez que a infecção pode ocorrer em indivíduos saudáveis, os quais apresentam um quadro clínico auto-limitante. Isso torna preocupante a ocorrência de portadores assintomáticos para a Saúde Pública (LIMA e STAMFORD, 2003).

Em indivíduos imunocompetentes, após um período de incubação de 4 a 14 dias, o paciente é acometido por uma diarreia aquosa profusa acompanhada de cólicas abdominais. Estas manifestações, de modo geral, persistem por uma a duas semanas e desaparecem espontaneamente. Uma pequena percentagem relata náuseas, vômitos, anorexia e febre baixa (LOPES, 2002). Já em hospedeiros imunocomprometidos (portadores do HIV, hipogamaglobulinemia congênita, em

quimioterapia oncológica e transplantados), a sintomatologia é semelhante à dos hospedeiros normais, porém a diarreia é notadamente mais severa clinicamente semelhante à diarreia causada pela toxina colérica, com perda de fluidos entre 1–17 L/dia, podendo permanecer de forma persistente ou remitente durante o resto da vida (CLARK e SEARS, 1996).

A criptosporidiose ainda é uma doença pouco conhecida e diversos fatores contribuem para a falta de conhecimento sobre sua epidemiologia, destacando-se a ausência da prática de notificação da doença por médicos e laboratórios e a utilização de técnicas diagnósticas pouco sensíveis. Assim, há o risco de sua prevalência ser subestimada em nosso meio (WIEBBELLING et al., 2002).

Entre 1983 a 1998, 64 epidemias de origem hídrica foram associadas ao *Cryptosporidium* spp. em todo mundo, atingindo aproximadamente 460 mil pessoas (GARRIDO, 2003). O primeiro registro de surto de criptosporidiose vitimou 79 pessoas e ocorreu em 1984 no Texas (EUA), sendo diagnosticado por um estudo epidemiológico, portanto sem a confirmação do parasito na água de poço suspeita. Na sequência outros casos foram reportados, e dentre aqueles de maior impacto estão os surtos que ocorreram: na Geórgia (EUA) em 1987 com 13.000 pessoas foram afetadas; em Saitama (Japão), em 1996, envolvendo 8.705 indivíduos, sendo o *Cryptosporidium* spp. detectado na água tratada e não-tratada; no Oregon (EUA) com 15.000 casos de criptosporidiose, com o parasito sendo detectado na água em processo de tratamento; Milwaukee e Wisconsin (EUA), no ano de 1993, *Cryptosporidium* spp. foi encontrado na água de gelo e infectou 403.000 pessoas.

Dentre as fontes de contaminação das águas destaca-se a contaminação cruzada de águas de poço ou encanada por água de esgoto, falha nos procedimentos operacionais, desvios do filtro de areia, contaminação de águas superficiais por esterco bovino, e influências de efluentes industriais e agrícolas nas águas de recreação (SMITH, 1998).

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, a ocorrência da criptosporidiose em portadores do vírus HIV, no período de 1980 a abril de 1999, foi de aproximadamente 4.691 casos em 155.590 portadores. Segundo dados da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo foram notificados entre 2000 e 2001, 2070 casos na cidade de Santos e 1013 casos na cidade de São Paulo, principalmente, em portadores do vírus HIV (GARRIDO, 2003). Na cidade de Recife,

a freqüência de infecção pelo *C. parvum* nesses pacientes chegou a um percentual de 21,8% (ARCOVERDE, 2004).

Utilizando a Reação de Imunofluorescência Direta (RIFD) para pesquisa desse parasito, Newman et al. (1994), na cidade Fortaleza, e Gamba et al. (2000), em Itaquaquecetuba-SP, revelaram a presença de *Cryptosporidium* spp. em águas de poços (subterrânea) utilizadas para o consumo observando a ocorrência de 22,2% (18 poços pesquisados) e 100% (oito poços pesquisados), respectivamente. Utilizando a RIFD para a investigação do *Cryptosporidium* spp. na Região Metropolitana de São Paulo, Farias (2000) encontrou 22,91% de amostras positivas em Estações de Tratamento de Água com 100% de positividade no município de Araras. Franco e Neto (2002), através da RIFD, encontraram oocistos em duas amostras das 13 marcas de água mineral engarrafada para consumo e, utilizando a mesma técnica, foi encontrada positividade de 100% em amostras de água coletadas do rio Atibaia, no município de Campinas-SP (FRANCO et al., 2001).

***Giardia* spp.**

Giardia spp. é um protozoário flagelado que pertence a Classe Zoomastigophorea e Ordem Diplomonadida e está presente no trato intestinal de praticamente todas as espécies de vertebrados (THOMPSON, 2004). Este enigmático protozoário possui algumas características incomuns, tais como a ausência de mitocôndrias e peroxissomos e apenas uma organela: um disco ventral de sucção (THOMPSON, 2009).

A taxonomia atual desse protozoário ainda não está totalmente elucidada devido às inúmeras variações genéticas relacionadas à espécie *Giardia duodenalis* – sinonímia *Giardia intestinalis*/*Giardia lamblia* – (THOMPSON e MONIS, 2004). Existem atualmente seis espécies conhecidas de *Giardia*. Três delas, *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. microti* são infectantes para os mamíferos, mas apenas a *G. duodenalis* apresenta uma ampla gama de hospedeiros, sendo capaz de infectar uma grande variedade de mamíferos inclusive os seres humanos, além dos animais de produção e de companhia e é a única espécie de interesse na Saúde Pública (THOMPSON e MONIS, 2004)

Estudos realizados revelaram divisões genéticas na espécie *G. duodenalis*, demonstrando que não se trata de uma espécie uniforme, mas sim de um complexo de espécies que compreende uma grande variedade de genótipos, com diferenças na especificidade dos hospedeiros e são denominados como *assemblages* (THOMPSON, 2004).

Nos Quadros 3 e 4 estão apresentadas as diferentes espécie e genótipos de *Giardia*, bem como seus respectivos hospedeiros e a distribuição por espécie:

Quadro 3 - Espécies de *Giardia*, seus respectivos grupos e hospedeiros.

Espécie	Assemblage	Principais Hospedeiros
<i>G. duodenalis</i>	A	Humanos, primatas, cães, gatos, roedores, gado bovino e mamíferos selvagens
<i>G. duodenalis</i>	B	Humanos, primatas, cães, cavalos e gado bovino
<i>G. duodenalis</i>	C	Cães
<i>G. duodenalis</i>	D	Cães
<i>G. duodenalis</i>	E	Gado bovino e outros animais da Ordem dos Artiodátilos
<i>G. duodenalis</i>	F	Gatos
<i>G. duodenalis</i>	G	Roedores
<i>G. agilis</i>	**	Anfíbios
<i>G. muris</i>	**	Roedores
<i>G. microti</i>	**	Almiscareiros* e ratos silvestres
<i>G. psittaci</i>	**	Pássaros
<i>G. ardeae</i>	**	Pássaros

* mamífero asiático da família dos ruminantes que secreta almíscar;

** não possui *assemblages*.

Fonte: LOPES, 2009.

Quadro 4 – Distribuição em porcentagem(%) dos diferentes *assemblages* de *Giardia duodenalis* dentro de cada espécie.

	FELINOS	BOVINOS	CANINOS	OVINOS E CAPRINOS	HUMANOS	SUÍNOS	ÁGUA	ANIMAIS SELVAGENS
A	43	23	23	17	43	21	70	32
B	2	2	9	1	56	0.7	30	62
C	3	0	32	0	0.1	0	0	0
D	2	0	36	0	0.2	0.7	0	0
E	1	75	1	82	0.2	78	0	5
F	49	0	0	0	0.2	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: adaptado de SPRONG et al. (2009).

Através de análises laboratoriais utilizando enzimas de restrição foram encontrados sub-*assemblages* dentro dos *assemblages* A e B sendo classificados em AI, AII e AIII e BIII e BIV (MONIS et al., 1996; ROBERTSON et al., 2007). Entre os animais de companhia e de produção, 75% das sequências de DNA de *G. duodenalis* encontradas e analisadas pertenciam ao sub-*assemblage* AI e 25% ao AII. Nos seres humanos essas prevalências são exatamente opostas: 75% dos achados pertenciam ao sub-*assemblage* AII e 25% ao AI. O sub-*assemblage* AIII foi mais frequentemente encontrado entre animais selvagens, bovinos e, isoladamente, em felinos, mas não foi descrito em humanos.

Quantos aos sub-*assemblages* BIII e BIV, foram encontrados com prevalências similares entre humanos e nas demais espécies animais (CACCIÓ et al., 2008). Desse modo, quanto aos sub-*assemblages* da *G. duodenalis*, os tipos AI, AII, BIII e BIV são potencialmente zoonóticos (SPRONG et al., 2009).

Encontram-se resumidos no Quadro 5 os sub-*assemblages* e sua distribuição por espécie.

Quadro 5 – Distribuição em porcentagem (%) dos diferentes sub-*assemblages* de *Giardia duodenalis* dentro de cada espécie.

