



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MEYLIN BAUTISTA GUTIERREZ

Ocorrência e caracterização molecular de cistos *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água bruta do Rio Rímac, nas províncias de Lima e Callao, Peru.

CAMPINAS
2015



MEYLIN BAUTISTA GUTIERREZ

Ocorrência e caracterização molecular de cistos *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água bruta do Rio Rímac, nas províncias de Lima e Callao, Peru.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestrado em Biologia Animal na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MEYLIN BAUTISTA GUTIERREZ E ORIENTADA PELA ORIENTADORA PROFA. DRA. REGINA MAURA BUENO FRANCO

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. REGINA MAURA BUENO FRANCO

CAMPINAS
2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 142599/2013-1

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B328o Bautista Gutierrez, Meylin, 1980-
Ocorrência e caracterização molecular de cistos *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água bruta do Rio Rímac, nas províncias de Lima e Callao, Peru / Meylin Bautista Gutierrez. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Regina Maura Bueno Franco.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Giardia*. 2. *Cryptosporidium*. 3. Água bruta. 4. Imunofluorescência. 5. Genes. 6. Lima (Peru). I. Franco, Regina Maura Bueno, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Occurrence and molecular characterization of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw water from the Rímac River, in the provinces of Lima and Callao, Peru

Palavras-chave em inglês:

Giardia

Cryptosporidium

Raw water

Immunofluorescence

Genes

Lima (Peru)

Área de concentração: Relações Antrópicas, Desenvolvimento, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Regina Maura Bueno Franco [Orientador]

Danilo Ciccone Miguel

Vagner Ricardo da Silva Fiuza

Data de defesa: 16-12-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Campinas, 16 de dezembro de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Prof. Dr. Vagner Ricardo Da Silva Fiuza

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

EM HOMENAJE

Ao Sr. Jose Luis Llanos Carrillo †

† *In memoriam*

DEDICATORIA

A Deus que me deu fé suficiente para terminar este trabalho, dando-me força para não desistir, serenidade para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso e sabedoria para distinguir umas das outras. Obrigada meu Deus!

A minha mãe Nery Gutierrez Romo, a mulher mais admirável que eu conheço, por ser exemplo de coragem na vida, íntegra e grande profissional, me incentivando na realização profissional e pessoal, fazendo dos meus sonhos serem seus e acreditando em mim sempre.

A meu pai Mario Bautista †, desde criança sempre tratei de imitar-te, meu muso inspirador na Biologia, grande pai, admirável profissional, embora não estando presente nesse mundo, sempre sinto a tua presença na minha vida.

A meu amado esposo Gerson Espiritu Ledesma, minha força, minha vida, por acreditar em mim, encorajando-me nos momentos de fraqueza, e porque teu amor na minha vida é um motivo a mais para ser feliz.

A meu filho Tiago Gutierrez Ledesma a razão da minha vida, embora estejas ainda dentro da mamãe, já sabes o que é sentir um esforço acadêmico, me acompanhado nestes dias. Te amo, meu bebê.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco meu sincero agradecimento pelos ensinamentos profissionais e da vida, pela paciência em me orientar, a uma aluna estrangeira e apesar da pouca experiência e barreiras do idioma confiou-me o desenvolvimento deste estudo. Obrigada por me ensinar e abrir as portas do mundo da Parasitologia Ambiental nunca antes conhecido.

À Dra. Angelica Terashima Iwashita, pela atenção e disposição em colaborar com a realização do presente trabalho facilitando o uso do seu laboratório e pessoal de trabalho para as saídas de campo no Peru.

Aos professores integrantes da Banca do Exame de Qualificação e Pré-Banca Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel, Prof. Dr. Aricio Xavier Linares, pelas sugestões e considerações que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Dr. Vagner Ricardo Fiuza da Silva, pelo enorme conhecimento e por todas as vezes as quais me ajudou a resolver os problemas nas análises moleculares.

À Dra. Juliana Jose, pela valiosa ajuda em fazer o posicionamento filogenético ainda que em momentos difíceis de sua vida. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Aricio Xavier Linares pela ajuda em fazer as análises estatísticas.

Aos meus colegas de laboratório L1: Taís Rondello Bonatti, Sandra Yamashiro, Carolina Ortiz Pineda pela valiosa amizade, companheirismo, disponibilidade e apoio nas tarefas profissionais; vocês sempre serão lembrados com muitas saudades no meu coração; ao Nilson Branco e Diego Averaldo Guiguet Leal obrigada pela amizade e orientações.

Ao Biólogo Marco Antonio Canales Ramos pela ajuda desinteressada em me acompanhar na saídas de campo no Peru, estarei muito grata sempre.

Aos meus colegas Cesar Corat Ribeiro Prado e Tiago Manuel Fernandes Mendes por fazer do trabalho um momento agradável e divertido.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo, incentivando à ciência.

RESUMO

A qualidade de água reflete a qualidade de vida dos indivíduos e de todo o ambiente. As fontes de água doce utilizadas pelo ser humano hoje sofrem um contínuo processo de degradação devido ao despejo de efluentes. O rio Rímac é o principal manancial que abastece 77% da população do Estado de Lima, Peru. Atualmente, esse rio apresenta um processo crescente de deterioração da qualidade de suas águas ao longo de todo seu trajeto. O objetivo desse estudo foi verificar a ocorrência e realizar a caracterização molecular de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. eventualmente presentes em águas brutas do rio Rímac, onde são inexistentes os estudos sobre esses protozoários patogênicos em amostras de água. Foram colhidas 60 amostras de água bruta do rio Rímac, em três pontos de coleta “Ponte Los Angeles” Chaclacayo, “Ponte Balta” Cercado de Lima e “Ponte Faucett” Callao, nos meses de Janeiro e Fevereiro, nos anos de 2014 e 2015. As diversas amostras de água foram concentradas mediante a técnica de filtração em membranas de ésteres mistos de celulose de 47 mm de diâmetro e porosidade nominal de 3 µm. A visualização de cistos e oocistos foi efetuada pelo método de Reação de Imunofluorescência Direta (RID) e para pesquisa de *Cyclospora cayetanensis*, empregou-se a técnica de flutuação em solução saturada de sacarose. A análise estatística foi realizada com o emprego dos Testes de Tukey e de Correlação de Pearson com o objetivo de comparar os dados de ocorrência dos protozoários patogênicos entre os pontos de coleta e de verificar a existência de correlação entre *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e as características físicas e químicas bem como vazão das águas brutas superficiais do rio Rímac. Para as análises moleculares, foram amplificados fragmentos de gene *tpi*, *bg* para *Giardia* e *18S rRNA* para *Cryptosporidium*, mediante *Nested* PCR. Os produtos da PCR foram purificados visando o sequenciamento de nucleotídeos e posição filogenética. De um total de 60 amostras de água bruta, confirmou-se a positividade para *Giardia* spp. em 56 (93,3%) delas. Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em 9 amostras (15%) analisadas. Para cistos de *Giardia*, verificou-se a existência de correlação positiva com turbidez, temperatura, pH e vazão, conforme o ponto de coleta. Para oocistos de *Cryptosporidium* não houve correlação significativa entre o número de oocistos e as características físicas e químicas da água nos diferentes pontos de coleta. Oocistos de *Cyclospora cayetanensis* não foram detectados nas amostras analisadas. Os estudos moleculares

confirmaram a presença de *Giardia duodenalis* nas diversas amostras e a caracterização molecular indicou a ocorrência dos grupos genéticos A e B, sendo que o sub-genótipo AII foi predominante nas amostras de água. Os sub-tipos AI e BIII foram detectados em apenas uma amostra. O sequenciamento para *Cryptosporidium* resultou em perfis compatíveis com *C. hominis*, *C. meleagridis* e *C. baileyi*.

Palavras-chaves: *Giardia* spp.; *Cryptosporidium* spp.; água bruta; Reação de Imunofluorescência Direta; *Nested* PCR; gene; *tpi*; *bg*; *18S rRNA*; sequenciamento; posição filogenética; Lima; Peru.

ABSTRACT

Water quality reflects the life quality of individuals and environment. Nowadays, freshwater sources used for human being suffers a continuous process of degradation due to discharge of effluents. The Rimac River is the main source that supplies 77% of the population from State of Lima, Peru. Currently, this river presents a growing process of deterioration in the water quality throughout its path. The aim of this study was to investigate the occurrence and perform molecular characterization of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. possibly present in raw water from the Rimac River, where there are not virtually any studies on these pathogenic protozoa in water samples. It was collected 60 samples of raw water from the Rimac River at three sampling points "Los Angeles Bridge" Chaclacayo, "Balta Bridge" Cercado de Lima and "Faucett Bridge" Callao, in January and February from 2014 and 2015. The water samples were concentrated by cellulose ester membrane filtration technique of 47 mm diameter and 3 µm of nominal porosity. The cysts and oocysts visualization was done by Direct Immunofluorescence assay (IFA), and for *Cyclospora cayetanensis* oocyst detection it was used the saturated sucrose flotation technique. Statistical analysis were performed with the employment of Pearson's correlation and Tukey tests in order to compare the occurrence data from pathogenic protozoa among the sampling points and check the correlation between *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and physical and chemical characteristics as well as the surface water flows from Rimac River, Lima, Peru. For molecular analysis, *tpi* and *bg* gene fragments for *Giardia* and *18S rRNA* for *Cryptosporidium* were amplified by *Nested* PCR. The PCR products were purified in order to verify the nucleotide sequencing and for phylogenetic analysis. From a total of 60 samples of raw water, it was confirmed the positive results for *Giardia* spp. in 56 (93.3%) of them. *Cryptosporidium* oocysts were detected in 9 (15%) of the samples analyzed. For *Giardia*, there was a positive correlation with turbidity, temperature, pH and flow rate as well as the sampling point. Regarding *Cryptosporidium*, there was no significant correlation between the number of oocysts and the physical and chemical parameter at the different sampling points. Oocysts of *Cyclospora cayetanensis* were not detected in analysed samples. The molecular studies confirmed the presence of *Giardia duodenalis* on several samples and this analysis indicated the occurrence of genetic groups A and B, and the sub-type IIA was

the predominant genotype in the water samples. The subtypes AI and BIII were in only one sample. Sequencing for *Cryptosporidium* resulted in profiles compatible with *C. hominis*, *C. meleagridis* and *C. baileyi*.

Keywords: *Giardia* spp.; *Cryptosporidium* spp.; raw water; Direct Immunofluorescence assay; Nested PCR; gene; *tpi*; *bg*; *18S rRNA*; sequencing; phylogenetic position; Lima; Peru.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Localização geográfica dos pontos de coleta das amostras no Rio Rímac, localizados na província de Lima e Callao. Ponto 1) Ponte “Los Angeles” Chaclacayo, 2) Ponte “Balta” Cercado de Lima, Ponto 3) Ponte “Faucett” Callao..... 55
- Figura 2:** Sistema de Filtração de Membrana com bomba de vácuo, motor e porta filtro de plástico (Nalgere®)..... 57
- Figura 3:** Membrana de celulose após a filtração da água bruta dos três pontos de coleta P1 - Ponte Los Angeles, P2 - Ponte Balta, P3 - Ponte Faucett do rio Rímac 2014 - 2015 Lima, Peru..... 58
- Figura 4:** Cisto de *Giardia* spp. marcado com anticorpos monoclonais anti-*Giardia*, conjugados com Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Fig. 4a), visualizados mediante Contraste interferencial diferencial (DIC) (Fig. 4b) e Teste confirmatório com corante fluorogênico vital, DAPI (4´6- diamidino-2-fenilindole) (Fig. 4c) detectados em uma amostra de água bruta no Distrito de Chaclacayo - Ponte “Los Angeles” do Rio Rímac Lima, Peru (Janeiro e Fevereiro, 2014)..... 79
- Figura 5:** Cisto de *Giardia* spp. marcado com anticorpos monoclonais anti-*Giardia*, conjugados com Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Fig. 5a), visualizados mediante Contraste interferencial diferencial (DIC) (Fig. 5b) e Teste confirmatório com corante fluorogênico vital, DAPI (4´6- diamidino-2-fenilindole) (Fig. 5c) detectados em uma amostra de água bruta no Distrito de Cercado de Lima - Ponte “Balta” do Rio Rímac Lima, Peru (Janeiro e Fevereiro, 2015)..... 79
- Figura 6:** Oocisto de *Cryptosporidium* spp. marcado com anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium*, conjugados com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Fig. 6a), visualizado mediante Contraste interferencial diferencial (DIC) (Fig. 6b) e Teste confirmatório com corante fluorogênico vital, DAPI (4´6- diamidino-2-fenilindole) (Fig. 6c) presente na amostra de água bruta no Distrito del Callao - Ponte “Faucett” do rio Rímac Lima, Peru (Janeiro e Fevereiro, 2015)..... 80
- Figura 7:** *Nested* PCR aplicada as amostras de água bruta no ponto P3 Ponte Faucett- Callao, Rio Rímac, Lima, Peru (Jan/Fev de 2014), amplificação de DNA para fragmentos do gene *tpi* de *Giardia duodenalis* (Banda de interesse: 530pb). Visualização em gel de agarose 3% corado com *Safer Dye*. L: *Ladder* (marcador molecular: 100pb). 1-10: amostras estudadas, 11: controle positivo, 12: controle negativo, 13: controle negativo da 2ª reação de PCR..... 87