	FELINO	BOVINO	CANINO	CAPRINO E OVINO	HUMANO	SUÍNO	ANIMAIS SELVAGENS
AI	69	62	73	78	25	86	44
AII	25	35	27	22	75	14	3
AIII	5	4	0	0	0	0	52
BIII	43	43	27	43	56	43	6
BIV	57	57	73	57	44	57	94

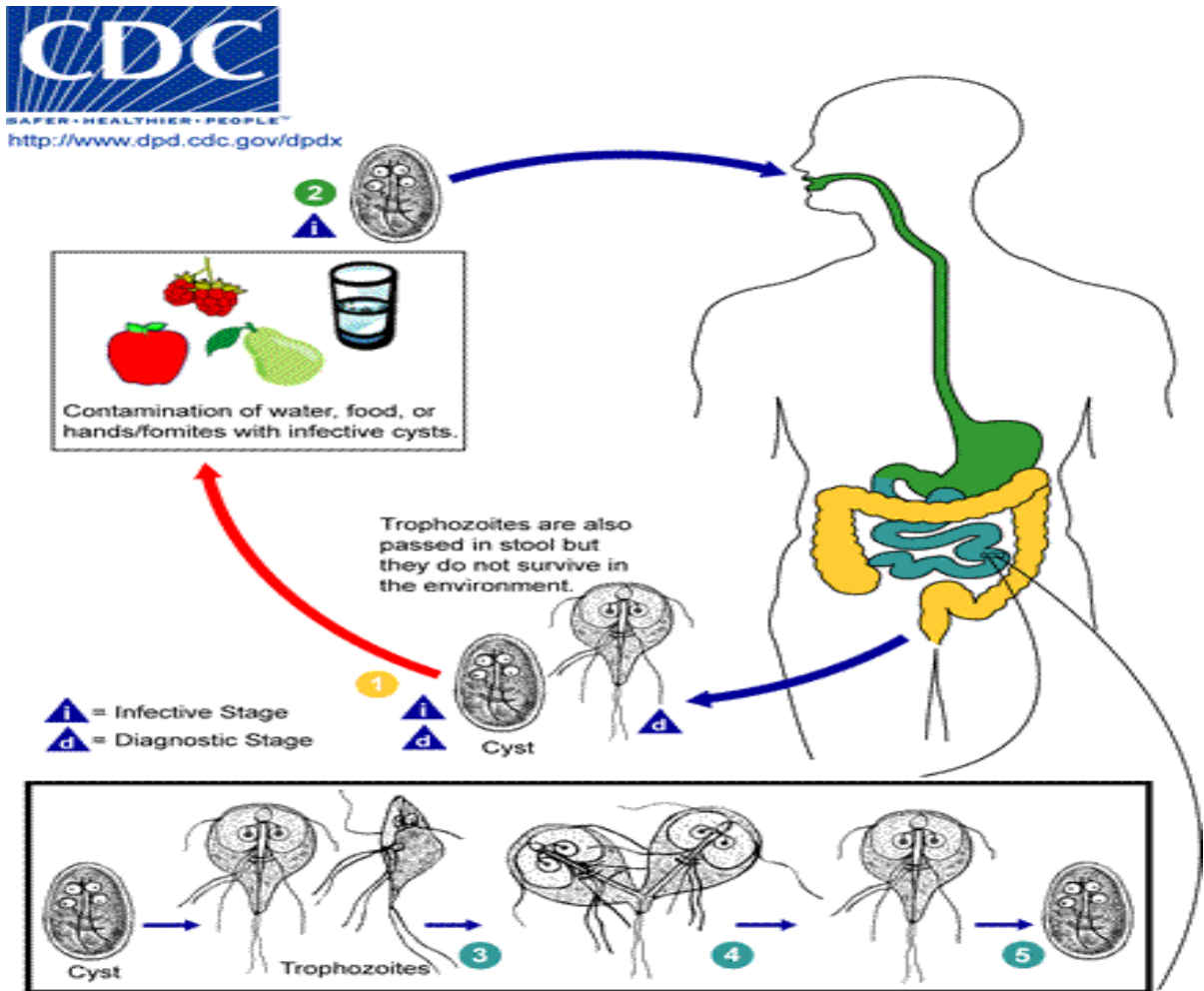
Fonte: adaptado de SPRONG et al. (2009)

A freqüência de casos de giardíase varia: nos países desenvolvidos, a taxa é relativamente baixa, e o aumento destas taxas deve-se a surtos que não configuram um problema crônico com freqüências constantemente elevadas; no caso de países em desenvolvimento, sabe-se que a freqüência é muito maior (HILL, 1993).

A transmissão de *Giardia* de humano-humano pode ocorrer indiretamente por meio da ingestão acidental de cistos em água ou alimentos contaminados, ou diretamente em ambientes nos quais os níveis de higiene estejam comprometidos (THOMPSON, 2004). A dose infectante capaz de causar doença é inferior a 10 cistos (ORTEGA e ADAM, 1997)

Após a ingestão dos cistos, a exposição aos ácidos estomacais e aos sais biliares estimula o processo de excitação. Os trofozoítos alcançam o intestino delgado, dividem-se por fissão binária e colonizam a sua superfície. Conforme vão passando pelo intestino delgado, encistam e são eliminados posteriormente nas fezes (OLSON et al., 2004). Os trofozoítos são estruturas móveis, com simetria bilateral, de formato piriforme a elipsoidal, com dimensões entre 8-12µm de comprimento e de 6-8 µm de largura. O ciclo biológico da *Giardia* spp. encontra-se ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – Ciclo biológico da *Giardia* spp.



Fonte: Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>. Acessado em 8 de novembro de 2013.

Os sintomas da giardíase compreendem diarreia, dores abdominais, perda de peso e, em crianças, pode interferir no desenvolvimento físico e cognitivo (THOMPSON, 2000). Surgem após 6-15 dias da infecção e cessam após 2 – 4 dias, caracterizando-se como uma infecção auto-limitante em mais de 85% dos casos, desde que não haja comprometimento imune do paciente (THOMPSON, 2009)

O sinal clínico mais evidente em pequenos animais é a diarreia de caráter agudo ou crônico, e auto-limitante, intermitente ou contínua (THOMPSON, 2009). A diarreia crônica é uma consequência da adesão do parasito às criptas intestinais, provocando irritação superficial ou agravando uma inflamação existente (FORTES, 2003). A ocorrência da doença clínica está associada com animais jovens com até 1 ano de idade, agrupados em grande número, em condições de baixa higiene e com deficiência nutricional. Em gatos a prevalência relatada varia de 1,4 a 11% (ROSEZ et al., 2002). Ferreira et al. (2013) relataram prevalência de 8,65% em cães do município de Londrina-PR. Em ruminantes a infecção é geralmente assintomática, mas pode estar associada a presença de diarreia e retardo no ganho de peso em bezerros, representando um impacto econômico (THOMPSON, 2009). Em equinos no noroeste e norte do Paraná a ocorrência de *Giardia duodenalis* foi estimada em 21,1% (MENDES e RIGOLON, 1998).

No Brasil, a giardíase ainda é uma doença negligenciada. Considerando a frequência na população em geral, as taxas de giardíase não são significativamente elevadas, quando comparadas com taxas da população pediátrica (MACHADO et al., 1999).

Dados de diversos pesquisadores demonstram altas taxas de prevalência (entre 9% e 50%) de *Giardia duodenalis*, em estados como São Paulo, Minas Gerais, Paraíba, Rio Grande do Norte, Distrito Federal e Sergipe, principalmente entre crianças acima dos quatro anos de idade (VIDAL e CATAPANI, 2005). Mascarini e Donalísio (2006), realizaram exames coproparasitológicos em crianças de creches do município de Botucatu-SP, e encontraram prevalência de *G. duodenalis* de 23,7%, em 2002; e 21,4% em 2003. Gioia (1992) encontrou frequência de 4,5% de giardíase na população de uma unidade básica de saúde, entre os anos de 1986 e 1990, em Campinas-SP. Cardoso et al. (1995) encontraram taxas de giardíase de até 63,3% em creches de Aracajú-SE.

Considerando-se apenas a frequência da doença entre crianças, as variações são interessantes quanto à distribuição entre as faixas etárias, uma vez que crianças

em idade pré-escolar são mais acometidas por giardíase (MACHADO et al., 1999). Crianças de nações em desenvolvimento ou de comunidades isoladas representam o principal grupo de risco para *Giardia* spp. Nesse grupo é possível identificar atrasos no desenvolvimento físico e cognitivo. (THOMPSON, 2009).

Saúde Pública

A Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), determina o monitoramento em seu padrão microbiológico de potabilidade da água a inclusão de pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir um padrão de ausência, dentre outros, de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.

O reconhecimento da existência desses parasitos patogênicos em diversas fontes de águas usadas para consumo humano evidencia a necessidade de avançar na proteção das águas superficiais e subterrâneas, bem como otimizar os processos dos sistemas de tratamento de água, além de manter uma distribuição que garanta a segurança e a saúde da população (FREGONESI, 2012)

A incerteza dos reais riscos de saúde decorrentes da presença de reduzidas densidades de protozoários em águas tratadas, evidências disponíveis têm chamado atenções no caso do *Cryptosporidium*, e reacendido outras, no caso da *Giardia*, no que se refere à necessidade de se aprofundarem os conhecimentos sobre as fontes de contaminação, a distribuição de protozoários em mananciais de abastecimento e a eficiência de remoção desses organismos pelos processos de tratamento (HELLER et al., 2004).

Com base no exposto fica evidente que os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. encontram-se frequentemente envolvidos em surtos de veiculação hídrica, apresentando importância relevante na Saúde Pública. Desse modo são necessários maiores estudos sobre a real ocorrência desses parasitos no ambiente e informações epidemiológicas e de qualidade parasitológica da água.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, TTC. **Padronização e Avaliação de Métodos Moleculares para a Detecção de Oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em Amostras Fecais: Extração de DNA Genômico e PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase)**. Tese de Doutorado. 2004. fls 143. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ANDREOLI, CV.; DALARMI, O.; LARA, AI.; ANDREOLI, FN. Limites ao Desenvolvimento da Região Metropolitana de Curitiba, Impostos pela Escassez de Água. In: **9º SILUBESA - SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**. Porto Seguro-BA, 9 a 14 Abril, pp. 185-195, 2000.

ARCOVERDE, C.; MAGALHÃES V; LIMA RA; MIRANDA C; GUEDES I; PASCOAL, M; LEMOS MN. Enteroparasitoses em pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 36(1), pp. 13-17, 2004.

BRASIL, Portaria No. 36, de 19 de janeiro de 1990 do Ministério da Saúde. Aprova normas e o padrão de potabilidade da água para consumo humano em todo o território nacional. **Diário Oficial da União**. Brasília: 23. janeiro de 1990, Seção I, p. 1651-1654, 1990.

BRASIL. Portaria No. 2914/11: “Estabelece o monitoramento dos parâmetros de gosto e odor, saxitoxina, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp”. **Diário Oficial da União**. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil, 14 dezembro 2011.

CACCIÓ, SM; THOMPSON, RCA; McLAUHLIN, J; SMITH, HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends In Parasitology**. 21(9), pp. 430-437, 2005.

CACCIO, SM; BECK R; LALLE M; MARINCULIC A; POZIO E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**. 38(13), pp.1523-1531, 2008

CARDOSO, GS; Santana, ADC; AGUIAR, CP. Freqüência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracaju, SE, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 28(1), pp. 25-31, 1995.

CASTRO, AA; COSTA, AMLM; CHERNICHARO, CAL; SPERLING, E; MÖLLER, LM; HELLER, L; CASSEB, MMS; SPERLING, M; BARROS RTV. **Manual de Saneamento e Proteção Ambiental para os Municípios**, Volume II. Belo Horizonte-MG: Escola de Engenharia da UFMG, 1996.

CHAPPELL, CL; OKHUYSEN, PC; LANGER-CURRY, R; WIDMER, G; AKIYOSHI, DE; TANRIVERDI, S; TZIPORI, S. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 75(5), pp. 851-7, 2006.

CLARK, DP; SEARS, CL. The Pathogenesis of Cryptosporidiosis, **Parasitology Today**, 12(6), pp. 221-225, 1996.

D'AGUILA, PS; ROQUE, OCC; MIRANDA, CAS; FERREIRA, AP. Avaliação da Qualidade de Água para Abastecimento Público. **Cadernos de Saúde Pública**, 16(3), pp. 791-798, 2000.

FARIAS, EWC. **Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp em amostras de água de esgoto e águas de córregos da cidade de São Paulo**. Dissertação. 2000. fls 109. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology** 126(1-2), pp. 37-56, 2004.

FERREIRA, FP; DIAS, RFC; MARTINS, TA; CONSTANTINO, C; PASQUALI, AKS; VIDOTTO, O; FREIRE, RL; NAVARRO, IT. Frequência de parasitas gastrointestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. **Semina: Ciências Agrárias** 34(6), pp. 3851-3858, 2013.

FRANCO, RMB; ROCHA-EBERHARDT, R; NETO, RC. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em águas do rio Atibaia, Campinas, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 43(2), pp. 109-111, 2001.

FRANCO, RMB; NETO, RC. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the City of Campinas, state of São Paulo, Brasil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 97(2), pp. 205-207, 2002.

FREGONESI, BM; SAMPAIO, CF; RAGAZZI, MF; TONANI, KAA; MUNOZ-SEGURA, SI. *Cryptosporidium* e *Giardia*: desafios em águas de abastecimento público. **O Mundo da Saúde**. 36, pp. 602-609, 2012.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**, 2a. ed., Porto Alegre, ed. Sulina, 2003.

GAMBA, RC; CIAPINA, EMP; ESPINDOLA, RS; PACHECO, A; PELLIZARI, VH; Dectection of *Cryptosporidium* sp. ocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba City, S.Paulo-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. 31(2), pp. 151-153, 2000.

GARRIDO, EM. ***Cryptosporidium parvum* - patógeno emergente de veiculação hídrica: desafios metodológicos de detecção ambiental**. Dissertação. 2003. fls 97. Fundação Oswaldo Cruz / Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro. 2003.

GIOIA, I. Frequência de parasitoses intestinais entre os usuários do centro de saúde do distrito de Sousas, Campinas, SP (1986-1990). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 25(3), pp.177-182, 1992.

GOULART, MD; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **FAPAM em Revista**. 2, pp. 153-164 2003.

HELLER, L; BASTOS, RXX; VIEIRA, MBC; BEVILACQUA, PD; BRITO, LLA; MOTA, SMM; OLIVEIRA, AA; MACHADO, PM; SALVADOR, DP; CARDOSO, AB. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. 13(2), pp. 79-92, 2004.

HESPANHOL, I. **Água e saneamento básico: uma visão realista**. In: REBOUÇAS, AC.; BRAGA, B.; GALIZIA, J. Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. São Paulo: Escrituras, cap. 8, p.263-264. 1999.

HILL, DR. Giardiasis: Issues in diagnosis and management. **Infectious Diseases Clinics of North America**. 7(3), pp. 503-525, 1993.

HSU, B; HUANG, C; HSU, Y; JIANG, G; HSU, CL. Evaluation of Two Concentration Methods for Detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in Water. **Water Research**. 35(2), pp. 419-424, 2001.

ISSAC-MARQUEZ, AP; LEZAMA-DAVILA, CM; KU-PECH, RP; TAMAY-SEGOVIA, P. Calidad sanitaria de los suministros de agua para consumo humano en Campeche. **Salud Pública de México**. 36(6), pp.655-661,1994.

KARANIS, P; KOURENTI, C; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**. 5(1), pp. 1-38, 2007

LIMA, EC; STAMFORD, TLM. *Cryptosporidium spp.* no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Ciência & Saúde Coletiva**. 8(3), pp 791-800, 2003.

LIMA, JEF; W, FERREIRA, RSA; CHRISTOFIDIS, D. O uso da irrigação no Brasil. In: **Estado das águas no Brasil – 1999**: Perspectivas de gestão e informação de recursos hídricos. SIH/ANEEL/MME; SRH/MMA. p. 73-82, 1999

LOPES, JR. **Detecção, Identificação e Quantificação de Oocistos de *Cryptosporidium parvum* na Água: Métodos Convencionais e Imunofluorescência pós-Separação Imunomagnética**. Dissertação. 2002. fls 106. Universidade do Porto, Porto. 2002.

LOPES, AMMB. **Avaliação da Ocorrência de Oocistos de *Cryptosporidium spp.* e de Cistos de *Giardia spp.* e sua Associação com Indicadores Bacteriológicos e Turbidez na Represa de Vargem das Flores/MG**. Dissertação. 2009. fls 109. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2009.

MACHADO, RC; MARCARI, EL; CRISTANTE, SFV; CARARETO, CMA; Giardiase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1° e 2° graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 32(6), pp. 697-704, 1999.

MASCARINI, LM; DONALÍSIO, MR. Giardiasis and cryptosporidiosis in children institutionalized at daycare centers in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 39(6), pp. 577-579, 2006.

MENDES, LDV; RIGOLON, LP. Ocorrência de *Giardia duodenalis* em eqüinos do noroeste e do norte do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, 19(1), pp. 73-75, 1998.

MONIS, PT; MAYRHOFER, G; ANDREWS, H; HOMAN, WL; LIMPER, L. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. **Parasitology**. 112(1), pp. 1–12 1996.

MULLER, APB. **Detecção de oocistos de Cryptosporidium spp. Em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana do estado de São Paulo**. Dissertação. 2000. fls 135. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

NEWMAN, RD; ZU, SX; WUHIB, T; LIMA, AA; GUERRANT, RL; SEARS, CL. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in urban community in northeast Brazil. **Annals of Internal Medicine**. 120(6), pp.500-505, 1994.

OLSON, ME; O´HANDLEY, RM; RALSTON, BJ; McALLISTER, TA; THOMPSON, RCA. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**. 20(4), pp. 185 – 191, 2004.

ORTEGA, YR; ADAM, RD. *Giardia*: overview and update. **Clinical Infectious Disease** 25, pp.545-550, 1997.

RESTELLO, RM. **Água e Saúde Conservação e Uso Sustentável da Água: Múltiplos Olhares**. Conservação e uso sustentável da água: múltiplos olhares / organização de Sônia Balvedi Zakrzewski. - Erechim, RS : EdiFapes, 2007.