Figura 8: <i>Nested</i> PCR aplicada as amostras de água bruta no ponto P1 Ponte Los Angeles- Chaclacayo, Rio Rímac, Lima, Peru (Jan/Fev de 2015), amplificação de DNA para fragmentos do gene <i>bg</i> de <i>Giardia duodenalis</i> (Banda de interesse: 511pb). Visualização em gel de agarose 3% corado com <i>Safer Dye</i> , L: <i>Ladder</i> (marcador de molecular: 100pb). 1-9: Amostras estudadas; 10: controle positivo, 11: controle negativo, 12: controle negativo da 2 ^o reação	87
Figura 9: <i>Nested</i> PCR aplicada as amostras de água bruta no ponto P3 Ponte Faucett - Callao, Rio Rímac, Lima, Peru (Jan/Fev de 2015), amplificação de DNA para fragmentos do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Cryptosporidium</i> (banda de interesse: 830pb). Visualização em gel de agarose 3% corado com <i>Gel Red</i> , L: <i>Gel Pitot</i> (marcador molecular: 100 pb). 1-9: amostras estudadas; 10,11: controle positivo, 12: controle negativo, 13: controle negativo da 2 ^o reação da PCR	87
Figura 10: Cromatograma da amostra amplificada pelo gene <i>tpi</i>	88
Figura 11: Cromatograma da amostra amplificada pelo gene <i>bg</i>	88
Figura 12: Cromatograma da amostra amplificada pelo gene <i>18S rRNA</i>	88
Figura 13: P1: Rio Rímac Ponte Los Angeles - Chaclacayo, 2014	93
Figura 14: Cultivos de hortaliças nas margens do Rio Rímac - Ponte Los Angeles - Chaclacayo, 2014	93
Figura 15: Contaminação pela ação humana da água do Rio Rímac - Ponte Los Angeles - Chaclacayo, 2014	93
Figura 16: P2: Rio Rímac Ponte Balta –Cercado de Lima, 2015	95
Figura 17: Vendedores ambulantes na passarela de pedestres Rio Rímac - Ponte Balta (P2) Cercado de Lima	96
Figura 18: Congestionamento do tráfego nas margens do Rio Rímac - Ponte Balta (P2) Cercado de Lima	96
Figura 19: P3: Rio Rímac Ponte Faucett - Callao, 2015	97
Figura 20: Lixo à margem do Rio Rímac Ponte Faucett – Callao, 2015	98
Figura 21: Presença de aves nas margens do Rio Rímac Ponte Faucett - Callao, 2015	98
Figura 22: Oocistos de coccídias observados com solução saturada de sacarose em concentrados de amostras de água bruta de Rio Rímac, 2014	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies reconhecidas do gênero <i>Giardia</i> , grupos genéticos e principais hospedeiros.....	24
Tabela 2: Classificação das correlações de Pearson	62
Tabela 3: Sequências de referência de genes <i>tpi</i> e <i>bg</i> de grupos genéticos de <i>Giardia</i> obtidas do <i>Genbank</i> (NCBI) e utilizadas para o posicionamento filogenético	69
Tabela 4: Sequências de referência de genes <i>18S rRNA</i> para espécies de <i>Cryptosporidium</i> obtidas do <i>Genbank</i> (NCBI) e utilizadas para o posicionamento filogenético	69
Tabela 5: Características físicas e químicas e vazão da água bruta no Rio Rímac no ponto 1 de coleta - Chaclacayo, Lima, Peru (2014-2015)	70
Tabela 6: Características físicas e químicas e vazão da água bruta no rio Rímac no ponto 2 de coleta - Cercado de Lima, Lima, Peru (2014-2015)	71
Tabela 7: Características físicas e químicas e vazão da água bruta no rio Rímac no ponto 3 de coleta (Callao), Peru (2014-2015).....	72
Tabela 8: Ocorrência de cistos de <i>Giardia</i> spp. e de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp, em amostras de água bruta, empregada a Técnica de Filtração de Membrana e visualização por Reação de Imunofluorescência Direta em três pontos de coleta no rio Rímac, Lima, Peru (2014).....	73
Tabela 9: Ocorrência de cistos de <i>Giardia</i> spp. e de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp, em amostras de água bruta, empregada a Técnica de Filtração de Membrana e visualização por Reação de Imunofluorescência Direta em três pontos de coleta no rio Rímac, Lima, Peru (2015).....	74
Tabela 10: Estimativa do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por litro de amostra e turbidez, em três diferentes pontos de coleta da água bruta do Rio Rímac (Janeiro e Fevereiro, 2014), Lima e Callao, Peru.....	76
Tabela 11: Estimativa do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. por litro de amostra e turbidez, em três diferentes pontos de coleta, da água bruta do rio Rímac (Janeiro e Fevereiro, 2015), Lima e Callao, Peru	78
Tabela 12: Comparação múltipla de médias do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por litro de água bruta do Rio Rímac entre os diferentes pontos de coleta (P1, P2, P3) no ano de 2014	81

Tabela 13: Comparação múltipla de médias do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por litro de água bruta do Rio Rímac entre os diferentes pontos de coleta (P1, P2, P3) no ano de 2015	81
Tabela 14: Comparação múltipla de médias do número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> por litro de água bruta do Rio Rímac entre os diferentes pontos de coleta (P1, P2, P3) no ano de 2015.....	82
Tabela 15: Teste de correlação de Pearson entre o número médio de cistos de <i>Giardia</i> /L e as características físicas e químicas da água bruta do Rio Rímac, nos três pontos de coleta, Lima, Peru, 2014.....	83
Tabela 16: Teste de correlação de Pearson entre o número médio de cistos de <i>Giardia</i> /L e as características físicas e químicas da água bruta do Rio Rímac, nos três pontos de coleta, Lima, Peru, 2015.....	83
Tabela 17: Teste de correlação de Pearson entre o número médio de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> /L e as características físicas e químicas da água bruta do Rio Rímac, nos três pontos de coleta, Lima, Peru, 2015.....	84
Tabela 18: Resultado obtido pela RID e aqueles obtido pela Técnica de PCR para as amostras de água bruta do Rio Rímac Lima, Peru (2014).	85
Tabela 19: Resultado obtido pela RID e aqueles obtido pela Técnica de PCR para as amostras de água bruta do Rio Rímac Lima, Peru (2015).	85
Tabela 20: Resultados obtidos pela RID e aqueles obtido pela Técnica de PCR para as amostras de água bruta do Rio Rímac Lima, Peru (2015).	86
Tabela 21: Caracterização molecular das amostras de água do Rio Rímac, Lima, Peru (2014 e 2015) representativas dos 3 pontos de coleta, positivas para <i>Giardia duodenalis</i>	89
Tabela 22: Caracterização molecular das amostras de água do Rio Rímac, Lima, Peru (2014 e 2015) representativas dos 3 pontos de coleta, positivas para <i>Cryptosporidium</i>	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA: Autoridad Nacional del Agua del Perú

APHA: *American Public Health Association*

bg: Beta giardina

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

β -tubulin: Beta tubulina

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

COWP: *Cryptosporidium oocyst Wall protein*

DAPI: 4'6- diamidino-2-fenilindole

DESA: Departamento dos Assuntos Econômicos e Sociais

DIC: Contraste Interferencial Diferencial

DIGESA: Dirección General de Salud del Perú

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DWPL: *Drinking Water Priority List*

ECA: Estándares de Calidad Ambiental del Perú

ef1 α : Elongation fator alfa

EPA: *United States Environmental Protection Agency*

FITC: Fluorocromo itiocianato de fluoresceína

FQIQ: Facultad de Química e Ingeniería Química

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde del Perú

gdh: *Glutamato deshidrogenasa*

Gen Bank: Banco de dados de Nucleotídeos

gp60: Glicoproteína 60

HSP 70: *Heat shock protein*

ICR: Information Collection Rule

IgE: Imunoglobulina E

IL-16: Interleucina 16

IMS: Separação imunomagnética

IMTA_{vH}: Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” del Peru

INEI: Instituto Nacional de Estadística e Informática del Perú

ITS: Ribosomal internal transcribed spacer

LaCTAD: Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho

MINAM: Ministerio del Ambiente del Perú

MMWR: The Morbidity and Mortality Weekly Report

NJ: *Neighbour Joining*

OEFA: Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental del Perú

ONU: Organização das Nações Unidas

PCR: Reação em cadeia de polimerase

qPCR: Reação de amplificação em tempo real quantitativa

RID: Reação de Imunofluorescência Direta

rRNA: Ácido ribonucleico ribossomal

SEDAPAL: Servicio del Agua Potable y Alcantarrillado del Perú

SENAMHI: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrobiología del Perú

SSUrRNA: *Small subunit rRNA*

TNF: Fator de necrose tumoral

***tpi*:** Triose fosfato isomerase

TRAP: *Thrombospondin related adhesive protein*

UNEP: *United Nations Environment Programme*

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UNICEF: Fundo das Nações Unidas para a Infância

UNMSM: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

UN-WATER: *United Nations Inter-Agency Mechanism on All Freshwater*

USAQ: Unidad de Servicios de Analisis Químicos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Gênero <i>Giardia</i>	22
2.1.1 Ciclo biológico	24
2.1.2 Patogenia e manifestações clínicas	25
2.2 Gênero <i>Cryptosporidium</i>	28
2.2.1 Ciclo biológico	32
2.2.2 Patogenia e manifestações clínicas	33
2.3 Surto de veiculação hídrica de <i>Giardia</i>	36
2.4 Surto de veiculação hídrica de <i>Cryptosporidium</i>	38
2.5 Metodologia de detecção de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras ambientais	41
2.6 Técnicas de Biologia Molecular	47
2.7 <i>Cyclospora cayetanensis</i>	50
2.8 Características da região estudada	52
3. OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivo específico	53
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Área de amostragem	53
4.2 Preparo do Material de Coleta	55
4.3 Obtenção das amostras	56
4.4 Exame parasitológico das amostras de água bruta de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp.	56
4.5 Análises físicas e químicas e vazão das amostras de água bruta do rio Rímac	58
4.6 Reação de Imunofluorescência Direta (RID)	58
4.7 Estimativa do número de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos <i>Cryptosporidium</i> por litro de amostra	61

4.8 Pesquisa de oocistos de <i>Cyclospora cayetanensis</i> nas diversas amostras de água	61
4.9 Análise Estatística	61
5.1 Caracterização molecular de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp.	62
5.1.1 Amplificação do gene <i>tpi</i>	63
5.1.2 Amplificação do gene <i>bg</i>	64
5.1.3 Amplificação do gene <i>18S rRNA</i>	65
5.1.4 Eletroforeses em gel de agarose	66
5.1.5 Purificação dos produtos amplificados	66
5.1.6 Sequenciamento do DNA	66
5.1.7 Alinhamento de DNA	67
5.1.8 Posicionamento filogenético	67
6. RESULTADOS	70
6.1 Características físicas - químicas e vazão das águas brutas do rio Rímac	70
6.1.1 Ponto P1: Distrito de Chaclacayo - Ponte “Los Angeles”	70
6.1.2 Ponto P2: Distrito de Cercado de Lima - Ponte “Balta”	71
6.1.3 Ponto P3: Distrito de Callao - Ponte “Faucett”	71
6.2 Ocorrência de protozoários patogênicos	72
6.2.1 Ocorrência de <i>Giardia</i> spp. e de <i>Cryptosporidium</i> spp. na água bruta no rio Rímac no ano de 2014	72
6.2.2 Ocorrência de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. na água bruta no rio Rímac no ano de 2015	73
6.3 Estimativa do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. e de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. por litro de amostra e ponto de coleta	74
6.4 Visualização dos cistos e oocistos nas diversas amostras de água bruta do Rio Rímac	79
6.5 Pesquisa dos oocistos de <i>Cyclospora cayetanensis</i> nas diversas amostras de água bruta do Rio Rímac	80
6.6 Análises Estatísticas	81

	6.7 Caracterização molecular	85
	6.7.1 Comparação dos resultados pela RID e <i>Nested</i> PCR	85
	6.7.2 Eletroforese em gel de agarose	86
	6.7.3 Sequenciamento para os <i>genes tpi, bg</i> de <i>Giardia</i> e <i>18S rRNA</i> de <i>Cryptosporidium</i>	88
	6.7.4 Alinhamento dos gene <i>tpi, bg</i> de <i>Giardia</i> e <i>18S rRNA</i> de <i>Cryptosporidium</i>	89
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÕES	106
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
	ANEXO	127

1) INTRODUÇÃO

A água é uma das fontes básicas da vida, sendo que sua qualidade reflete diretamente a qualidade do ambiente. Sem água, as atividades econômicas não podem ser mantidas de forma sustentável, representando um obstáculo ao desenvolvimento de um país e à qualidade de vida dos indivíduos (DE OLIVEIRA, et al., 2011).

O último relatório “Perspectivas da População Mundial: Revisão de 2015”, produzida pela Organização das Nações Unidas do Departamento dos Assuntos Econômicos e Sociais (DESA), concluiu que a população mundial chegou a mais de 7,3 bilhões de pessoas, prevendo 9,7 bilhões de pessoas em 2050 e 11,2 bilhões em 2100 (OMS, 2015). De acordo com a teoria proposta por Thomas Robert Malthus, no final do século XVIII, o crescimento populacional mundial cresce em progressão geométrica enquanto a produção de recursos em progressão aritmética, estando sobre os limites da natureza para atender as demandas de uma população em crescimento a qual leva ao esgotamento dos recursos naturais

Assim, entre os desafios a serem enfrentados pelas próximas gerações e que ameaçam o futuro da humanidade, estão a disponibilidade da água para consumo humano e para a produção de alimentos (FRANCO, 2007).

De acordo com estimativas do Instituto Nacional de Estatística e Informática, até 30 de junho do 2014 a população do Peru foi estimada em 30.814.175 pessoas, sendo que 52,6% da população peruana vive na região costeira, 38,0% na região da serra andina e 9,4% na região da selva da Amazônia peruana. Com uma superfície territorial de 1.285.216 km², o Peru é um dos 19 países mais extensos do mundo (INEI/Peru, 2013).

Segundo o relatório de atualização da Agência das Nações Unidas sobre água doce e Saneamento, cerca de 800 milhões de pessoas ainda não têm acesso às fontes de água potável e aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas não utilizam serviços de saneamento e destas, 1,1 bilhões de pessoas ainda praticam a defecação ao ar livre (UN-WATER, 2015).

Conforme os dados da OMS/UNICEF (2014), de 1990 até 2012, países como Vietnã, Bangladesh e Peru reduziram a prevalência da defecação a céu aberto, com políticas públicas. Estima-se que entre 50,0% a 75,0% dos peruanos tenham acesso aos serviços de saneamento e água potável; entretanto, ainda há muito a ser feito considerando-se que o Peru é um país que está no caminho correto para cumprir as metas globais de atendimento ao saneamento, objetivo de desenvolvimento do milênio.