ROBERTSON, LJ; FORBERG, T; HERMANSEN, L; HAMNES, IS; GJERDE, B. *Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: Genetic characterization by PCR-RFLP and sequence analysis at two genes. **Journal of Wildlife Diseases**. 43, pp. 576–585, 2007.

ROSEZ, KV; ALVES, FAR; BLEICH, IM. *Giardia*: uma infecção global. **Revista Nosso Clínico**. 26, pp. 30-34, 2002.

SIH/ANEEL (Superintendência de Estudos e Informações Hidrológicas/Agência Nacional de Energia Elétrica). **Informações hidrológicas brasileiras**. ANEEL, Brasília, 1999.

SMITH, HV. Detection of parasites in the environmental. **Parasitology**. 117(supl), pp 113-141, 1998.

SMITH, A; REACHER, M; SMERDON, W; ADAK, GK; NICHOLS, G; CHALMERS, RM. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Epidemiology & Infection**. 134(6), pp. 1141-1149, 2006

- SOUZA, LC; IARIA, ST; PAIM, GV; LOPES, CAM. . Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais. **Revista de Saúde Pública** 17(2), pp.112-22, 1983.
- SPRONG, H; CACCIÒ, SM; VAN DER GIESSEN, JW; ZOOPNET network and partners. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 3(12), pp.558, 2009.
- THOMPSON, RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potencial. **International Journal for Parasitology**. 30(12-13), pp. 1250-1267, 2000.
- THOMPSON RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**. 126 (1-2), pp. 15-35, 2004.
- THOMPSON, RCA; MONIS, PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**. 58, pp. 69–137, 2004.
- TUNDISI, JG.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; RODRÍGUEZ, S L. **Gerenciamento e Recuperação das Bacias Hidrográficas dos Rios Itaqueri e do Lobo e da Represa Carlos Botelho (Lobo-Broa)**. IIE, IIEGA, PROAQUA, ELEKTRO, 2003.
- TZÍPORI, S; WARD, H. Criptosporidiosis biology, pathogenesis and diseases. **Microbes and Infection**. 4(10), pp. 1047 – 1058, 2002.
- UNESCO (United Nation Educational, Scientific and Cultural Organization). **A Ética do Uso da Água Doce: um levantamento**. 2001
- UNESCO (United Nation Educational, Scientific and Cultural Organization). **Water for people, Water for life**. The United Nations World Water Development Report. 2003.
- VIDAL, AMB; CATAPANI, WR. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. **Sao Paulo Medical Journal**. 123(6), pp. 282-285, 2005.
- XIAO, L; LIMOR, J; SULAIMAN, IM; ARROWOOD, MJ; LAL, AA. Differentiation of *Cryptosporidium* species, strains and isolates. **American Society of Medicine and Hygiene** 61(3), 1999.
- WIEBBELLING, AMP; MEZZARI, A; SCHENATO, LK; RICHETER, VT; BOHME, ES. Avaliação ao do conhecimento sobre criptosporidiose em uma amostra de médicos de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica e Laboratorial**. 38(2), pp 119-123, 2002.
- WHO/UNICEF (World Health Organization/United Nations Childres´s Fund). **Global Water Supply And Sanitation Assessment 2000**, 2000.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar a circulação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas de captação e pós-tratamento em uma Estação Pública de Tratamento de Água.

Objetivos Específicos

Identificar e quantificar oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em água tratada e não tratada, com uso da Técnica de Imunofluorescência Direta.

Identificar a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água tratada e não tratada por meio da nested-PCR.

Determinar as espécies de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., das amostras de água positivas, por meio de sequenciamento genético.

Determinar parâmetros físico-químicos, dados de sazonalidade no período correspondente a cada coleta e verificar a associação quanto a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM ÁGUA BRUTA E TRATADA DE UMA ESTAÇÃO PÚBLICA DE TRATAMENTO DE ÁGUA.

Detecção e Caracterização Molecular de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em Água Bruta e Tratada de uma Estação Pública de Tratamento de Água.

Jonatas Campos de Almeida¹, Felipe Danyel Cardoso Martins¹, Maira Moreira dos Santos¹, José Maurício Ferreira Neto¹, Emília Kiyomi Kuroda², Italmir Teodorico Navarro¹, João Luis Garcia¹, Roberta Lemos Freire¹.

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

² Departamento de Construção Civil, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi detectar *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água bruta e tratada em um sistema público de tratamento de água, situado no município de Londrina, Paraná, Brasil. Foram coletadas amostras de água bruta (30L) e água tratada (100L), a cada duas semanas, em um total de 48 amostras. As amostras foram examinadas pela Técnica da Membrana Filtrante, usando membranas com 47mm de diâmetro e 1,2µm de porosidade. A partir das amostras foi realizada imunofluorescência direta para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. Também foi realizado extração de DNA usando um kit comercial. O DNA extraído foi submetido a reação de *nested*-PCR (*n*-PCR) para a detecção dos protozoários. Na imunofluorescência, 2/24 (8,33%) das amostras de água bruta foram positivas para *Giardia* spp. Na *n*-PCR, 6/24 (25%) das amostras de água bruta foram positivas para *Giardia* spp. e 2/24 (8,33%) para *Cryptosporidium* spp. Das amostras de água tratada, na *n*-PCR, 1/24 (4,16%) foram positivas para *Giardia* spp. e todas foram negativas para *Cryptosporidium* spp. O sequenciamento demonstrou *C. parvum* em ambas amostras de água bruta. Após o sequenciamento foi identificada DNA de *Giardia duodenalis* em duas amostras de água bruta. Três amostras de água bruta e a água tratada positivas na *n*-PCR, após o sequenciamento, demonstrou que o DNA pertencia à bactéria ambiental *Nakamurella multipartita*. Houve correlação moderada entre turbidez e cor e a presença de *Cryptosporidium* spp. na água bruta e entre turbidez e a presença de

Giardia spp. em água bruta. A presença desses protozoários em águas de manancial de abastecimento aponta a real necessidade de monitoramento e especial atenção das companhias de tratamento de água da região, considerando a Portaria 2.914/11 do Ministério da Saúde.

Palavras-chave: protozoários, ETA, *nested-PCR*, sequenciamento.

ABSTRACT

The aim of this study was to detect the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in raw and treated water in a public water treatment system, located in Londrina city, Parana State, Brazil. Samples of raw (30L) and treated water (100L) were collected every two weeks, in a total of 48 samples. The samples were examined by Membrane Filtration Technique, using membranes with 47mm in diameter and 1.2µm porosity. From the samples was performed direct immunofluorescence for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. Also performed DNA extraction using a commercial kit. The DNA extracted was submitted to nested-PCR reaction (n-PCR) for the detection of protozoans and electrophoresis in agarose gel. In the immunofluorescence, 2/24 (8.33%) samples of raw water were positive to *Giardia* spp. In n-PCR, raw water samples were positive in 6/24 (25%) for *Giardia* spp. and in 2/24 (8.33%) for *Cryptosporidium* spp. In treated water 1/24 (4.16%) of the samples was positive to *Giardia* spp. and all were negative for *Cryptosporidium* spp. The sequencing showed *C. parvum* DNA in both samples of raw water. After the sequencing was identified *G. duodenalis* DNA in two samples of raw water. Three positive samples of raw water and the treated water to *Giardia* spp. in n-PCR, after sequencing, showed DNA concerning to the environmental bacteria *Nakamurella multipartita*. There was moderate correlation between turbidity and colour and presence of *Cryptosporidium* spp. in raw water and between turbidity and presence of *Giardia* spp in raw water; moderate correlation was observed between pH and presence of *Giardia* spp. in raw water. The n-PCR proved to be a highly sensitive technique for the diagnosis of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. The presence of these protozoans in the water supply indicates the need of monitoring and special attention considering the Ministry Health law n.2914/11 by water treatment companies of region.

Keywords: protozoans, WTS, nested-PCR, sequencing.

INTRODUÇÃO

Doenças de veiculação hídrica causadas por protozoários tem distribuição mundial e ocorrem tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, sendo causa de epidemias e endemias em seres humanos (Cotruva et al., 2004).

As doenças parasitárias de veiculação hídrica mais prevalentes que causam diarreia nos seres humanos são a criptosporidiose e a giardíase (Lane e Lloyd, 2002). *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. produzem formas infectantes (oocisto e cisto, respectivamente) que são eliminados junto com as fezes do hospedeiro infectado e são transmitidos através da água ou alimentos contaminados ou pelo contato direto (Jex et al., 2011; Cacciò e Thompson, 2005). Ambos os parasitos possuem diferentes espécies e subtipos caracterizados por métodos moleculares (Xiao et al., 2001a), muitos dos quais identificados como infecciosos para a população humana (Chalmers 2001; Fayer, 2011).

Aproximadamente, 325 surtos de transmissão hídrica documentados em todo o mundo são atribuídos a protozoários. Dentre os agentes etiológicos, *Giardia duodenalis* foi responsável por 132 surtos seguida por *Cryptosporidium parvum* como agente causador de 165 dos casos registrados (Karanis et al., 2007).

No Brasil, a Portaria 2.914/11 do Ministério da Saúde, dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Essa portaria determina que diante de uma média geométrica anual maior ou igual a 1.000 *Escherichia coli*/100mL deve-se realizar monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no(s) ponto(s) de captação de água, com o objetivo de atingir um padrão de ausência (Brasil, 2011).

No entanto, faltam dados relatando a verdadeira ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em mananciais destinados ao abastecimento, com especial atenção aos países em desenvolvimento, levando à subestimação de casos de criptosporidiose e a associação de surtos com outros patógenos (Lima e Stamford, 2003). O objetivo do presente trabalho foi detectar a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

em água bruta e tratada em uma Estação Pública de Tratamento de Água, no município de Londrina, Paraná, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local do Estudo

Londrina é o segundo maior município do estado do Paraná, Brasil, com uma população de 537.566 habitantes. (IBGE, 2013). Possui latitude entre 23°08'47" e 23°55'46" Sul e longitude entre 50°52'23" e 51°19'11" Oeste; 608 metros de altitude, clima subtropical úmido, com chuvas em todas as estações. A pluviosidade anual é de aproximadamente 1417 mm com temperatura média anual igual a 21,6°C. (Londrina, 2013).

Existem duas Estações Públicas de Tratamento de Água (ETA) no município de Londrina e apenas uma delas foi escolhida para a realização do estudo. A ETA escolhida é responsável por atender 32% da população do município, realizando o tratamento completo da água através dos processos de adução, coagulação, floculação, decantação, filtração, desinfecção por cloração, fluoretação, estocagem e distribuição (Sanepar, 2010).

O manancial utilizado pela ETA é o Ribeirão Cafezal, que de acordo com o artigo 4º da Resolução 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, após o tratamento convencional pode ser destinado ao consumo humano (Conama, 2005). A bacia hidrográfica do Ribeirão Cafezal situa-se entre as latitudes 23°16'30" e 23°22'30" Sul e as longitudes 51°11'40" e 51°23'30" Oeste (Neto e Limberger, 2002).

2. Coleta das Amostras

Foram coletados 100 litros de água tratada e 30 litros de água bruta, com periodicidade quinzenal entre setembro de 2012 a setembro de 2013, totalizando 24 amostras de água bruta e 24 amostras de água tratada. As amostras foram acondicionadas em bombonas plásticas e transportadas até a Universidade Estadual de Londrina.

3. Concentração das Amostras de Água

Foi realizada a Técnica da Membrana Filtrante, com membranas de acetato de celulose com 47 mm de diâmetro e 1,2 µm de porosidade (Millipore®). Foi utilizado um sistema de bomba a vácuo, com velocidade de filtração ajustada para 4 L/min. e seguindo os protocolos propostos por Dawson et al. (1993), Aldom e Chagla (1995) e Cantusio-Neto e Franco (2004).

4. Reação de Imunofluorescência Direta

Aliquotas de 10µl de cada amostra foram utilizados para realizar a Reação de Imunofluorescência Direta (RIFD) através do *kit* Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Bioscience), de acordo com o protocolo do fabricante.

O filtro de excitação para a visualização a RIFD era 450 a 490 nm e filtro de barreira de 520 (Redlinger et al., 2002). Os critérios para identificação de oocistos e cistos considerados foram: imunofluorescência definida pela cor verde-maçã brilhante; ausência de poros ou apêndices; tamanho e formato compatíveis: 8-12µm de tamanho e forma oval para os cistos de *Giardia* spp. e 3-8,5µm de diâmetro e formato esférico e presença (não obrigatória) de sutura no oocisto para *Cryptosporidium* spp. (Redlinger et al., 2002).

Após a enumeração dos cistos e oocistos presentes nas amostras, o cálculo de estimativa do número de cistos e oocistos/L baseou-se na fórmula proposta por Cantusio Neto e Franco (2004):

$$X = \left(\frac{\text{número de (oo) cistos}}{\text{volume do pellet avaliado (µL)}} \right) \times \left(\frac{\text{volume do pellet obtido (1mL)}}{\text{volume filtrado da amostra(L)}} \right)$$

5. Nested-PCR de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

Todas as amostras foram submetidas ao processo de extração de DNA através de *kit* comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel), conforme protocolo do fabricante.

Para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. fragmentos do gene 18S rRNA foram amplificados usando uma reação de *nested*-PCR. Os *primers* (Invitrogen) da

primeira reação foram 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' e 5'-CCCATTTCTTCGAAACAGGA-3' amplificando um produto de 1.325 pares de bases (Xiao et al., 1999). Na segunda reação os *primers* utilizados foram o 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGAT-3' e 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3', gerando um fragmento de 819-825 pares de bases (Xiao et al., 1999). A primeira reação de PCR consistia de 7,75µL de água ultrapura autoclavada, 2,5µL de solução tampão 10X concentrado, 0,5µL de dNTP (10mM), 1,25µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,25µL de Taq Polimerase (5U/ µL) e 2,5µL do DNA extraído de cada amostra teste, compondo um volume final de 25µL. Na segunda reação de PCR alteravam-se apenas os volumes de água ultrapura autoclavada (9,25µL) e do DNA (1µL). Era realizada um aquecimento inicial a 95°C por 5min., e um total de 35 ciclos, cada um consistindo de 94°C por 45seg. (desnaturação), 55°C por 45seg. (anelamento) e 72°C por 60seg (extensão). Foi incluída uma etapa de extensão final a 72°C por 5min. O limiar de detecção da técnica padronizada era de aproximadamente 10 oocistos/mL.

Para pesquisa de *Giardia* spp. fragmentos do gene 16S rRNA foram amplificados usando uma reação de *nested*-PCR. Os *primers* (Invitrogen) da primeira reação foram Gia2029 (5'-AAGTGTGGTGCAGACGGACTC-3') e Gia2150c (5'-CTGCTGCCGTCCTTGGATGT-3') amplificando um produto de 497 pares de bases (Appelbee et al., 2003). Na segunda reação os *primers* foram o RH11 (5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3') e RH4 (5'-AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3'), gerando um fragmento de 292-297 pares de bases (Hopkins et al., 1997). Cada reação de PCR consistia de 17,25µL de água ultrapura autoclavada, 2,5µL de solução tampão 10X concentrado, 0,5µL de dNTP (10mM), 0,75µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1,25µL de DMSO (dimetil sulfóxido) 5%, 0,25 µL de Taq Polimerase (5U/µL) e 1,5 µL do DNA extraído de cada amostra teste, perfazendo um volume final de 25µL. Era realizado um aquecimento inicial a 95°C por 5min., e um total de 35 ciclos, cada um consistindo de 94°C por 45seg. (desnaturação), 58°C por 45seg. (anelamento) e 72°C por 60seg. (extensão). Foi incluída uma etapa de extensão final a 72°C por 5min. A segunda reação era idêntica a primeira. O limiar de detecção da técnica padronizada era de aproximadamente 2 cistos/mL.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Ultrapure™ Agarose; Invitrogen) 1,5% corado com SYBR® Safe (DNA Gel Stain;

Invitrogen, Brasil), durante 45 minutos para *Cryptosporidium* spp. e 30 minutos no caso de *Giardia* spp. e visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados utilizando o programa *LPix Image ST* (Loccus Biotecnologia).

A partir do gel de agarose foram realizadas a extração e purificação das bandas positivas, através do *kit* comercial *QIAquick Gel Extraction*. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador *ABI3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e com o *kit* comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foram sequenciadas as fitas *forward* e *reverse*.

As sequências de nucleotídeos foram comparadas com sequências padrão de *Cryptosporidium* e *Giardia* depositadas no *Genbank*, por meio do sistema *BLAST* (*Basic Local Alignment and Search Tool*) e por alinhamento manual através do programa *BioEdit* (*Biological Sequence Alignment Editor*).

6. Parâmetros Físico-Químicos

A turbidez foi calculada usando um turbidímetro *HACH 2100Q*, o pH foi mensurado utilizando um pHmetro *Digimed DM-2P* e a cor foi calculada usando um espectrofotômetro *HACH DR/890 Colorimeter*.

7. Parâmetros de Sazonalidade

Os dados de sazonalidade (pluviosidade, umidade relativa do ar e temperatura) foram retirados do site do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR, 2013).

8. Análise Estatística

Para verificar correlação entre a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. com sazonalidade e parâmetros físico-químicos da água foi usado o Coeficiente de Correlação de Pearson (r), calculado por meio do pacote estatístico *BioEstat 5.0*. Na definição da intensidade de correlação adotou-se a seguinte forma: fraca ($0 < r < 0,40$); moderada ($0,40 \leq r < 0,7$) e forte ($0,70 \leq r \leq 1,0$) (Figueiredo Filho e Silva Júnior, 2009).

RESULTADOS

Considerando os resultados da RIFD, oocistos de *Cryptosporidium* spp. não foram detectados nas amostras de água bruta e tratada. No entanto, cistos de *Giardia* spp. foram detectados em 8,33% (2/24) amostras de água bruta e ausentes em água tratada. As concentrações de cistos de *Giardia* spp. foram de 0,42 cistos/L e 4,2 cistos/L.