As relações entre a pobreza nos países em desenvolvimento, as dificuldades no fornecimento de água limpa, o crescimento populacional em todo o mundo e a necessidade de quantidades cada vez maiores de água, tanto pela indústria como para irrigação agrícola, exigem novas demandas de reservas de água.

A disponibilidade hídrica do Peru provém da bacia hidrográfica do Atlântico (97,7%), da bacia do Pacífico (1,8% dos recursos hídricos) e da bacia do Titicaca (0,5% restante). Em contraste a esse cenário, a maior parte da população localiza-se principalmente na costa do Pacífico, criando um problema de estresse hídrico, pois há uma maior demanda de água do que quantidades disponíveis (MINAM/Peru, 2010).

As mudanças no clima, o crescimento populacional e as poucas fontes de água doce na Terra, reduzem a disponibilidade da água para consumo humano, o Peru é o terceiro país entre os mais vulneráveis do mundo às mudanças climáticas, após Bangladesh e Honduras segundo o Instituto Tyndall - Centro de Mudanças Climáticas da Universidade de Manchester do Reino Unido, 2004. Estima-se que ao longo dos próximos 40 anos o Peru possuirá apenas 60,0% da água potável agora disponível, o que provocará grave escassez desse elemento líquido (MINAM/Peru, 2013).

Nos anos 1997 e 1998, o aquecimento global intensificou os efeitos do fenômeno *El Niño* nas cidades ao longo da costa peruana onde houve aquecimentos anormais das águas do Oceano Pacífico e aumentos da temperatura de 2C⁰ a 5C⁰ em apenas alguns meses, sendo que tais alterações modificaram o sistema climático da distribuição das chuvas e calor, aumentando a ocorrência de determinadas doenças como cólera, dengue, infecções estomacais, malária, conjuntivite na população e causando grandes perdas econômicas no país (SENAMHI e MINAM/Peru, 2014).

Ao redor do mundo, outro fator que agrava a crise é a poluição dos corpos de águas doces utilizadas pela população como poços, rios, riachos e lagos que sofrem um contínuo e crescente processo de degradação em função do despejo de esgoto doméstico *in natura*, de efluentes agrícolas, industriais e provenientes da extração de minérios (DOWBOR e TAGNIN, 2005). Uma vez contaminados, os corpos de água atuam como um eficiente veiculador de patógenos em razão de sua grande capacidade de dispersão. Os países no mundo despejam 80,0% do esgoto sem tratamento diretamente nos corpos de água (UN-WATER, 2015a).

De acordo com o comunicado da Autoridad Nacional del Agua (ANA/Peru, 2014), 964 fontes contaminates despejam ao rio Rímac no Peru efluentes domésticos, de indústrias e provenientes de minas ilegais. O 53% representam descargas de efluentes domésticos sem tratamento.

Em 2007, apenas 29,1% do esgoto doméstico urbano era tratado em 143 estações de tratamento sendo todo o restante do esgoto produzido despejado diretamente nos rios, lagos e no mar peruano (MINAM/Peru, 2011).

Em virtude disto, a diarreia é o principal sintoma gastrointestinal decorrente da ingestão de água e alimentos contaminados; essa enfermidade matou cerca de 1,5 milhão de pessoas em 2012, sendo a quarta principal causa de mortalidade em todo o mundo, dentre outras doenças como as isquêmicas do coração e as infecções do HIV/Aids (OMS, 2014).

Pneumonia, diarreia e malária continuam sendo as principais causas de morte na infância em nível global. Segundo a OMS (2015), a diarreia é a quarta maior causa de mortes entre crianças com menos de 5 anos, justamente a faixa etária mais fragilizada pela falta de saneamento básico.

Pesquisas feitas com crianças peruanas com até 35 meses de idade evidenciaram que a diarreia infantil, durante os primeiros 6 meses de vida, foi associada a menor estatura, apresentando maiores consequências nas populações subnutridas, sendo negativas a longo prazo e gerando déficit de desenvolvimento físico e cognitivo (CHECKLEY et al., 2003).

Incluídos na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde por comporem um grupo de agentes causais de doenças diarreicas, os protozoários parasitas *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. estão intimamente relacionados a populações de baixo poder aquisitivo, condições de saneamento básico precárias e consumo de água sem tratamento adequado (SAVIOLI, SMITH e THOMPSON et al., 2006; ASSIS et al., 2013).

Giardia spp. e *Cryptosporidium* spp. estão associados a doenças gastrointestinais, possuem rota de transmissão fecal – oral usualmente pela ingestão de água e alimentos contaminados com as formas infectantes, cistos e oocistos (SATO et al., 2013). Tais organismos apresentam importância em saúde pública devido às múltiplas espécies e genótipos que podem infectar o homem e animais (THOMPSON et al., 2008; XIAO e FAYER, 2008).

As formas infectantes são eliminados em grande número nas fezes de humanos e animais (10^8 - 10^9 por grama de fezes), são ambientalmente robustos, o que facilita a transmissão desses parasitos por meio da água (CACCIÒ et al., 2005; BETANCOURT et al., 2014).

Os protozoários parasitas constituem uma importante causa de surtos epidêmicos de veiculação hídrica. No período compreendido entre 1984 e 2004 ocorreram 325 surtos em todo o mundo, onde foram atribuídos maiormente a *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (132; 40,6% e 165; 50,8% respectivamente) (KARANIS et al., 2007) e posteriormente, de 2004 a 2010 ocorreram mais 199 surtos epidêmicos que foram atribuídos a *Giardia* spp. 120 (60,3%) e *Cryptosporidium* spp. 70 (35,2%), foram os principais protozoários incriminados como agentes etiológicos identificados nestes surtos (BALDURSSON e KARANIS, 2011).

Uma das principais características biológicas de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. é a acentuada resistência dos cistos e oocistos à desinfecção por cloro, cloramina e outros desinfetantes químicos empregados nos processos de tratamento das águas (BETANCOURT et al., 2004).

A legislação peruana, como a maioria das legislações sul-americanas, não exige o monitoramento de parâmetros microbiológicos, físicos e químicos de mananciais utilizados para o abastecimento humano, esta deficiência parece se repetir na última legislação peruana (DS N° 031-2010-AS). Até o 2006 as legislações de Brasil, Paraguai e da província de Santa Fé (Argentina) exigem monitoramento da qualidade da água dos mananciais superficiais para abastecimento humano. O monitoramento da qualidade da água na saída do tratamento de água é melhor contemplado nas legislações dos países sul-americanos que o monitoramento do manancial. Os principais indicadores de contaminação considerados pelas legislações sul-americanas são os coliformes totais e termotolerantes (GEMILIANO, 2006).

Considerando que *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. são patógenos endêmicos no Peru, dados relacionados à transmissão hídrica dessas parasitoses são inexistentes, ocultas entre as múltiplas doenças humanas de veiculação hídrica, podendo ser uma ameaça significativa para a saúde e seu controle é um verdadeiro desafio para as autoridades da saúde pública peruana.

Diante desse cenário, esse trabalho teve como objetivo realizar a primeira investigação de prevalência e caracterização molecular dos protozoários de veiculação hídrica *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais do Rio Rímac do Estado de Lima - Peru, fornecendo informações importantes sobre a qualidade desses corpos de água destinados para o abastecimento da população da capital do Peru, além de contribuir para elucidar os padrões epidemiológicos destes parasitos.

2) REVISÃO DA LITERATURA

2.1) Gênero *Giardia*

Giardia duodenalis (sin. *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*) é um parasito eucarioto unicelular flagelado. A primeira descrição foi atribuída a Anton van Leeuwenhoek em 1681 através de exame de suas próprias fezes diarreicas sob o microscópio, sendo descrito mais detalhadamente por Vilém Dušan Lambl, em 1859, denominando-o *Cercomonas intestinalis*. Kunstler, em 1882, foi o primeiro a nomear o organismo de *Giardia*, nesta época era utilizado somente o nome do gênero. Em 1875, Davaine sugeriu o nome *Hexamitus duodenalis*, o qual Blanchard, em 1888, renomeou para *Lamblia intestinalis*. Em 1902 foi sugerido o nome de *Giardia duodenalis* por Stiles, e *Giardia lamblia* por Kofoed e Christiansen em 1915 (THOMPSON, 2000; ADAM, 2001; TORTORA et al., 2007).

Por um longo período, a ordem taxonômica respeitou a classificação de Honigberg et al. (1964); posteriormente, com o advento da microscopia eletrônica, Levine et al. (1980) propuseram um novo esquema de classificação a qual foi adotada como oficial que seria a seguinte:

Reino Protista

Sub-reino Protozoa

Filo Sarcomastigophora Honigberg & Balamuth, 1963

Subfilo Mastigophora Diesing, 1866

Classe Zoomastigophorea Calkins, 1909

Ordem Diplomonadida Wenyon, 1926 emend. Brugerolle, 1975

Subordem Diplomonadina Wenyon, 1926 emend. Brugerolle, 1975

Gênero *Giardia*

ADL et al. (2005) considerando as informações obtidas desde 1980, por meio da microscopia eletrônica, e acrescentando estudos filogenéticos moleculares, apresentaram uma nova proposta de classificação dos eucariontes, particularmente dos protistas, grupo que inclui os protozoários. Recentemente ADL et al. (2012) atualizaram a classificação para linhagens, empregaram um sistema hierárquico, mas

não usaram as denominações formais das grandes categorias taxonômicas tais como classe, subclasse, superordem ou ordem.

Assim, segundo esta nova proposta, os protozoários flagelados do gênero *Giardia* spp. estariam classificados como:

Excavata Cavalier-Smith, 2002, emend. Simpson, 2000

- Metamonada Cavalier-Smith, 1987
- Fornicata Simpson, 2003
- Diplomonadida Wenyon, 1926, emend. Brugerolle et al., 1975
- Hexamitinae Kent 1880, emend. Brugerolle et al., 1975
- Giardiinae Kulda & Nohynkova, 1978

De acordo com vários autores (THOMPSON et al., 2004; CACCIÒ et al., 2008; FENG e XIAO, 2011; SIMONE, CACCIÒ e LALLE, 2015) são reconhecidas seis espécies para o gênero *Giardia* sendo que a espécie *G. duodenalis* possui grupos geneticamente distintos (A, B, C, D, E, F, G, H), também denominados de grupos genéticos (Tabela 1).

Tabela 1- Espécies reconhecidas do gênero *Giardia*, grupo genético e principais hospedeiros.

<u>Espécies</u>	<u>Principais hospedeiros</u>
<i>G. agilis</i>	Kunstler, 1882..... Anfíbios
<i>G. ardeae</i>	Noller, 1920 Aves
<i>G. microti</i>	Benson, 1980..... Roedores
<i>G. muris</i>	Benson, 1980..... Roedores
<i>G. psittaci</i>	Erlandsen e Bemrick, 1987..... Aves
<i>G. duodenalis</i>	Davaine, 1875..... Mamíferos
Grupo genético A..... Humanos, primatas, ruminantes domésticos e selvagens, alpacas, porcos, cavalos, cães, gatos, roedores, outros mamíferos.	
Grupo genético B..... Humanos, primatas, cães, cavalo, ruminantes domésticos, coelhos, castores, ratos.	
Grupo genético C..... Cães domésticos e selvagens.	
Grupo genético D..... Cães domésticos e selvagens.	
Grupo genético E..... Ruminantes domésticos, suínos, ungulados.	
Grupo genético F..... Gatos.	
Grupo genético G..... Roedores.	
Grupo genético H..... Mamíferos marinhos.	

FONTE: Adaptado de Thomson et al., 2004; Feng e Xiao, 2011; Simone et al., 2015.

2.1.1) Ciclo biológico

A infecção por *Giardia* spp. inicia-se com a ingestão dos cistos maduros presentes em água ou alimentos contaminados, ou por contato interpessoal. Os cistos passam pelo ambiente ácido do estômago e desencistam na porção inicial do intestino delgado onde o pH é ligeiramente alcalino; de cada cisto, saem dois trofozoítos que aderem à parede do intestino por meio do disco adesivo e passam a se alimentar por pinocitose reproduzindo-se por divisão binária longitudinal (assexuada). Alguns destes trofozoítos desprendem-se da mucosa e iniciam o processo de encistamento na porção final do intestino delgado, sob ação da influência do pH intestinal, e concentração de sais biliares. Durante o encistamento, os flagelos encurtam-se, o

citoplasma condensa-se e há produção de uma parede cística. Cistos recém formados apresentam dois núcleos, mas depois ocorre divisão nuclear (nucleotomia), sendo formados quatro núcleos. Os cistos são eliminados de maneira intermitente juntamente com as fezes permanecendo no ambiente e ao infectar novos hospedeiros, reinicia-se o ciclo (ADAM, 2001; THOMPSON, 2004).

Atualmente há algumas evidências de reprodução sexuada em *Giardia* spp.. Pesquisas de genética populacional detectaram evidências de troca de material nesse protozoário (MELONI et al., 1995). A existência de recombinação sexual foi evidenciada com espécimes isolados de fezes de humanos no Peru, ou seja, realizados em locais endêmicos onde a frequência de transmissão é alta (COOPER et al., 2007; POXLEITNER et al., 2008; MONIS et al., 2009).

Segundo Cooper et al. (2010) e Ryan et al. (2013) ao serem avaliadas infecções zoonóticas torna-se necessária a caracterização molecular pela considerável variação genética intraespecífica em *Giardia duodenalis*; além disso, a presença de múltiplos alelos adiciona complexidade aos estudos que evidenciaram a ocorrência de recombinação de material genético entre diferentes isolados a qual ocasiona não concordância na atribuição de isolados pelos grupos genéticos específicos.

2.1.2) Patogenia e manifestações clínicas

A ingestão de apenas 10 a 100 cistos é suficiente para produzir infecção (RENDTORFF, 1954 e RYAN et al., 2013). O amplo espectro clínico inclui desde a ausência de sintomas evidentes (giardiose assintomática) até quadros de infecção aguda ou crônica.