Por meio da técnica de *nested*-PCR, *Cryptosporidium* spp. foi encontrado em 8,33% (2/24) das amostras de água bruta e, através do sequenciamento, ficou evidenciada a presença de *Cryptosporidium parvum*. Todas as amostras de água tratada foram negativas.

A positividade encontrada para *Giardia* spp. à *nested*-PCR foi de 20,83% (5/24) das amostras de água bruta e de 4,16% (1/24) de água tratada. Após sequenciamento, ficou evidenciado que o DNA presente em 2/5 das amostras de água bruta pertencia a *Giardia duodenalis*. Em 3/5 das amostras de água bruta e na amostra de água tratada positivas na *n*-PCR, o sequenciamento revelou que o DNA encontrado pertencia à bactéria ambiental *Nakamurella multipartita* (Tice et al., 2010). A comparação entre os resultados das três técnicas encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação dos resultados obtidos na reação de imunofluorescência direta (RIFD), *nested*-PCR e sequenciamento para os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp em amostras de água bruta e tratada de uma Estação Pública de Tratamento de Água, em Londrina, Paraná, Brasil, entre setembro de 2012 a setembro de 2013.

	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS		
	RIFD	<i>nested</i> -PCR	Sequenciamento
<i>Cryptosporidium</i> spp.	negativo	positivo	positivo
	negativo	positivo	positivo
<i>Giardia</i> spp.	negativo*	positivo*	negativo*
	negativo	positivo	negativo
	negativo	positivo	negativo
	negativo	positivo	negativo
	positivo	negativo	--
	positivo	positivo	positivo
	negativo	positivo	positivo

* amostra de água tratada; -- não realizado

Quanto aos parâmetros físico químicos, as médias para pH, cor e turbidez na água bruta foram: $9,55 \pm 12,24$, $250,54 \pm 1198,85$ e $59,20 \pm 59,26$, respectivamente; na água tratada as médias encontradas foram: $6,38 \pm 0,22$, $4,91 \pm 1,23$ e $0,40 \pm 0,1$, respectivamente. As médias de temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade foram: $21,46 \pm 4,17$, $70,43 \pm 13,51$ e $4,16 \pm 6,95$, respectivamente.

Foi encontrada correlação entre cor ($r = 0,4491$; $p = 0,0277$) e turbidez ($r = 0,5422$; $p = 0,0061$) e a presença de *Cryptosporidium* spp. e entre turbidez ($r = 0,5809$; $p = 0,0029$) e positividade para *Giardia* spp. (Tabela 2)

Tabela 2 – Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros físico-químicos e de sazonalidade para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água bruta de uma Estação Pública de Tratamento de Água em Londrina, Paraná, Brasil, setembro de 2012 a setembro de 2013.

PARÂMETROS AVALIADOS	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
pH	P= 0,7535 r= - 0,0676	P= 0,7803 r= - 0,0600
Cor	P= 0,0277 r= 0,4491*	P= 0,0621 r= 0,3863
Turbidez	P= 0,0061 r= 0,5422*	P= 0,0029 r= 0,5809*
Temperatura	P= 0,2929 r= 0,2238	P= 0,0461 r= - 0,4108
Umidade	P= 0,9336 r= - 0,0179	P= 0,3328 r= 0,2065
Pluviosidade	P= 0,6157 r= - 0,1079	P= 0,6157 r= - 0,1079

*correlação significativa.

DISCUSSÃO

O presente trabalho identificou a presença dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. no manancial de abastecimento pesquisado, resultado este semelhante a outras pesquisas que têm demonstrado a ocorrência desses protozoários em mananciais de abastecimento nas diferentes regiões do planeta (Mahmoudi et al., 2013; Julio et al., 2012; Neto et al., 2010; Nishi et al., 2008).

Por meio do sequenciamento genético foi identificada a presença de *Cryptosporidium parvum* em 2/2 amostras positivas de água bruta. *C. parvum* apresenta menor especificidade de hospedeiro, sendo considerado zoonótico e de grande interesse em Saúde Pública (Fayer, 2004). De acordo com Fayer et al. (2000) o consumo de água contaminada, surge como a principal via de infecção

humana e, pelo menos, 165 surtos epidêmicos registrados nos últimos anos ocorreram devido ao consumo de água contendo oocistos do *C. parvum*.

Na China, Xiao et al. (2013) encontraram oocistos do protozoário em 86,4% (57/66) dos locais de coleta de água, Lee et al. (2013) em rios da Malásia relataram prevalência de 23,1% (9/39). No Brasil, Araújo et al. (2011) descreveram a circulação do protozoário em 30% (9/30) das amostras de água da região de São Paulo-SP enquanto que Osaki et al. (2013), na região de Curitiba-PR, encontraram *Cryptosporidium* spp. em 2/4 dos pontos de coleta de águas de captação de um sistema de tratamento de água.

Diferentes trabalhos envolvendo análise molecular e sequenciamento de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. vêm sendo conduzidos com o intuito de compreender melhor a epidemiologia ambiental do parasito. Foram relatadas as ocorrências de *C. meleagridis*, *C. hominis*, *C. parvum* e *C. andersoni* em amostras de água (Araújo et al., 2011; Lee et al., 2013; Ruecker et al., 2013).

Entre as amostras positivas na reação de *n*-PCR e confirmadas no sequenciamento, 2/5 das amostras positivas de água bruta foram confirmadas como *Giardia duodenalis*. Existem seis espécies conhecidas de *Giardia*, mas apenas a *G. duodenalis* apresenta uma ampla gama de hospedeiros e é a única espécie de interesse na Saúde Pública (Thompson e Monis, 2004), evidenciando a importância dos achados no presente trabalho. *Giardia* spp. apresenta um significativo impacto na Saúde Pública porque além da sua alta prevalência e dos custos para tratamento da doença, é capaz de causar grandes surtos, afetar o crescimento e o desenvolvimento cognitivo infantil (Feng e Xiao, 2011). A importância da ocorrência desse protozoário em águas destinadas ao consumo humano pode ser exemplificada: o maior surto de giardíase com veiculação hídrica ocorreu na Noruega, em 2004, envolvendo aproximadamente 1500 indivíduos e foi causado pela *G. duodenalis* (Robertson et al., 2006).

Nesse estudo foi também possível quantificar o grau de contaminação da água através da RIFD, com a observação de concentrações de cistos de *Giardia* spp. de 0,42 cistos/L e 4,2 cistos/L, em duas amostras de água bruta. A dose infectante para o ser humano é relativamente baixa: 10 cistos podem causar infecção (Steiner, Thielman e Guerrant, 1997).

Descrições sobre a ocorrência desses protozoários em amostras de água já foram relatadas anteriormente. Foram descritas prevalências de cistos de *Giardia*

spp. de 92,3% em água de rio, 55,5% em reservatórios de água, 45,2% e 26,9%, respectivamente, em água bruta de empresas de tratamento de água pequenas e convencionais, 19,2% em pequenas instalações de tratamento de água e em 26,8% da água de torneira de municípios que realizavam apenas a cloração da água (Carmena et al., 2007). No Japão, Haramoto et al. (2012), coletaram 64 amostras de águas de rio em 16 estações de tratamento e encontraram prevalência de 36%.

Estudos de sequenciamento de amostras de água positivas para *Giardia* spp. também vêm sendo conduzidos para determinar a espécie envolvida. *Giardia duodenalis* foi descrita em amostras de água de cisternas com fins de consumo e em um surto de diarreia em seres humanos devido ao consumo de água potável (Ahmed et al., 2010; Cheun et al., 2013)

O sequenciamento genético dos isolados no presente trabalho apontou a presença de *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis* em amostras de água bruta, ambos de caráter zoonótico e responsáveis por prejuízos à Saúde Pública, enfatizando a necessidade de ações de caráter preventivo de surtos de origem hídrica. Nos últimos anos têm crescido o interesse na transmissão zoonótica de *C. parvum* e *G. duodenalis*, sobretudo em relação à transmissão realizada pelo gado bovino e outros animais de produção (Coklin et al., 2007). As prevalências relatadas de ambos protozoários são elevadas em gado leiteiro, particularmente entre os bezerros (O'Handley, 2000). Esse fato explicaria a ocorrência de ambos os protozoários no manancial analisado, uma vez que o Ribeirão Cafezal engloba propriedades de bovinocultura leiteira ao longo do seu curso até a ETA.

Outro ponto que deve ser ressaltado é a demonstração na PCR de reações cruzadas entre *Giardia* spp. e a bactéria ambiental *N. multipartita*, deixando claro a necessidade da confirmação de amostras positivas através de sequenciamento e da associação das duas técnicas melhorando a sensibilidade do diagnóstico e garantindo maior confiabilidade dos resultados. Em vista dos resultados falsos positivos na *n*-PCR, é evidente a importância do uso da técnica de sequenciamento para, de fato, poder assegurar resultados positivos para protozoários em amostras de água.

Valores baixos de turbidez são fundamentais para um melhor desempenho do processo de desinfecção da água nas estações de tratamento (Cerqueira, 2008). Encontrou-se correlação moderada para cor e turbidez para presença de

Cryptosporidium spp. em água bruta e correlação moderada para turbidez e presença de *Giardia* spp em água bruta.

Correlações para os mesmos parâmetros analisados e a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. também foram descritas por Lopes et al. (2009), Nieminski et al. (2008), Nishi et al. (2009), Cantusio Neto e Franco (2004) e Ahmad et al. (1997).

O sistema de tratamento de água aplicado pela ETA avaliada foi eficiente, garantindo a remoção de (oo)cistos presentes em amostras de água bruta, uma vez que nas amostras de água tratada não foram encontrados traços dos parasitos. Independente da negatividade dos resultados em amostras de água tratada é necessário que as empresas responsáveis pelo tratamento de água adotem um método eficaz para o monitoramento contínuo desses protozoários em amostras de água, atendendo a Portaria 2.914/11 do Ministério da Saúde.

Elevadas concentrações desses dois protozoários na água bruta têm sido correlacionadas a concentrações elevadas ou detecções frequentes em água tratada. Desse modo, o monitoramento da água bruta deve ser um importante instrumento de controle e vigilância da qualidade da água tratada (Heller et al., 2004). Além disso, *Cryptosporidium* e *Giardia* são refratários aos tratamentos convencionais utilizados nas estações de tratamento de água, tornando-os ainda mais importantes dentro da Saúde Pública (Karanis et al., 2007). Desse modo, determinar fontes de contaminação e manter a qualidade da água são pontos fundamentais (Fayer, 2004; Thompson e Monis, 2004; Austin et al., 2012).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) propôs o Método 1623 para detectar *Cryptosporidium* e *Giardia* em água, sendo reconhecido internacionalmente por sua alta eficiência. O Método 1623 inclui fases de concentração, separação imunomagnética e microscopia de imunofluorescência. Uma das desvantagens do método é que, embora identifique os gêneros, *Cryptosporidium* ou *Giardia*, é incapaz de apontar qual a espécie e, dessa forma, não pode determinar viabilidade ou infectividade de (oo)cistos detectados e caráter zoonótico dos isolados (USEPA, 2005). Para solucionar essa desvantagem do Método 1623, têm sido associados métodos moleculares, apresentando melhoras na capacidade de detecção de baixos níveis de contaminação por protozoários em amostras de água (Betancourt e Rose, 2004). Porém, até o presente momento, não

há um método de eleição mundial para pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* em água (Fregonesi et al., 2012).

CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato da ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis* em água de manancial destinadas ao abastecimento da população do município de Londrina, Paraná, Brasil.

O uso da *nested-PCR* para auxiliar nas pesquisas desses dois parasitos em amostras de água, se mostrou válida. A utilização adicional do sequenciamento genético validou os resultados encontrados na *nested-PCR*, além de apontar quais eram as espécies presentes nas amostras, ficando evidente o caráter zoonótico dos isolados.

A observação de resultados falsos positivos na *nested-PCR* aponta a importância da confirmação, por meio do sequenciamento, de amostras positivas, assegurando a confiabilidade do diagnóstico final.

A circulação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. na região estudada reforça a necessidade do cumprimento da Portaria 2.914/11 do Ministério da Saúde por parte das companhias de tratamento de água, para garantir o fornecimento seguro de água para a população atendida, evitando eventuais surtos de origem hídrica e impactos negativos na Saúde Pública.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Companhia de Saneamento do Paraná pela disponibilidade e ajuda oferecidas durante o desenvolver da presente pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- Ahmad RA, Lee E, Tan ITL, Mohamad-Kamel AG. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw and treated water from two water treatment plants in Selangor, Malaysia. *Water Res* 1997;31:3132–3136.
- Ahmed W, Vieritz A, Goonetilleke A, Gardner T. Health Risk from the Use of Roof-Harvested Rainwater in Southeast Queensland, Australia, as Potable or Nonpotable Water, Determined Using Quantitative Microbial Risk Assessment. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:7382-7391.
- Aldom JE, Chagla AH. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. *Let Appl Microbiol* 1995;20:186–187.
- Appelbee AJ, Frederick LM, Heitman TL, Olson ME. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beefcalves in Alberta, Canada. *Vet Parasitol* 2003;11:289–294.
- Araújo RS, Dropa M, Fernandes LN, Carvalho TT et al. Genotypic Characterization of *Cryptosporidium hominis* from Water Samples in São Paulo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2011;85:834–838.
- Austin Z, Alcock RE, Christley RM, Haygarth PM et al. Policy, practice and decision making for zoonotic disease management: water and *Cryptosporidium*. *Env Internat* 2012;40:70–78.
- Brasil. Portaria No. 2914/11: “Estabelece o monitoramento dos parâmetros de gosto e odor, saxitoxina, cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.*”. Diário Oficial da União. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil, 14 dezembro 2011.
- Betancourt WQ, Rose JB. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet Parasitol* 2004;126:219-234.
- Cantusio-Neto R, Franco RMB. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* em diferentes pontos do processo de tratamento de água em Campinas, São Paulo, Brasil. *Hig Alim* 2004;18:52–59.
- Carmena D, Aguinagalde X, Zigorraga C, Fernández-Crespo JC et al. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *J Appl Microbiol* 2007;102:619–629.
- Cerqueira, DA. Remoção de oocistos de *Cryptosporidium* e de indicadores no tratamento de água por ciclo completo, filtração direta descendente e dupla filtração, em escala piloto. 2008. 214f Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- Chalmers, R. Importance of unusual *Cryptosporidium* species and genotypes in human cryptosporidiosis. <http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa/lt2/upload/importanceofunusualcrypto.pdf>. 2011. Acesso em 10 de outubro de 2013.

Cheun HI, Kim CH, Cho SH, Ma DW, Goo BL, Na MS, Youn SK, Lee WJ. The first outbreak of giardiasis with drinking water in Korea. *Osong Public Health Res Persp* 2013 4(2):89-92.

Coklin T, Farber J, Parrington L, Dixon B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol* 2007 150(4):297-305.

Conama (Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasil). Resolução No. 357: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, Brasil, de 18 de março de 2005.

Cotruva JA, Dufour A, Rees G, Bartram J, et al. Waterborne zoonoses: identification, causes and control. World Health Organization, IWA Publishing, 2004.

Dawson DJ, Maddocks M, Roberts J, Vidler JS. Evaluation of recovery of *Cryptosporidium parvum* oocysts using membrane filtration. *Let in Appl Microbiol* 1993;17:276–279.

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium* transmission, detection and identification. *Int Parasitol* 2000, 30(1):12-13.

Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 2004;126:37-56.

Fayer R. Species and genotypes of *Cryptosporidium*. <http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa/lt2/upload/speciesandgenotypesofcrypto.pdf>, 2011. Acesso em 10 de outubro de 2013.

Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011 24(1):110-40.

Figueiredo Filho DB, Silva Júnior JA. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). *Pol Hoje* 2009;18:115-146.

Fregonesi BM, Sampaio CF, Ragazzi MF, Tonani KAA et al. *Cryptosporidium* e *Giardia*: desafios em águas de abastecimento público. *O Mundo da Saúde* 2012;36:602-609.

Haramoto E, Kitajima M, Kishida N, Katayama H et al. Occurrence of Viruses and Protozoa in Drinking Water Sources of Japan and Their Relationship to Indicator Microorganisms. *Food Environ Virol* 2012;4:93-101.

Heller L, Bastos RKX, Vieira MBC, Bevilacqua PD, Brito LLA, Mota SMM, Oliveira AA, Machado PM, Salvador DP, Cardoso AB. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epidemiol Serv Saúde* 2004 13(2):pp. 79-92.

Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD et al. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* 1997; 83:44–45.

IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná). <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1828>. Acesso em 10 de outubro de 2013.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=411370>. Acesso em 05 de novembro de 2013.

Jex AR, Chalmers RM, Smith HV, Widmer G et al. *Oxford Textbook of Zoonoses*. Oxford University Press, New York 2011:536–568.

Julio C, Sá C, Ferreira I, Martins S et al. Waterborne transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* at river beaches in Southern Europe (Portugal). *J Water Health* 2012;10:484.

Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water and Health* 2007; 5:1-38.

Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Cr Rev Microbiol* 2002;28:123-147.

Lee SC, Ngui R, Tan TK, Roslan MA et al. Aquatic biomonitoring of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in peninsular Malaysia. *Env Sc Pol Res Int* (no prelo) 2013.

Lee Y, Tsaihong JC, Tseng Y, Tsai C et al. Development of PCR-RFLP method to distinguish between *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis* in Taiwan water samples. *S Asian J Trop Med Pub Health* 2013;44:13-18.

Lima EC, Stamford TLM. *Cryptosporidium* spp no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. *Ciên e Saúd Col* 2003; 8:791-800.

Londrina, 2013. Disponível em: <http://www1.londrina.pr.gov.br>. Acessado em 05 de novembro de 2013

Lopes AMMB. Avaliação da Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp. e sua Associação com Indicadores Bacteriológicos e Turbidez na Represa de Vargem das Flores – MG. 2009. 109f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

Mahmoudi MR, Kazemi B, Mohammadiha A, Mirzaei A et al. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cysts by IFA, PCR and LAMP in surface water from Rasht, Iran. *Trans R SocTrop Med Hyg* 2013;107:511-517.