Os sintomas e sinais clínicos, quando presentes, aparecem uma ou duas semanas após a ingestão de cistos; foram observados sintomas graves em bebês e crianças, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a giardiose tem sido associada ao retardo do crescimento e deficiências do desenvolvimento cognitivo (SIMONE, CACCIÒ e LALLE, 2015).

Em pesquisas feitas com 845 crianças peruanas de três distritos urbanos marginalizados em Lima, registrou-se prevalência de 66,3% para enteroparasitoses, sendo destacado o protozoário *Giardia* como o mais frequente em crianças com diarreia; a caracterização molecular mediante análise da sequência do gene *gdh* revelou a ocorrência dos grupos genéticos A (AI e AII) e B (BIV), com predominância do grupo genético (AI) em todas as amostras diarreicas. Ressalte-se *que* as crianças com giardiose, nesta pesquisa, apresentaram deficiências no desenvolvimento físico e cognitivo e confirmou-se a importância de pacientes assintomáticos na transmissão do protozoário, especialmente em locais com falta de higiene e saneamento básico (CORDÓN et al., 2008).

O principal sintoma da infecção por *Giardia* é a diarreia, sendo também observados flatulência, cólicas epigástricas, náuseas, vômitos, desidratação, perda de peso, mal-estar, fraqueza (CDC, 2015).

Esses sintomas foram correlacionados às disfunções do intestino delgado, incluindo uma diminuição da área de absorção da bordadura em escova e atrofia das vilosidades, deficiência na atividade das enzimas luminiais, como as dissacaridases, lipases, amilases e proteases (GEURDEN et al., 2010); as alterações verificadas em relação às vilosidades e criptas intestinais têm como consequência a redução da área de absorção de água, eletrólitos, D-xilose, lactose, vitamina A, vitamina B, ferro, gorduras e folatos (SAMUEL et al., 2001, THOMPSON, 2004; CACCIÒ e RYAN, 2008).

A alteração da permeabilidade da membrana epitelial intestinal é, de fato, uma das alterações mais importantes da infecção por *Giardia*, parecendo resultar em efeitos citopáticos diretos induzidos por substâncias produzidas pelo parasito como as glicoproteínas, proteinases e lectinas, que parecem causar danos diretos à mucosa intestinal (BURET et al., 2002, GARDNER e HILL, 2001).

Considerando que a relação parasito – hospedeiro é dinâmica (LENZI et al., 2005), a gravidade da doença é determinada pela interação entre a virulência do parasito e fatores relacionados ao hospedeiro como estado nutricional e imunológico, idade e ocorrência de infecções concomitantes (CACCIÒ e RYAN, 2008).

Pesquisas tem relatado a ocorrência de infecções extra-intestinais por giardiose, no entanto um estudo recente estima que 1/3 dos pacientes infectados com o parasito, poderá expressar sintomas extra-intestinais de longo prazo; esse fenômeno não é tão incomum como com se pensava anteriormente (HALLIEZ e BURET, 2013).

A primeira descrição de infecções oculares em pacientes com giardiose foi feita por Barraquer, 1938 (*Apud*: Halliz e Bured, 2013) que relatou casos de despigmentação aguda bilateral da íris, inflamação da coróide (coriorretinite) e hemorragias retinianas em pacientes que apresentaram diarreia associada à presença de *Giardia*.

Crianças pequenas parecem ser mais suscetíveis às lesões oculares. Durante infecções com *Giardia*, as lesões causam danos às células da retina, sendo acompanhadas pela liberação de grânulos de pigmentos da retina, onde podem ser vistos como pontos enegrecidos (CORSI et al., 1998).

Os mecanismos que ligam lesões oculares com giardiose podem resultar de metabólitos tóxicos produzidos pelos parasitos, que ainda precisam ser elucidados (PETTOELLO et al., 1990; HALLIEZ e BURET, 2013).

Indivíduos com giardiose podem apresentar sintomas similares aos da artrite inflamatória. Embora as infecções por *Giardia duodenalis* sejam responsáveis por uma proporção significativa de infecções entéricas em todo o mundo, relatos de associação da doença com artrite são pouco frequentes (CARLSON et al., 2004; HALLIEZ e BURET, 2013).

A presença concomitante de infecção por giardiose manifestações alérgicas cutâneas tem sido descrita e pode-se explicar que tais sintomas estejam relacionadas à ingestão de metronidazol e corticosteróides. Evidencias sugerem uma ligação causal entre a giardiose e desenvolvimento de urticárias (GIACOMETTI et al., 2003).

Em um estudo em crianças, giardiose foi associada a um aumento nos níveis de imunoglobulina E (IgE) no soro e uma melhora na resposta de anticorpos IgE que reforça a resposta aos alérgenos comuns (DI PRISCO et al., 1998).

A disfunção da barreira epitelial intestinal ocasionada por *Giardia* pode facilitar a translocação de macromoléculas e alimentos, provocando a sensibilização do hospedeiro (DI PRISCO et al., 1998).

Foram relatados vários casos de miopatia induzida por hipocalcemia (concentrações baixas de potássio no sangue) em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos que apresentaram giardiose. A perda de potássio está intimamente relacionada com o número de episódios de diarreia por dia, resultando em hipocalcemia que desencadeia uma miopatia grave (CERVELLO et al., 1993; GENOVESSE et al., 1996; HALLIEZ e BURET, 2013). Ocorre com frequência em pessoas idosas, particularmente nas mulheres que são hospitalizadas por giardiose, os sintomas musculares podem melhorar com o aumento dos níveis de potássio e recuperação da diarreia (ADDISS et al., 1994; HALLIEZ e BURET, 2013).

2.2) Gênero *Cryptosporidium*

Cryptosporidium foi descrito em 1907 por Ernest Edward Tyzzer, para designar um protozoário parasita intracelular, que havia sido isolado da glândula gástrica dos camundongos (*Mus musculus*) de laboratório tendo sido denominado *Cryptosporidium muris*. Em 1910, Tyzzer propôs um novo gênero (*Cryptosporidium*) e uma nova espécie *C. muris*. Dois anos depois, Tyzzer identificou outra espécie, no intestino de camundongos designando-a como *Cryptosporidium parvum*, cujos oocistos eram menores que os de *C. muris* (FAYER, 1997).

Cryptosporidium foi reconhecido como um patógeno animal em 1955, quando Slavin associou a presença do protozoário com um quadro de diarreia e mortalidade de perus, descrevendo uma nova espécie - *C. meleagridis*. Panciera et al. (1971) encontraram achados semelhantes associado a quadros de diarreia bovina (ROSE,

1990; ANDRADE NETO e ASSEF, 1996), despertando o interesse veterinário no estudo deste protozoário patogênico.

Em 1976 foram relatados os primeiros casos de criptosporidiose humana; o primeiro deles foi observado em um paciente imunocomprometido e o segundo, em uma criança de 3 anos de idade residente da zona rural. A partir de 1980, aumentaram significativamente os relatos de criptosporidiose humana em decorrência da AIDS. Inicialmente, o aumento da incidência foi limitado a indivíduos imunocomprometidos, entretanto, inúmeros surtos e infecções esporádicas em indivíduos imunocompetentes foram notificados com o desenvolvimento de recentes tecnologias laboratoriais para o diagnóstico (ROSE, 1990).

Em 1985, começaram os estudos sobre a ocorrência ambiental de *Cryptosporidium*, e em 1988, a agência norte americana de proteção ambiental, USEPA (United States Environmental Protection Agency) incluiu *Cryptosporidium* na DWPL (Drinking Water Priority List), após os surtos ocorridos no Texas (1985) e Georgia (1987) (BUTLER E MAYFIELD, 1996). O surto de criptosporidiose ocorrido em Milwaukee nos EUA, em 1993 obteve repercussão mundial, aumentando significativamente o interesse nas pesquisas relacionadas ao *Cryptosporidium* (CORSO et al.,2003).

Taxonomia

Segundo Levine et al.(1985), o protozoário *Cryptosporidium* é classificado como:

Sub-reino Protozoa	Goldfuss, 1818, emend. von Siebold, 1845
Filo Apicomplexa	Levine, 1970
Classe Sporozoea	Leuckart, 1879
Subclasse Coccidia	Leuckart, 1879
Ordem Eucoccidiorida	Léger e Duboscq, 1910
Sub-ordem Eimeriorina	Léger, 1911
Família Cryptosporiidae	Léger, 1911
Gênero <i>Cryptosporidium</i>	

Existem outras proposições taxonômicas descritas para *Cryptosporidium*, sendo que suas diferenças ocorrem dependendo da sistemática a ser analisada.

Adl et al. (2005) utilizam uma nova proposta taxonômica com base em estudos de filogenia molecular utilizando um sistema hierárquico sem a designação formal de classe, subclasse, subordem e ordem a qual difere da sistemática de Levine et al. (1985). Uma revisão atualizada da classificação dos eucariontes que mantém ênfase nos protistas e incorpora algumas mudanças desde 2005, foi proposta com o propósito de resolver as questões de nós e ramos das árvores filogenéticas e incorpora avanços recentes de filogenômica pelo aumento de amostragem de táxons em filogenias baseadas em rRNA (ADL et al., 2012).

Assim, conforme Adl et al. (2012), *Cryptosporidium* spp. é classificado como:

- Alveolata Cavalier-Smith, 1991
 - Apicomplexa Levine, 1980, emend. Adl et al., 2005
 - Conoidasida Levine, 1988
 - Coccidia Leuckart, 1879
- Cryptosporidium*

Entretanto, achados recentes evidenciaram que os protozoários do gênero *Cryptosporidium* diferem dos coccídias por apresentarem uma localização epicelular, oocistos autoinfecciosos, presença de organela alimentar e capacidade de multiplicação em meio acelular, além de acentuada afinidade filogenética com as gregarinas (ALDEYARBI e KARANIS, 2015). Assim Cavalier-Smith (2014) propôs a transferência de *Cryptosporidium*, dos coccídias, para a classe Gregarinomorpha, e uma nova subclasse Cryptogregarina.

O número espécies dentro do gênero *Cryptosporidium* foi objeto de controvérsia, entretanto nos dias de hoje, são aceitas como válidas 28 espécies (RYAN e XIAO, 2014; RYAN et al., 2014; RYAN e HIJJAWI, 2015; LI et al., 2015).

Destas espécies, três apresentam como hospedeiros aves: *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* e *Cryptosporidium galli*; 20 são espécies de

hospedeiros mamíferos: *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium wrairi*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium fayeri*, *Cryptosporidium macropodum*, *Cryptosporidium ryanae*, *Cryptosporidium xiaoi*, *Cryptosporidium ubiquitum*, *Cryptosporidium cuniculus*, *Cryptosporidium tyzzeri*, *Cryptosporidium viatorum*, *Cryptosporidium scrofarum*, *Cryptosporidium erinacei* e *Cryptosporidium rubeyi*; uma espécie foi descrita em anfíbios: *Cryptosporidium fragile*; duas espécies em répteis: *Cryptosporidium varanii*, *Cryptosporidium serpentis*; e finalmente duas espécies tendo como hospedeiros peixes: *Cryptosporidium molnari*, *Cryptosporidium huwi* (RYAN e XIAO, 2014; RYAN et al, 2014, 2015; LI et al, 2015).

Existem mais de 40 genótipos, com uma alta probabilidade de que a muitos desses, finalmente seja dado *status* de espécie após a caracterização biológica, morfológica e molecular. Há 16 espécies de *Cryptosporidium* infecciosas para o ser humano incluindo *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei*. Também são infectantes para o ser humano os genótipos de *Cryptosporidium* de cavalo, gambá e genótipo I de esquilo (RYAN e HIJJAWI, 2015).

Cryptosporidium hominis e *Cryptosporidium parvum* são as mais comumente relatadas e responsáveis pela maioria das infecções nos seres humanos (XIAO, 2010; LI et al., 2014).

Estudos de análise molecular utilizando *loci* altamente variados como a glicoproteína 60 kDa (*gp60*), revelaram que *C. hominis* parece ser uma espécie especificamente humana; enquanto alguns subtipos de *C. parvum*, como o subtipo IIc, são transmitidos antroponoticamente e outros subtipos de *C. parvum* são transmitidos zoonoticamente (XIAO, 2010; RYAN et al, 2014).

2.2.1) Ciclo biológico

Cryptosporidium é um parasito monoxeno, infecta as microvilosidades das células epiteliais do trato gastrointestinal de uma grande variedade de hospedeiros, podendo infectar sítios extraintestinais como epitélio respiratório, conjuntiva do olho, vesícula biliar, ductos pancreáticos e, ocasionalmente, epitélio renal (FAYER,1997; XIAO e RYAN, 2015).

A resistência e a flexibilidade das paredes de oocistos parecem depender da camada interior de glicoproteína, a permeabilidade podem ser associados com hidrocarbonetos cerosos na camada translúcida, a camada superficial exterior proporciona possibilidades de imunogenicidade. A composição da espessura da parede do oocisto confere permeabilidade e resistência a pressões ambientais terrestres e aquáticos (JENKINS et al., 2010).

Os oocistos propiciam a transmissão de um hospedeiro infectado a outro susceptível; após a ingestão ocorre a excitação, os quatro esporozoítos móveis são liberados através de uma sutura que se abre ao longo da parede do oocisto, invadindo as microvilosidades das células epiteliais do intestino delgado, formando um vacúolo parasitóforo, envolvido por membranas das células hospedeiras e do próprio parasito. Esporozoítos e todos os estádios subsequentes endógenos, assexual e sexual, ocorrem no vacúolo parasitóforo o qual é intracelular mas extracitoplasmático (SMITH e ROSE, 1998). Atualmente, sabe-se que *Cryptosporidium* apresenta uma localização epicelular (MELICHEROVÁ et al., 2014; RYAN et al., 2015).