Neto OCP, Limberger L. Estudo da adequabilidade do uso do solo na área rural, através de técnicas de geoprocessamento. *Geo* 2002;11:171-183.

- Neto RC, dos Santos LU, Sato MI, Franco RM. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, southeast Brazil. *Water Sci Tech* 2010;62:217-222.
- Nieminski E, Durrant G, Hoyt M, Kidd R et al. Is monitoring for *E. coli* a good surrogate for *Cryptosporidium* occurrence in water? *Am Water Works Assoc. Conf Proc*, 2008.
- Nishi L, Baesso ML, Santana RG, Fregadolli P et al. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system. *Zoonoses Public Health*, 56(5), pp. 221–228, 2009.
- Nishi L, Bergamasco R, Toledo MJO, Falavigna DLM et al. *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in the Ivaí Indigenous Land, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Dis* 2008;9:543-547.
- O’Handley RM, Olson ME, Fraser D, Adams P, Thompson RC. Prevalence and genotypic characterization of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Vet. Parasitol* 2000 90, 193–200.
- Osaki SC, Thomaz-Soccol V, Costa AO, Oliveira-Silva MB et al. Polymerase chain reaction and nested-PCR approaches for detecting *Cryptosporidium* in water catchments of water treatment plants in Curitiba, State of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;46:270-276.
- Redlinger T, Corela-Barud V, Graham J, Galindo A et al. Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States – México border. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:794-798.
- Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK, Strand et al. Application of Genotyping during an Extensive Outbreak of Waterborne Giardiasis in Bergen, Norway, during Autumn and Winter 2004. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2212–2217.
- Ruecker NJ, Matsune JC, Lapen DR, Topp E et al. The detection of *Cryptosporidium* and the resolution of mixtures of species and genotypes from water. *Infec Gen Evol* 2013;15:3–9.
- Sanepar (Companhia de Saneamento do Paraná). Gerência Metropolitana de Londrina: Relatório de Gestão. Nível II, 2010.
- Steiner TS, Thielman NM, Guerrant RL. Protozoal agents: what are the dangers for the public water supply? *Annu Rev Med* 1997;48:329--40.
- Thompson RCA, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 2004;58:69–137.
- Tice H, Mayilraj S, Sims D, Lapidus A et al. Complete genome sequence of *Nakamurella multipartita* type strain (Y-104). *Stand Genomic Sci* 2010;2:168-75

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. 1999.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. 2005.

Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A et al. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3386–3391.

Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk TK et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl Environ Microbiol* 2001a;67:1097-1101.

Xiao G, Qiu Z, Qi J, Chen J et al. Occurrence and potential health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the Three Gorges Reservoir, China. *Water Res* 2013;47:2431-2445.

CONCLUSÃO

Esse é o primeiro trabalho a descrever a ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis* em água bruta de uma Estação Pública de Tratamento de Água no município de Londrina, PR, Brasil.

O uso da Reação de Imunofluorescência Direta permitiu identificar e quantificar a presença de cistos de *Giardia* spp. em água bruta, fornecendo o grau de contaminação da água.

Por meio das técnicas de *nested*-PCR e sequenciamento genético foi possível detectar os protozoários *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis* no manancial estudado, ambos de caráter zoonótico e de grande interesse e impacto na Saúde Pública, reforçando a necessidade de adequação das empresas de tratamento de água a Portaria 2.914/11 do Ministério da Saúde.

O sequenciamento genético das amostras provou ser uma ferramenta válida para confirmar resultados positivos na *nested*-PCR, assegurando a qualidade do diagnóstico final.

Foi encontrada correlação entre cor e turbidez e a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de turbidez para a presença de cistos de *Giardia* spp. A turbidez é um importante parâmetro para o sucesso do tratamento de água e pode orientar ações de prevenção contra esses dois parasitos.

ANEXO A

NORMAS PARA SUBMISSÃO DA REVISTA VECTOR-BORNE AND ZONOTIC DISEASES.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Vector-Borne and Zoonotic Diseases is a peer-reviewed journal that includes articles on diseases transmitted to humans by mosquitoes, ticks, and other arthropod vectors or directly by other animals. The Journal emphasizes the following topics: ecology, entomology, microbiology, immunology, and wildlife biology, as well as other subjects relevant to the transmission of infectious diseases to humans directly from the environment or through vectors. A primary goal of this peer-reviewed journal is the integration of field, laboratory, and clinical sciences for the purpose of establishing causal relationships between clinical medicine and the environment that will lead to improved understanding of this group of neglected but important diseases and contribute to their successful management and prevention. The Journal develops and encourages publication standards to foster effective and reliable data collection, analysis, interpretation, and communication. The Journal does not publish articles that have been submitted elsewhere or have been previously published.

Formats. Original research manuscripts should not exceed 3,000 words and must be presented in the standard format described below. **Short reports** and **case studies** should not exceed 1,000 words with no more than 10 references and one table or figure. **Editorials and commentaries** may be on any issue relevant to the field, but must be brief and appropriately documented by data. **Reviews papers**, of up to 5,000 words in length, are summaries of developments in the field. All submissions are subject to peer-review. To help defray the cost of printing the Journal requests page charges of \$75 per printed page be paid by all authors who have funds available from research grants or from their institutions. It should be noted that ability to pay page charges is not a prerequisite for publication in the Journal.

Please read all the instructions to authors before submitting.

Authorship. All authors, including the co-authors, should be responsible for a significant part of the manuscript. All authors and co-authors should have taken part in writing the manuscript, reviewing it, and revising its intellectual and technical content, and all must sign the cover letter accompanying the manuscript. Any author whose name appears on a paper assumes responsibility and accountability for the results.

Preparation of Manuscripts

Manuscripts should be submitted **double-spaced** and leave ample margins on both sides, top and bottom. Submit a running title of about 45 characters (including spaces), and the full contact information for the corresponding author. Also provide a structured abstract of no more than 300 words.

As part of your text file, include a title page that contains the title of your paper, all authors' names, affiliations, email addresses and keywords.

Text. Organize the text as follows: *Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgments, and References*. At the first usage of a term, spell out the term and give the abbreviation or acronym in parentheses. Thereafter, use the abbreviation/acronym alone. Use generic names for drugs where possible. If you wish to use a proprietary drug name, the first time it appears use the generic name followed by the proprietary name, manufacturer, and city in parenthesis. If propriety names must be used, include trademark information. Scientific names for species must appear with genus spelled in full on first occurrence and abbreviated thereafter. Family names should appear on first occurrence of uncommon species. **Tables.** Submit each table, with its title, as a separate file. Use Arabic numerals to number tables. Details of experimental conditions should be included in the table footnotes. Table legends and footnotes should be double-spaced. **Acknowledgments.** The author should acknowledge only those people and institutions that have made significant contributions to the study. Details of sources of funding must be given and any potential conflicts of interest declared, e.g., financial, personal, political or academic. **Disclosure Statement** Immediately following the *Acknowledgments* section,

include a section entitled "Author Disclosure Statement" In this portion of the paper, authors must disclose any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with submitted manuscripts. This statement should include appropriate information for EACH author, thereby representing that competing financial interests of all authors have been appropriately disclosed according to the policy of the Journal. It is important that all conflicts of interest, whether they are actual or potential, be disclosed. This information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision.

Please see the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* at <http://www.icmje.org/index.html#conflicts> for further guidance.

If no conflicts exist, the authors must state "No competing financial interests exist."

References. The references should be cited in the text using the name/date system. The reference list at the end of the paper should be double-spaced and organized alphabetically by name and year. List only the first four authors followed by "et al." For accepted papers not yet published, cite the journal and add "*in press*." If references to personal communications or unpublished data are used, cite them parenthetically in the text, not in the references. Sources for personal communications must provide written approval at the time of submission. Authors are responsible for the accuracy of references. References should be presented as shown below:

Journal example: Chadee DD, Kitron U. Spatial and temporal patterns of imported malaria cases and local transmission in Trinidad. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:513-517.

Book example: Fish D. Population ecology of *Ixodes dammini*. In: Ginsberg, H, ed. *Ecology and Environmental Management of Lyme Disease*. New Jersey: Rutgers University Press; 1993:25-42.

Correspondence address. After the references, provide the name, address, and e-mail of the person to whom all correspondence should be directed.

Please do not upload a PDF of your text file.

IMPORTANT:

Please do **NOT** upload a single PDF file containing all of the text, figure, and table files of your paper. Once all of your files are uploaded on to Manuscript Central, the system will automatically create a PDF proof for you.

ADDITIONAL INFORMATION ABOUT ART FILES

Converting Word or Excel files: Perhaps the best and easiest way to **convert Word or Excel files** into a format which is suitable for print is to scan them using the below guidelines:

- All files should be scanned at 100% size
- 300 dpi
- Final color mode: cmyk
- Save file as: .tif or .eps
- If you need directions on how to **convert a Power Point slide** to acceptable format go to [Www.liebertpub.com/MEDIA/pdf/ppconvert.pdf](http://www.liebertpub.com/MEDIA/pdf/ppconvert.pdf)

PERMISSIONS

Figures, tables, and text taken from other sources must be accompanied by a written statement from both author and publisher granting permission for reproduction. Include written permission from authors to cite unpublished data or papers still in press.