Os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos esféricos e, em seguida, ocorre a multiplicação assexuada chamada merogonia; são formados dois tipos de merontes, os do tipo I contêm seis a oito merozoítos, capazes de infectar uma nova célula hospedeira e desenvolver em um novo meronte do tipo I ou em um meronte tipo II que contêm quatro novos merozoítos. Somente os merozoítos do tipo II originam gametócitos, iniciando a reprodução sexuada diferenciando-se em estádios sexuais masculinos (microgametócito) e estádios sexuais femininos (macrogametócitos). Após da fertilização, o macrogameta fertilizado ou zigoto se desenvolve em um oocisto

sofrendo meiose e originando 4 esporozoítos (esporogonia), que são haploides; os oocistos são liberados no lúmen do intestino e eliminados nas fezes, podendo infectar outro hospedeiro susceptível, reiniciando o ciclo.

Existem dois tipos de oocistos, um com parede espessa liberado ao meio ambiente e outro, constituído de parede fina, que se rompe no intestino causando auto-infecção; por meio destes oocistos torna-se a parasitose especialmente persistente entre os hospedeiros imunocomprometidos. Aproximadamente 20% dos oocistos rompem-se no interior do intestino determinando autoinfecção e 80% são eliminados ao exterior (CAREY et al., 2004; MONIS e THOMPSON, 2003; HINRICHSEN, 2005).

2.2.2) Patogenia e manifestações clínicas

A patogenicidade depende de vários fatores, incluindo a dose infectiva, a virulência das diferentes espécies e cepas do parasito, a suscetibilidade do hospedeiro que varia consideravelmente de indivíduo para indivíduo, do estado nutricional e exposição prévia (SMITH e ROSE, 1998; TZIPORI e WARD, 2002).

O local principal de colonização é o intestino delgado, embora o parasito possa atingir todo o trato gastrointestinal e sítios extra-intestinais. A invasão de células do hospedeiro é restrita a borda luminal dos enterócitos e leva a transtornos na região das microvilosidades, causando mudanças na arquitetura com atrofia e perda de epitélio de superfície, destruição e hiperplasia das células da cripta, e infiltração de célula inflamatórias na lâmina própria (CHALMERS e DAVIES, 2010).

A alteração na arquitetura epitelial deve-se à hiperplasia das células das criptas intestinais e apoptose celular, há secreção de um neuropeptídeo chamando substância P e de citocinas inflamatórias (TNF; IL-16) que são responsáveis pelas anormalidades morfológicas, bioquímicas e funcionais; há alteração da permeabilidade do epitélio intestinal; em consequência, ocorre má absorção dos íons sódio e secreção aumentada dos eletrólitos que resultam na diarreia (LAURENT et al., 1999).

A criptosporidiose é uma gastroenterite autolimitada em indivíduos imunocompetentes, os sintomas surgem em média, 7 dias após a ingestão dos oocistos (variação de 1 a 15 dias) (SHIKANI e WEISS, 2015).

Os sintomas frequentemente tem início súbito com diarreia aquosa e volumosa a qual pode conter muco, mas sangue ou leucócitos não são normalmente presentes. Outros sintomas agudos são dor abdominal, distensão abdominal, gases, náuseas ou vômitos, febre baixa, anorexia, mal-estar, fadiga, fraqueza, dor de cabeça, mialgia (CURRENT e GARCIA, 1991; BOUZID et al., 2013; RYAN e HIJJAWI, 2015).

A diarreia desaparece espontaneamente em pessoas com sistemas imunitários saudáveis, embora existam casos descritos de pacientes que experimentam diarreias crônicas que se estendem por 1 mês ou 2 meses excepcionalmente (CHALMERS e DAVIES, 2010; CDC, 2015; SHIKANI e WEISS, 2015).

Em crianças imunocompetentes, especialmente aquelas menores de 5 anos de idade, *Cryptosporidium* foi identificado como agente patogênico significativo que afeta com frequência e severidade indivíduos nos países em desenvolvimento, sendo associado à mortalidade e morbidade infantil (KOTLOFF et al. 2013).

Em uma comunidade carente no Peru, a infecção por criptosporidiose em lactentes foi relacionada a deficiências de crescimento (CHECKLEY et al., 1998). Em outro estudo, crianças peruanas que apresentavam sintomas de diarreia, náuseas, vômitos e mal-estar geral albergavam *Cryptosporidium hominis*; em contraste, crianças infectadas com *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. canis* e *C. felis* apresentaram apenas diarreia (CAMA et al., 2008).

Os indivíduos imunocomprometidos, como os portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), pacientes transplantados ou sob o tratamento para certos tipos de câncer, crianças desnutridas, entre outros, são mais susceptíveis à infecção, cujas manifestações clínicas variam de acordo com o grau de comprometimento imunológico (O'CONNOR et al., 2011).

Quando a contagem de células CD4 situa-se acima de 180-200 células/mm³ o quadro clínico que se apresenta é uma diarreia transitória ou autolimitada; entretanto, nos indivíduos que apresentam menos de 50 células/mm³ ocorre a criptosporidiose fulminante que se caracteriza por 2 litros de fezes aquosas por dia, implicando em mortalidade (GRIFFITHS, 1998; O'CONNOR e SHAFFIE, 2011; BOUZID et al., 2013; CACCIÒ e PUTIGNANI, 2014).

Criptosporidiose em locais extra-intestinais tem sido relatada em indivíduos imunocompetentes (HAWKINS et al., 1987; NORBY et al., 1998; WESTROPE e ACHARYA, 2001) mas foi registrada principalmente em pacientes imunocomprometidos, afetando o trato gastrointestinal e locais extra-intestinais. Os pacientes com HIV em estado avançado apresentam maior risco de desenvolver infecção extra-intestinais, particularmente da árvore biliar, pâncreas e trato respiratório, pulmões (CHALMERS e DAVIES, 2010; O'CONNOR e SHAFFIE, 2011; HUNTER e NICHOLS, 2002; CACCIÒ e PUTIGNANI, 2014).

Criptosporidiose biliar e pancreática foram relatadas após a infecção intestinal, sendo que *Cryptosporidium* causa apoptose de células epiteliais biliares (CHEN et al., 1998, 1999); uma patogênese descrita relacionada a criptosporidiose biliar é a colangite esclerosante (DAVIS et al., 1987; DOWSETT et al., 1988; CELLO, 1989; CHEN e LA RUSSO, 2002; MCLAUCHLIN et al., 2003; CHALMERS e DAVIES, 2010).

Em indivíduos imunocomprometidos têm sido descritas infecção traqueo-bronquial; e sintomas como sinusite podem ser identificados nesses pacientes (CLAVEL et al., 1996; DUNAND et al., 1997; O'CONNOR et al., 2011).

Oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em material de expectoração, nos aspirados e no epitélio dos brônquicos em humanos. Destaque-se que *Cryptosporidium meleagridis* é conhecido por causar doença respiratória em aves (BLANSHARD et al., 1992; CLAVEL et al., 1996; FARTHING, 2000; CACCIO et al., 2014).

Os sintomas da infecção por criptosporidiose respiratória incluem tosse, dispnéia, febre e dor torácica e pneumonia sendo descrito como quadro clínico grave, usualmente associado a outros patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* e *Pneumocystis* sp. (FARTHING, 2000).

2.3) Surto de veiculação hídrica de *Giardia*

Segundo Thompson (2000), *Giardia* é um protozoário comumente conhecido e descoberto há mais de 300 anos, por consequência os surtos relacionados a esse parasito vêm sendo descritos há mais tempo.

Desde a década de 40, giardiose em humanos têm sido relatada, mas os registros dos primeiros surtos foram na década de 60 (ROSE, 1997; CARDOSO, 2002). Na década de 70, *Giardia duodenalis* foi o agente etiológico mais identificado em água para abastecimento nos EUA.

Nos meses de outubro de 1954 a março de 1955, ocorreu um surto de veiculação hídrica, tendo a *Giardia* como agente etiológico, que atingiu a 50.000 pessoas após o consumo de água bruta que recebia cloração como único tratamento (VEAZIE, 1969; MEYER, 1973; KARANIS et al., 2007).

O primeiro surto epidêmico documentado de giardiose comprovadamente de origem hídrica foi relatado entre os anos de 1965 a 1966, em Aspen, Colorado (EUA) onde um levantamento realizado demonstrou a contaminação da água por esgoto através das tubulações danificadas que estavam localizadas próximas aos poços onde a água era captada (BARWICK et al., 2000).

De outubro a dezembro de 2004 ocorreu em Bergen na Noruega um surto de giardiose, com 1.300 casos confirmados em laboratório, demonstrou-se que 32% (40/124) dos pacientes com sintomas persistentes apresentavam uma infecção crônica por *Giardia*, com uma média de duração da doença de 7 meses. O risco da infecção foi significativo para as pessoas que receberam água procedentes sistema de

abastecimento do que aqueles que recebem águas de outras fontes (NYGARD et al., 2006; HANEVIK et al., 2007).

De 1984 a 2004, foram relatados 325 surtos associados à veiculação hídrica em todo o mundo, onde um dos agentes etiológicos prevalentes foi *G. duodenalis*, responsável por 132 surtos (40,6%) (KARANIS et al., 2007). De 2004 a 2010, foram reportados 199 surtos em Austrália, América do Norte e Europa onde *Giardia duodenalis* foi responsável por 70 surtos (35,2%), estando associada à contaminação de sistemas de água potável (BALDURSSON e KARANIS, 2011).

Considerado o primeiro surto ocorrido na Coreia em abril de 2010, onde 7 das 8 famílias (25 pessoas) moradores da vila na província de Jeollabuk foram afetadas, apresentando sintomas como diarreias, febre, dor abdominal, cansaço. Estudos moleculares com o gene *bg* detectaram a presença de *Giardia duodenalis*, com amostras da água fornecida pelo sistema de abastecimento. Presume-se que a contaminação foi ocasionada por destruição das tubulações do sistema de abastecimento, porém as causas exatas não foram esclarecidas (CHEUN et al., 2013).

Entre 2011-2012, ocorreram surtos de transmissão hídrica causados pelo protozoário *Giardia* em 44 estados dos Estados Unidos, no Distrito de Columbia, Porto Rico e Guam, atingindo 32,091 pessoas. A incidência de giardiose foi mais elevada nos estados do Noroeste, onde os casos mais frequentemente notificados foram em crianças de 1-4 anos, seguidos por aqueles com idade entre 5-9 anos e adultos de 45-49 anos (MMWR, 2015).

Em Seul, Coreia do Sul, em maio a junho de 2012, ocorreram um surto que atingiram 124 casos de criptosporidiose em residentes de um sistema condominial antigo, não houve responsabilidade do sistema de tratamento e distribuição de água. Segundo Cho et al. (2013) a água que era distribuída aos moradores dos departamentos ficava armazenada em um tanque subterrâneo, que foi contaminada por esgoto do tanque séptico do condomínio, já que o sistema de tubulação estava seriamente corroído.

2.4) Surtos de veiculação hídrica de *Cryptosporidium*

Diversos relatos de surtos de veiculação hídrica ao redor do mundo são atribuíveis aos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*, devido ao consumo de água contaminada provenientes de água superficiais, águas subterrâneas, águas de recreação, água de sistemas de distribuição e armazenamento de água e esses protozoários patogênicos continuam sendo uma preocupação em saúde pública (CRAUN et al., 1998; FAYER et al, 2000; THOMPSON, 2000; GRACZYK et al., 2010; MASON et al., 2010; YODER e BEACH, 2010; BADURSSON e KARANIS, 2011; KITAJIMA et al, 2014; PULESTON et al, 2014;. WIDERSTRÖM et al, 2014).

Relatos de *Cryptosporidium* como causador de doenças gastrointestinais por via hídrica foram documentados a partir de 1984. Apesar de nos dias atuais, as tecnologias de tratamento de água estarem difundidas em quase todos os países, surtos de veiculação hídrica continuam acontecendo (CARDOSO et al., 2002).

Houve um surto de criptosporidiose na primavera de 1983, na cidade de Cobham, Reino Unido, com 16 casos de infecção, estimados por contaminação das águas superficiais utilizadas para o abastecimento da população, sendo que o tipo de tratamento da água incluía filtração e cloração (GALBRAITH et al., 1987 e KARANIS et al., 2007).

Considerado como o primeiro surto devidamente documentado de criptosporidiose, o episódio que ocorreu em San Antonio, no Texas (EUA) em 1984, atingiu, segundo estimativas, 2.006 pessoas que desenvolveram gastroenterite após o consumo de água de poço artesiano tratada por cloração a qual fora influenciada por contaminação com esgoto da comunidade. Exames de fezes e provas sorológicas identificaram *Cryptosporidium* como agente etiológico (D'ANTONIO et al., 1985; SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996; KARANIS et al., 2007).

O segundo maior surto ocorreu em Carrolton, Geórgia, em 1987, onde aproximadamente 13.000 pessoas foram afetadas; neste surto houve falhas no sistema de tratamento, mais especificamente, nas etapas de coagulação, floculação e filtração. O rio que abastecia a população apresentava uma sobrecarga de dejetos

de bovinos, de efluentes agrícolas, sendo que as chuvas contribuíram para o escoamento de áreas de pastagem de gado (HAYES et al., 1989; SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996; KARANIS et al., 2007).

Em 1988, no Reino Unido, em Ayrshire, um episódio de grande relevância, devido ao número de internações (44,4%), foi relatado; desta vez a causa de uma infiltração de dejetos de bovinos utilizados como fertilizantes contaminou o reservatório da cidade. A contaminação com oocistos de *Cryptosporidium* ocorreu pós-tratamento, em vez de falha dos processos de tratamento de água (SMITH e ROSE, 1998; BARER e WRIGHT, 1990 e KARANIS et al., 2007).

Em 1993, na cidade de Milwaukee, Wisconsin, EUA ocorreu o maior surto de criptosporidiose de veiculação hídrica documentado até o momento; neste episódio, 403.000 pessoas desenvolveram sintomas de gastroenterite, foram hospitalizados 4.400 indivíduos e ocorreram 100 mortes, sendo que dentre esses, 69 pacientes eram portadores de HIV (SMITH e ROSE, 1998; CORSO et al., 2003; CACCIÒ et al., 2014).

A ocorrência desse surto foi relacionada à passagem dos oocistos pelo inadequado processo de coagulação e filtração e consequente distribuição da água tratada contendo um pequeno número de oocistos (13 oocistos/100L ou 0,13/L). O monitoramento da turbidez acusou valores variáveis de 0,1 a 2,7 unidades de turbidez além de aumento na contagem bacteriana, sinalizando falhas operacionais no processo de tratamento de uma das estações de tratamento de água da cidade (FOX et al., 1996; KARANIS et al., 2007).

Posteriormente, as técnicas moleculares permitiram identificar espécies e subgenótipos de *Cryptosporidium* envolvidos no surto de Milwaukee, o que tornou possível averiguar que *C. hominis* foi o principal agente etiológico envolvido no surto; mais recentemente, o estudo da sequência de genes que codificam a glicoproteína *gp60* possibilitou a identificação de variação intraespecífica, ou seja, o subgenótipo IbA10G2 foi identificado em fezes humanas e amostras ambientais, tendo sido o responsável pelo episódio de abril de 1993, o que justifica as observações clínicas feitas na época do surto. O subgenótipo Ib exibe uma acentuada virulência (JEX e GASSER, 2014; WIDERSTRÖM et al., 2014).

A distribuição das espécies de *Cryptosporidium* foi posteriormente caracterizada em 50 amostras de esgoto da cidade de Milwaukee, tendo-se evidenciado a ocorrência de seis espécies de *Cryptosporidium*: *C. andersoni*, *C. muris*, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. canis*, *C. felis* e *Cryptosporidium* genótipo cervídeo (W4), o que indica que a transmissão continua estável, mesmo na ausência de novos surtos (ZHOU et al., 2003; XIAO et al., 2001).

O custo total deste surto epidêmico foi de 96,2 milhões de dólares incluindo os custos médicos e perdas de produtividade; ressalte-se que a incapacidade de manter segura a água potável tem um impacto substancial sobre a economia e saúde da comunidade (CORSO et al., 2003).

Outro surto significativo, com duração entre dezembro de 1993 a maio de 1994, ocorreu em Las Vegas, Nevada, EUA em uma moderna estação considerada até a atualidade como modelo pelo “estado de arte”; quando da ocorrência do surto, esta estação já praticava o monitoramento visando os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*; entretanto após 18 meses de monitoramento, uma única amostra foi positiva para *Cryptosporidium*, a qual foi detectada entre aquelas colhidas e referentes às águas de retrolavagem dos filtros. Neste surto, 103 pessoas foram afetadas, reconhecidas a partir de diagnósticos da infecção entre portadoras de HIV, 41 pessoas morreram, e destas, pelo menos 20 tiveram a criptosporidiose como causa da morte (SOLO-GABRIELE e NEUMEISTER, 1996; ROEFER et al., 1996; KARANIS et al., 2007).

Karanis et al. (2007) relataram 325 surtos de 1984 a 2004, associados à veiculação hídrica em todo o mundo, onde um dos agentes etiológicos prevalentes foi *Cryptosporidium parvum*, responsável por 165 surtos (50,8%). De 2004 a 2010, foram reportados 199 surtos em Austrália, América do Norte e Europa onde foi responsável *Cryptosporidium* spp. por 120 surtos (60,3%), estando associada à contaminação de sistemas de água potável (BALDURSSON e KARANIS, 2011).

Em Östersund, Suécia, em novembro de 2010, cerca de 27.000 pessoas foram acometidas por um surto epidêmico de criptosporidiose por veiculação hídrica. O surto

foi caracterizado por um rápido início e alta taxa de ataque, especialmente entre pessoas jovens e adultos que apresentaram doença intestinal e diarreia prolongada. A identificação molecular confirmou a presença de *Cryptosporidium hominis* subtipo IbA 10G2 em amostras humanas e ambientais (WIDERSTRÖM et al, 2014).

Já no período entre 2011- 2012, ocorreram surtos de transmissão hídrica causados pelo protozoário *Cryptosporidium* spp. em 50 estados e duas jurisdições metropolitanas dos Estados Unidos, atingindo 17.321 pessoas com sintomas como: diarreia, cólicas abdominais, febre, náuseas, vômitos, anorexia. A identificação de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp., foi feita com técnicas moleculares em amostras de fezes, fluido intestinal e tecido (MMWR,2015).

Na cidade de Baker, Oregon, nos EUA em 2013, foi registrado um surto de veiculação hídrica causado por *Cryptosporidium*, associado com um sistema de água municipal, atingindo 2.780 pessoas, sendo que todas as amostras ambientais e humanas testaram positivo para *Cryptosporidium*. As amostras humanas confirmadas laboratorialmente foram identificados molecularmente como *Cryptosporidium parvum* Ila A15G2R1, subtipo encontrado em bezerros pré-desmamados infectados nos Estados Unidos; destaque-se que foi observado gado pastando ao longo das fronteiras das bacias hidrográficas (DE SILVA et al., 2015).

2.5) Metodologia de detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais

Para o diagnóstico da presença de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. em água, as metodologias existentes compreendem três etapas: concentração da amostra que pode ser realizada mediante filtração em cartucho, em cápsulas de filtração como Filtia Max[®], Envirocheck[®], filtração por fluxo contínuo (Haemonetics, Braintree, MA) ou floculação em Carbonato de Cálcio, seguidas de etapa de purificação realizada por métodos convencionais ou separação Imunomagnética – IMS e finalmente, a visualização e enumeração de organismos (VESEY et al., 1993;

ALDOM E CHAGLA, 1995; DI GIORGIO et al., 2002; EPA, 2005a; ZUCKERMAN et al., 2006).

Antes de 1998, os dados obtidos foram gerados empregando o método ICR (*Information Collection Rule*) que incluía o uso de filtros de cartucho (tipo *cartridge*) de polipropileno de porosidade de 1µm; eram utilizados grandes volumes de água (cerca de 100 L para água bruta e 1.000L para água tratada), ajustada para um fluxo de filtração de 1–5 L/min, o material retido nos filtros era eluído, cortando-se o filtro e lavando-o com uma solução detergente diluída, resultando em 3 a 4 litros que eram concentrados por centrifugação (FRICKER e CRABB, 1998; ZARLENGA, 2004).

A etapa de purificação consistia em metodologia convencional, empregando-se gradiente de densidade (sacarose-Percoll[®]) e para a visualização era utilizada a reação indireta de imunofluorescência, realizada em membranas de 25mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade nominal (EPA, 1995a).

Essa metodologia apresentava limitações e dificuldades, tais como: baixa recuperação de organismos em direta dependência da qualidade da água, e idade dos oocistos (HSU, 2001; HSU et al., 2003), além que o método era trabalhoso e demorado, requerendo grande experiência do microscopista (devido à ocorrência de resultados falsos positivos e falsos negativos), e promovendo perda dos epítomos dos oo(cistos) cuja integridade é importante para o método de Imunofluorescência indireta (EPA, 1995a; EPA, 1995b).

Ongerth e Stibbs (1987) propuseram a técnica de filtração em membrana de policarbonato, utilizando membranas grandes, de porosidade nominal de 2 µm, sendo a eluição dos organismos realizada mediante extração mecânica e uso de surfactante; sendo possível a filtração de 10L a 20L de água com baixa turbidez e 1L a 2L com água com alta turbidez. A eficiência de recuperação de oocistos dessa metodologia variou de 22,0% a 36,0%, e essa técnica também tem sido utilizada para concentrar cistos de *Giardia* com recuperações variando de 41,0% a 49,0% (NIEMINSKI et al., 1995; FRICKER e CRABB, 1998; ZARLENGA, 2004).

Aldom e Chagla (1995) empregaram a membrana de acetato de celulose de porosidade nominal de 1,2 μm , mas propuseram um novo protocolo de eluição realizado mediante a dissolução da membrana em acetona e lavagens sucessivas com etanol; após centrifugo-concentração o *pellet* final era submetido à imunofluorescência, sendo que as amostras com turbidez elevada eram geralmente submetidas a um procedimento de purificação. A eficiência de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* alcançou 70,5%, entretanto, partículas sólidas não dissolvidas pela acetona causavam interferências na detecção de oocistos (JAKUBOWSKI et al., 1996).

A técnica de filtração de membranas foi aplicada em muitos estudos, porém, apresentando diferentes eficiências de recuperação devido aos diferentes tamanhos das membranas utilizadas: 293 mm (ONGERTH et al., 1987; ALDOM e CHAGLA, 1995), 142 mm (DAWSON et al., 1993) e 47 mm (FRANCO et al., 2001), diferentes métodos de eluição empregados e distintas características das amostras hídricas.

Entre as vantagens que essa metodologia apresenta em comparação com os outros métodos é seu baixo custo, possibilitando a sua implementação por muitos laboratórios de saúde e empresas de saneamento, sendo uma alternativa viável para a maioria dos países em desenvolvimento. Ressalte-se que a eluição por extração mecânica e lavagens sucessivas mantém a infecciosidade dos oocistos, propiciando a realização dos bioensaios. Porém, a filtração em membranas é limitada pelo efeito de turbidez da água, pois quanto maior a turbidez, mais rapidamente ocorre a obstrução dos poros da membrana, o que gera a necessidade de trocar as membranas para filtrar todo o volume inicialmente estipulado, podendo ocorrer perdas de organismos devido a necessidade de várias etapas de centrifugação visando a obtenção de um pequeno volume de sedimento final a ser examinado por Microscopia de Fluorescência (FRANCO et al., 2012).

O método da floculação em carbonato de cálcio foi desenvolvido por Vesey et al. (1993), empregando amostras com volume de 10 litros de água. Neste procedimento, a amostra de água é submetida à agitação rápida com a adição de soluções de cloreto de cálcio e bicarbonato de sódio, sendo a seguir o pH elevado com adição de hidróxido de sódio. Após um período de sedimentação (*overnight*), o sobrenadante é descartado

e o precipitado formado é dissolvido empregando-se uma solução de ácido sulfâmico. Finalmente, procede-se sucessivas centrifugações até a obtenção de um *pellet* que é aliquoteado e examinado por Microscopia de Fluorescência (VESEY et al., 1993; CANTUSIO NETO et al., 2010).

O método apresenta uma série de limitações como: a redução da fluorescência dos organismos e aumento da fluorescência residual, de acordo com o tipo de agente flocculante empregado; deformações podem ser induzidas nos cistos pela exposição aos ácidos e elevação do pH durante a execução da metodologia, acarretando dificuldade no reconhecimento dos parasitos por microscopia e levando a resultados falso-negativos ou falso-positivo; outro fator limitante é a possibilidade de perda de organismos no sobrenadante dependendo da força centrífuga empregada na etapa de concentração. Entretanto a elevada concentração de sedimento rico em material particulado presente na água, é a principal dificuldade inerente a essa metodologia interferindo na determinação dos protozoários parasitas (VESEY et al., 1993; FRICKER e CRABB, 1998; FRANCO et al., 2012).

Em 1997, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), devido ao aumento na ocorrência de surtos epidêmicos de veiculação hídrica nos EUA, conduziu um censo das metodologias utilizadas até aquele momento pela detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium* no país, visando a elaboração de uma metodologia padronizada e otimizada. Essa iniciativa resultou no desenvolvimento do Método 1622; entretanto, tal metodologia somente contemplava a detecção de *Cryptosporidium*; logo em seguida foi publicado o Método 1623 considerado como método de referência até o momento, tendo sido publicada uma nova versão em 2012 (Método 1623.1) (EPA, 2005b; FRANCO et al., 2012; EPA, 2012).

Nesta metodologia 1623 foram implementados novos procedimentos de concentração como a cápsula de filtração Envirocheck HV (Pall Gelman Envirocheck™), o sistema de filtração Filt-Max (IDEXX Filt-Max®) e a centrifugação de Fluxo Contínuo (Haemonetics, Braintree, MA), como alternativas para a filtração da amostra de água. Esse método representou um avanço em relação às metodologias antes existentes por incluir a etapa de purificação da amostra mediante a separação imunomagnética (IMS) e ampliar os critérios de positividade e detecção

por Microscopia de Imunofluorescência, incluindo a marcação com DAPI (4',6-diamino 2-fenilindole) e DIC (contraste interferencial diferencial) como teste confirmatório da morfologia (EPA, 2005b; ROCHELLE e DI GIOVANNI, 2014).

Os processos de concentração de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* levam ao acúmulo de material particulado nos sedimentos, resultantes das etapas de centrifugação, acarretando grande variabilidade de recuperação e afetando negativamente a sensibilidade das diversas metodologias; por esse motivo, um processo de purificação da amostra hídrica é requerido tal como aquela contemplada na metodologia 1623 (CLANCY et al., 2000).

Na técnica de separação imunomagnética (IMS) as amostras contendo cistos e oocistos são mantidas sob agitação com a solução de anticorpos monoclonais específicos conjugados com as esferas magnéticas para que haja captura dos organismos alvos; em etapa seguinte, os organismos aderidos aos complexos de esferas são separados magneticamente do restante da amostra. A dissociação em ácido é capaz de romper o complexo de esfera magnética conjugada aos organismos, que é formado como resultado da ligação de anticorpos com epítipo dos antígenos das paredes externas dos organismos (CLANCY et al., 2000).

A vantagem desta técnica é a redução dos possíveis interferentes contidos nas amostras ambientais. No entanto, a IMS ainda apresenta custos elevados, necessitando altos investimentos para sua realização.

O volume de água bruta requerido para análise laboratorial pelo Método 1623 inclui a filtração de 10L. Alguns autores têm relatado a dificuldade de filtrar esse volume devido à turbidez da amostra e, muitas vezes, o uso de mais de uma unidade de filtro torna-se necessário para filtrar 10L (ROCHELLE e DI GIOVANNI, 2014).

Entretanto, o desempenho do Método 1623 apresenta considerável variação entre diferentes laboratórios frente às características químicas e biológicas das amostras de água. De acordo com Messer (2011) a recuperação dessa metodologia variou de 0% a > 90%, com média de 39,7%, tendo sido examinados 3.370 pontos de

amostragem. De acordo com Di Giorgio et al. 2002, em águas com turbidez ao redor de 99 NTU, a eficiência média do Método 1623 foi de 36,0%.

As modificações introduzidas na versão publicada em janeiro de 2012 (Método de 1623.1) incluem a eluição dos filtros Envirocheck com solução de hexametáfosfato de sódio, uso da suspensão Waterborne AccuSpike™ para a determinação da percentagem de recuperação; uso de agitador Dynal® Mixer MX7 durante os procedimentos de IMS, esclarecimentos sobre os critérios de positividade e sobre os filtros utilizados na Microscopia de Fluorescência visando os fluorocromos em uso; exigência de citômetro de fluxo para a enumeração de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, entre outras atualizações a serem utilizadas no controle de qualidade (EPA, 2012; ROCHELLE e DI GIOVANNI, 2014).

Um novo sistema de Ultrafiltração de fluxo Tangencial de fibra oca tem sido utilizado, demonstrado ser mais eficiente na recuperação de oo(cistos) de *Cryptosporidium* e *Giardia* em várias matrizes de água, no entanto, a ultrafiltração ainda não foi validada para inclusão no Método 1623 (RHODES et al., 2012).

Smith e Nichols (2010) enfatizam que a maioria das metodologias existentes para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em água são baseadas na filtração das amostras para concentração dos protozoários; entretanto a filtração resulta no acúmulo de grande quantidade de material particulado e interferentes o que prejudica a análise. Segundo esses autores, o número de partículas que apresentam o mesmo tamanho que os oocistos (4-6 μm) pode exceder a proporção de 10^8 :1 quando processada uma amostra de 10L. Apesar do uso de esferas magnetizadas para a purificação no procedimento de separação imunomagnética, características químicas da amostra de água podem reduzir a eficiência dessa tecnologia.

Em suma, considerando-se o efeito negativo exercido pela turbidez e características químicas da água sobre a metodologia de referência, é muito provável que a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* vem sendo sub- estimada. Portanto, há a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias que acarretem em maior sensibilidade, apresentem menor custo e propiciem a inclusão de técnicas moleculares para determinação das espécies ou genótipos.

2.6) Técnica de Biologia Molecular

Considerando que existem 28 espécies de *Cryptosporidium*, 6 espécies para o gênero *Giardia* e 8 grupos genéticos para a espécie *G. duodenalis* que diferem em sua capacidade de infectar um ou múltiplos hospedeiros, humanos e não humanos (RYAN e HIJJAWI, 2015, SIMONE, CACCIÒ e LALLE, 2015, LI et al., 2015), a realização de técnicas moleculares visando determinar a espécie, genótipo ou grupo genético presentes nas amostras ambientais tornou-se uma necessidade.

O conhecimento da dinâmica de transmissão do *Cryptosporidium* e *Giardia* tem sido tradicionalmente difícil, pois a maioria das espécies são morfologicamente idênticas; assim, conhecer quais espécies estão presentes nos mananciais e verificar quais as fontes de contaminação das águas, são dados que somente podem ser obtidos mediante ferramentas de caracterização molecular como reação em cadeia de polimerase (PCR) e análise do sequenciamento de ácido desoxirribonucleico (DNA) (RYAN e XIAO, 2014).

A PCR é a técnica mais comum utilizada pelos pesquisadores por superar algumas limitações dos métodos convencionais; baseia-se no processo natural de replicação de DNA produzindo múltiplas cópias do gene alvo de interesse *in vitro* que tem como finalidade aumentar a sensibilidade de detecção e caracterização de organismos patogênicos em amostras com baixa concentração de DNA, principalmente em amostras ambientais (XIAO et al., 2004; KARP, 2005).

Apesar de aumentar a sensibilidade de detecção, existe a probabilidade de contaminação da reação devido ao excesso de manipulação do produto amplificado (COUPE et al., 2005). A presença de inibidores da reação presentes nas amostras hídricas como ácidos húmicos, pólen, organismos de vida livre (bactérias, outros protozoários e algas) e insetos podem não somente obstruir filtros, mas podem interferir nas técnicas moleculares como a PCR, inibindo a reação de amplificação (XIAO et al, 2001; ZARLENGA et al., 2004; ROBERTSON et al, 2011), além do fato de que oocistos e cistos estão usualmente presentes em pequenas quantidades nas amostras ambientais o que limita o número de amostras que podem ser amplificadas com sucesso (GASSER e O'DONOUGHUE, 1999).

Uma variação da PCR, conhecida como *Nested* PCR (nPCR), utiliza dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores em reações subsequentes, cujo produto de amplificação da primeira reação é utilizado como molde para a segunda tem sido aplicada com sucesso à análises de protozoários em amostras ambientais diversas; por outro lado, a técnica de reação de amplificação em tempo real quantitativa (qPCR) é uma técnica promissora para detecção e quantificação de diferentes organismos em diversos tipos de amostras. A qPCR é um sistema adaptado para detecção de sequências alvo que permite não só a determinação da variabilidade genética entre os isolados como também medir a quantidade relativa de DNA acumulada ao final dos ciclos da reação (GUY et al., 2003; STROUP et al., 2006; ALONSO et al., 2011; RYU et al., 2010; STAGGS et al., 2013).

Os alvos de amplificação para *Cryptosporidium* mais estudados incluem os genes *18S rRNA*, *gp 60*, *SSUrRNA*, *HSP70*, *COWP*, *Beta-Tub*, *TRAP*, *ITS* (LEETZ et al. 2007; ROCHELLE 2001; XIAO et al., 2006; RENGIFO-HERRERA et al., 2013).

Os genes *18S rRNA* e *gp60* são amplamente utilizados em estudos de organismos estreitamente relacionados e, em diversas aplicações como análise filogenética em pesquisas de biodiversidade que permitem investigar a fonte de contaminação e vias de transmissão (MEYER et al., 2010).

Pesquisa feita com 80 crianças peruanas moradoras de uma comunidade carente denominada “Pampas de San Juan de Miraflores”, Lima, Peru, realizou-se a genotipagem para *Cryptosporidium* tendo-se utilizado o gene *SSU rRNA*, que revelou haver cinco tipos de *Cryptosporidium* nas amostras analisadas: *Cryptosporidium parvum* genótipo humano, *C. parvum* genótipo bovino, *C. parvum* genótipo canino, *C. meleagridis*, e *C. felis*, destacando-se o conhecimento da heterogeneidade do parasito e das espécies de *Cryptosporidium* e genótipos zoonótico associados com efeitos na saúde humana (XIAO et al., 2001).

A caracterização molecular dos cistos de *G. duodenalis* vem sendo amplamente utilizada em amostras clínicas e ambientais para auxiliar na taxonomia do parasito e em estudos de epidemiologia da infecção; os estudos tem sido realizados através da

análise dos genes bem conservados como *18S rRNA*, *gdh*, *ef1 α* , *tpi* e genes associados com proteínas do parasito (*bg*) Beta giardina (MONIS et al., 1999; LALLE et al., 2005; RYAN e CACCIÒ, 2013).

O gene *tpi* é um adequado marcador filogenético para a análise da relação evolutiva molecular e taxonomia do parasito *G. duodenalis*; além disso, apresenta alta heterogeneidade genética neste *locus* (SULAIMAN et al., 2003). Com efeito, a heterogeneidade de sequência no *locus* do gene *bg* também pode ser extremamente útil para a detecção da fonte de infecção particularmente se *Giardia* apresenta uma população clonal (MELONI et al, 1995; LALLE et al., 2005).

A maioria dos estudos de genotipagem para *Giardia* usa como genes alvo, *SSUrRNA*, *bg*, *tpi*, *gdh* (CACCIÒ et al., 2008). O gene *SSU rRNA* é utilizado por apresentar uma maior sensibilidade na detecção de DNA de *Giardia*, devido à sua natureza multicópia. Os restantes três genes apresentam um elevado grau de heterogeneidade genética para o gênero *Giardia* spp. permitindo uma melhor diferenciação intragenotípica, ou seja, em nível de sub-genótipos (CACCIÒ e RYAN, 2008).

COOPER et al. (2010) fizeram estudos com amostras fecais de 22 famílias e seus cães no distrito de San Juan de Miraflores, Lima, Peru, as amostras foram genotipadas para *Giardia duodenalis* utilizando dois genes *tpi* e *SSU rRNA*, o que revelou que todas as infecções humanas foram causados por isolados de genótipos de *Giardia duodenalis* AII e B ou AII/B, todos os cães tinham genótipos C ou D com exceção de um cão com genótipo B/D. Destaque-se que o estudo foi feito numa região de alta endemicidade onde os cães e seres humanos infectados estão em estreita proximidade, além da falta de condições de higiene, e sugere a existência de transmissão zoonótica e infecção mista por *Giardia duodenalis*.

2.7) *Cyclospora cayetanensis*

Cyclospora cayetanensis é um protozoário patogênico intestinal humano emergente. Por ignorar-se a sua posição taxonômica foi referido como: organismos similares a cianobactérias ou grandes formas de *Cryptosporidium* (MEZZARI et al., 1999).

Após o relato de Ortega, que descreveu a esporulação deste parasito, o mesmo recebeu a denominação de *Cyclospora cayetanensis*, sendo essa nomenclatura proposta em homenagem a Universidade Cayetano Heredia Lima, Peru, local onde foram realizadas as investigações (ORTEGA et al., 1993).

Está definido como protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa por apresentar uma estrutura conhecida como complexo apical, sendo um parasito intracelular obrigatório, que constitui uma importante causa de diarreia no mundo inteiro. *Cyclospora* é transmitida através da rota fecal-oral. A transmissão direta pessoa a pessoa é pouco provável porque os oocistos eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados necessitam de um longo tempo em ambientes favoráveis para tornarem-se infectantes (esporulados) (ORTEGA et al., 1993).

Esta infecção parasitária está associada a diarreia do viajante (DELUOL et al., 1994; PUENTE et al., 2006) tornando-se importante nos primeiros anos da década de 1990, quando sua associação com diarreia foi relatada em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (KAMINSKY et al., 1991; PAPE et al., 1994). Além disso, na década de 90 este protozoário coccidia foi relacionado com a ingestão de frutas e verduras frescas contaminadas como framboesas, morangos, alface, manjerição os quais têm sido implicados como veículo para a infecção.

Os pacientes com ciclosporoze apresentam como quadro geral náusea, vômitos, anorexia, flatulência, dor abdominal, perda de apetite e diarreia aquosa após um período de incubação que varia de dias até semanas (CDC, 2013).

A ciclosporose tem sido relatada em todo o mundo. Os primeiros casos foram relatados em residentes ou viajantes que retornavam do Sudeste da Ásia, Nepal, Peru, Haiti, Ilhas Caribenhas. A crescente globalização do comércio de alimentos frescos, viagens internacionais, e a tendência moderna para consumir comida rápida fora de casa, tem contribuído para a propagação de *C.cayetanensis* das áreas endêmicas para as não-endêmicas. Desde 1995, vários surtos de ciclosporose de origem alimentar foram documentados nos Estados Unidos e Canadá (MANSFIELD e GAJADHAR, 2004; DAWSON, 2005).

Segundo o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), em setembro de 2015, tinham sido notificados 546 casos confirmados de pessoas doentes com *Cyclospora* em 31 estados nos Estados Unidos, na faixa etária entre 15 e 89 anos, com uma idade mediana de 51 anos. Inquéritos efetuados no Texas, Wisconsin, e na Geórgia indicaram que a infecção, entre uma parcela dos residentes nesses estados, estava ligada ao consumo de coentro fresco (CDC, 2015).

2.8) Características da região estudada

O departamento de Lima é composto de 10 províncias com 171 distritos (municípios); esse departamento concentra os centros de atividades econômicas e financeiras do país, sendo o mais populoso do Peru. De acordo com o último relatório do INEI, Lima possui 9.541.000 habitantes, o que representa aproximadamente 1/4 da população total do país; estima-se que, em 2040, serão 14 milhões (INEI/Peru, 2013).

A região Metropolitana de Lima é formada pelas províncias de Lima e Callao, sendo a segunda metrópole do mundo em uma área de deserto, perdendo apenas para a cidade egípcia de Cairo. Destaque-se que não chove em Lima, sendo que a maior parte do seu abastecimento de água vem dos seus três principais rios: Lurin, Chillón e principalmente o rio Rímac (AGUA FONDO/Peru, 2013).

O rio Rímac nasce na cordilheira dos Andes e pertence à bacia hidrográfica do Pacífico, com um comprimento de 160 Km; os principais afluentes do rio Rímac são os rios San Mateo, Santa Eulália e Rio Blanco. Neste rio ocorre a captação de 80% de água bruta que é empregada no abastecimento de água para a cidade de Lima e Callao. O tratamento de água captada é realizado na Planta de Tratamento de la Atarjea de “Servicio de Agua Potable y Alcantarillado de Lima” (SEDAPAL) (SEDAPAL/Peru, 2015).

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo geral

Verificar a ocorrência e realizar a caracterização molecular de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. eventualmente presentes em água bruta do rio Rímac, Lima e Callao, Peru.

3.2) Objetivos específicos

Verificar a existência de correlação entre a ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* e as características físicas e químicas bem como vazão da água bruta do rio Rímac, Lima e Callao, Peru.

Pesquisar a ocorrência de oocistos de *Cyclospora cayetanensis* nas diversas amostras de água mediante caracterização morfológica.

4) MATERIAL E MÉTODOS

A filtração das diversas amostras de água bruta foi realizada no Laboratório de Parasitologia e Bacteriologia do Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” (IMTAvH) da Universidade Peruana Cayetano Heredia - Lima, Peru, em parceria com a Dra. Angelica Terashima, e os estudos de Reação de Imunofluorescência Direta, Extração de DNA e Caracterização Molecular de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram desenvolvidos nos Laboratórios de Protozoologia e de Biologia Molecular de Parasitos, ambos no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia (UNICAMP) Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

4.1) Área de amostragem

O rio Rímac é o mais importante rio do Departamento de Lima (Capital do Peru), estando geograficamente localizado entre os meridianos 77°04'36” e 76°11'05”

de longitude oeste e os paralelos 12°05'47" e 11°36'52" de latitude sul. O rio Rímac pertencente à vertente do Pacífico que banha as cidades de Lima e Callao. Começando na vertente ocidental dos Andes, a 5.500 metros de altitude na Laguna de Ticticocha para desaguar no Oceano Pacífico a 0 metro de altitude, possui uma extensão de 3.532km² e comprimento de 160 km, atravessando as províncias de Lima, Huarochiri e Callao (MINAG, ANA/Peru 2010).

As colheitas das amostras de água foram realizadas em 3 diferentes pontos de coleta do Rio Rímac (Figura 1), a saber:

- **Ponto 1: Ponte Los Angeles (Distrito Chaclacayo)**, localizada a 704 metros de altitude e um georeferenciamento de 11°58'4.222" S, 76°44'44.931" W.
- **Ponto 2: Ponte Balta (Distrito Cercado de Lima)**, localizada a 160 metros de altitude e um georeferenciamento de 12°2' 36.946" S, 77°1'23.279" W.
- **Ponto 3: Ponte Faucett (Província Constitucional del Callao)**, localizada a 44 metros de altitude e um georeferenciamento de 12°2'25.039" S, 77°6'2.219" W.

O critério para a escolha da área de estudo baseou-se na importância do "rio Rímac", de abastecer cerca de 1/4 da população de todo o país, localizado no Estado de Lima (Capital do Peru), apresentando esse rio um grave problema de gestão dos recursos hídricos pelas descargas de esgoto doméstico, efluentes industriais e agrícolas que impactam as suas águas ao longo de sua extensão, até finalmente o seu desaguamento no Oceano Pacífico.



Fonte: Sociedad Peruana de derecho Ambiental/Minam, Peru.

Figura 1- Localização geográfica dos pontos de coleta das amostras no Rio Rímac, localizados na província de Lima e Callao. Ponto 1) Ponte “Los Angeles” - Chaclacayo, Ponte 2) Ponte “Balta” - Cercado de Lima, Ponto 3) Ponte “Faucett” - Callao.

4.2) Preparo do Material de Coleta

Os galões de plásticos utilizados para coleta das amostras de água de rio, após lavagem apropriada, foram enxaguados com solução de eluição contendo água destilada e Tween 80 a 0,1% e anti-espumante com a finalidade de diminuir a aderência de oocistos e cistos nas paredes do recipiente. As diversas amostras colhidas foram acondicionadas em caixas isotérmicas a 4°C, desta forma transportada até o Laboratório Parasitologia y Bacteriologia (IMTAyB) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia del Perú.

4.3) Obtenção das amostras

As coletas das amostras foram em duas saídas de campo realizadas durante os meses de Janeiro e Fevereiro de 2014 e 2015; no Peru, essa época do ano corresponde ao verão que é caracterizado por períodos quentes (as temperaturas variam entre 21°C e 28°C), ausência de pluviosidade e umidade elevada do ar.

Foram colhidas 60 amostras no total, sendo 30 amostras por ano; assim, para cada ponto de amostragem, foram colhidas 10 amostras com periodicidade de 4 dias. Quatros litros de água bruta do rio foram colhidos no período de manhã, a uma profundidade não maior que 25 cm da superfície e a 2m da margem do rio (Manual de Saneamento; FUNASA, 2007). Após coleta, as diversas amostras foram transportadas em condições adequadas de refrigeração ao laboratório para posterior análise.

4.4) Exame parasitológico das amostras de água bruta para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

As amostras de água bruta do rio Rímac foram submetidas a filtração no mesmo dia de colheita. As membranas utilizadas foram de ésteres mistos de celulose (47mm de diâmetro, porosidade nominal de 3µm; marca Millipore®) sendo a técnica de filtração em membranas realizada de acordo com protocolo de Franco et al., 2001. O sistema de filtração utilizado foi uma bomba de vácuo, ajustada a um fluxo de filtração de 4L/min e porta – filtro de plástico (Nalgene®) (Figura 2).

Após a filtração de cada amostra, o sistema foi lavado com água e detergente neutro e descontaminado com solução de eluição e álcool 70%. As membranas contendo o material filtrado foram colocadas em placas plásticas de Petri (Millipore®) estéreis, e umedecidas com solução de eluição, mantidas refrigeradas até a eluição dos organismos-alvo (Figura 3).

O material retido na membrana foi extraído mecanicamente mediante a raspagem cuidadosa e suave da superfície da membrana, evitando rompimentos e

solturas das fibras, com o auxílio de alças plásticas flexíveis e, alternadamente, foram feitas lavagens sucessivas da membrana com solução de eluição, contendo Tween 80 a 0,1%, sendo essas etapas executadas durante 20 minutos.

O líquido resultante foi transferido para tubos de centrífuga de plástico (previamente lavados e descontaminados), com capacidade de 15ml que foram submetidos a centrifugação a 1500xg - 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso com solução de eluição, centrifugado novamente como na primeira etapa; o sedimento final foi dividido em duas alíquotas de 1ml cada: à primeira alíquota, foi adicionada solução de formalina 5,0%, visando preservar a integridade morfológica dos cistos e oocistos eventualmente presentes nas amostras e, as mesmas foram posteriormente submetidas à reação de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*. Na segunda alíquota foram adicionados antibióticos (0,5µL x 1ml) (Gentamicina, Penicilina, Streptomicina, Garamicina) visando a realização das análises moleculares; as amostras foram mantidas em geladeira para seu traslado ao Brasil em caixas isotérmicas a 4°C.



Figura 2- Sistema de Filtração de Membranas com bomba de vácuo, motor e porta filtro de plástico (Nalgene®).

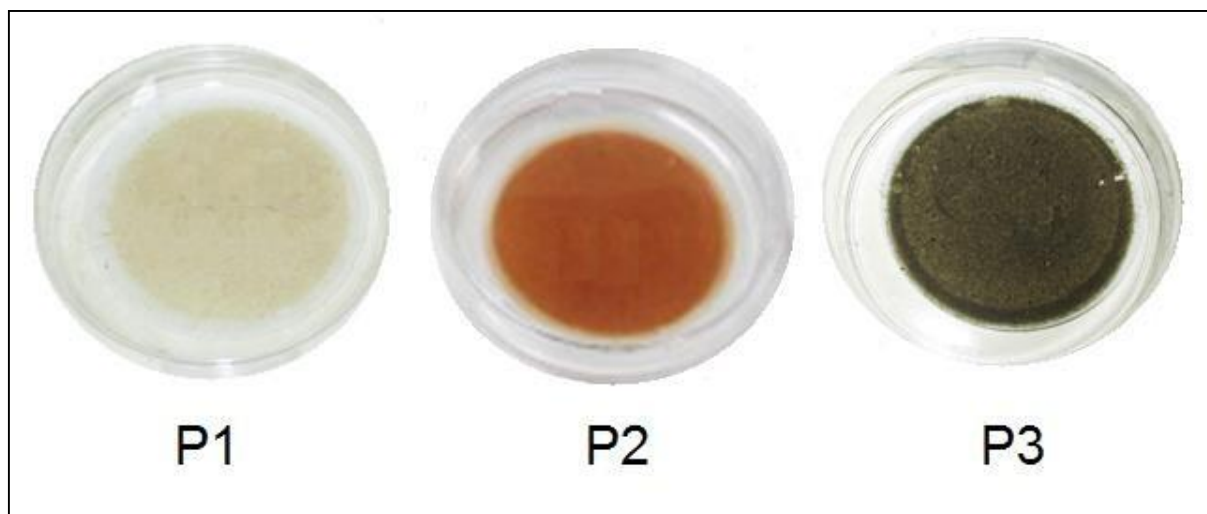


Figura 3- Membranas de celulose após a filtração da água bruta dos três pontos de coleta P1 – Ponte Los Angeles, P2 – Ponte Balta, P3 – Ponte Faucett do Rio Rímac 2014-2015, Lima, Peru.

4.5) Análises físicas e químicas, vazão das amostras de água bruta do rio Rímac

Para as análises físicas e químicas, as coletas foram feitas em frascos de 1 L, previamente lavados, sem preservantes. As amostras foram analisadas *in situ* com os seguintes aparelhos: turbidímetro do modelo 2100Q (HACH®) para análises da turbidez, para temperatura e pH se empregou o aparelho do modelo sensION+ PH1 (HACH®); foram medidos em seguida à coleta da amostra de água no campo de acordo com os procedimentos do Standard Methods (APHA, 2012). As medições de vazão nos três pontos de coleta foram proporcionadas pela empresa SENAMHI (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrobiología del Perú).

4.6) Reação de Imunofluorescência Direta (RID)

A técnica empregada para detecção e visualização dos cistos e oocistos eventualmente presentes nas diversas amostras foi a Reação de Imunofluorescência Direta com a utilização do kit *Cryptosporidium/Giardia*-Cel I.F.Test® (CELLABS PTY, LTD, Austrália), empregado de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 10 µl do sedimento obtido por amostra foram submetidas à reação de

imunofluorescência direta; também foram utilizadas as suspensões de controle positivo e controle negativo para atestar a qualidade da RID; para tanto, utilizaram-se suspensões provenientes do kit Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*, (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio).

As alíquotas previamente submetidas à homogeneização em vórtex foram distribuídas de forma homogênea em cada poço da lâmina de imunofluorescência. Após 30 minutos de secagem em temperatura ambiente, procedeu-se à fixação com metanol (durante 5 minutos). Posteriormente, 20ul do reagente de detecção contendo anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*, marcados com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), foi colocada sobre cada poço da lâmina e estas foram incubadas na estufa a 37°C, em câmara úmida, protegidas da luz durante 30 minutos. Ao término deste tempo, cada poço foi lavado por gotejamento de solução tampão fosfato (pH 7.5) disponível no Kit Merifluor® sendo o excesso de líquido retirado inclinando-se a lâmina a 45°C sobre papel absorvente, evitando possível contato entre os poços. O material a ser examinado foi ordenado nas lâminas de tal forma que o controle negativo ficasse entre as amostras da suspensão do “controle positivo” e a da água bruta concentrada.

Para o teste confirmatório da morfologia, foram empregados 20 µl do corante fluorogênico DAPI (4'-6- diamidino-2-fenilindole), na concentração de 1:5000 por 10 minutos, o qual é incorporado nos núcleos de oocistos e cistos, cujas paredes apresentam permeabilidade ao corante, deixando reagir por 10 minutos em câmara escura. Decorrido esse intervalo de tempo, a lâmina era lavada com solução tampão fosfato e água destilada, após a retirada do excesso de líquido, com auxílio de papel absorvente.

Finalmente as preparações foram cobertas com lamínula após adição de Meio de Montagem disponível no kit (CELLABS) e acondicionadas em placas de Petri, ao abrigo da luz sob refrigeração até o momento da análise microscópica.

As diversas preparações foram visualizadas com aumentos de 400x ou 600x no microscópio de epifluorescência (Jenalumar – Carl Zeiss®) com filtros de excitação

450-490nm e um filtro de barreira de 520nm para FITC (Isotiocionato de fluoresceína); para DAPI, utilizou-se luz ultravioleta com filtro de excitação de 355nm e um filtro de barreira de 450nm. As amostras também foram observadas em contraste interferencial diferencial (DIC).

Os critérios de positividade que foram considerados para cistos de *Giardia spp.* e oocistos *Cryptosporidium spp.* foram baseados naqueles descritos no Método 1623.1 (EPA, versão de janeiro de 2012), como segue:

- FITC:

- Intensidade de fluorescência em tonalidade “verde maçã” brilhante predominante na parede de cistos e oocistos.
- Borda brilhantemente destacada (a presença de um “anel” brilhante ao redor da parede de cistos e oocistos); eventual presença de sutura.
- Tamanho de cistos (8-18 μm) e para oocistos (4-6 μm).
- Formato ovoide ou esférico.

- DAPI:

- Coloração azul leve.
- Até quatro núcleos evidenciados em azul-céu claro.

- DIC:

- Estruturas características internas como núcleos (n=4, para oocistos; 2 ou 4 para cistos), axonemas (para cistos).
- Ausência de apêndices, brotamento, cristais e poros nas paredes dos cistos/oocistos.

4.7) Estimativa do número de cistos de *Giardia* e oocistos *Cryptosporidium* por litro de amostra

Para a estimativa do número de cistos e de oocistos por litro da amostra, foi utilizada a seguinte equação (Franco et.al 2001):

$$F = \frac{A}{C} \times \frac{B}{D}$$

F = Número de (oo)cistos por litro.

A = N^o de (oo)cistos visualizados no poço da lâmina de imunofluorescência.

B = Volume total do sedimento, após centrifugação (μl).

C = Volume da alíquota da amostra semeado no poço da lâmina de imunofluorescência (μl).

D = Volume total da amostra filtrada (L).

4.8) Pesquisa de oocistos de *Cyclospora cayetanensis* nas diversas amostras de água

Alíquotas dos sedimentos resultantes da técnica de filtração em membranas foram examinadas mediante a flutuação em solução saturada de sacarose (gr.sp.=1.02) visando a pesquisa de oocistos de *Cyclospora cayetanensis*. Após a flutuação, colheu-se a camada superficial a qual foi transferida para lâminas, tendo-se adicionado o meio de montagem do kit de imunofluorescência e lamínula. As diversas preparações foram examinadas com microscopia de epifluorescência, com filtros para a luz UV, visando a observação da autofluorescência natural dos oocistos de *Cy. cayetanensis*.

4.9) Análise Estatística

A análise da comparação das médias nos locais de coleta foi realizado aplicando-se o teste de Tukey, um teste paramétrico, localizando-as por meio de diferentes agrupamentos (letras A ou B), apresentando diferenças significativas por

local. Para verificar a eventual existência de correlação entre as variáveis (cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*; características físicas e químicas e vazão das águas do rio Rímac) das diferentes amostras, foi aplicado o Teste de Correlação de Pearson (r), sendo que valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. As correlações foram classificadas conforme Santos (2007) (Tabela 2).

O programa SAS Inc. 2009 for Microsoft Windows Professional. Versão 9.1 Cary, NC,1028P foi utilizado nas análises de correlação e do teste de Tukey.

Tabela 2- Classificação das correlações de Pearson *

Coefficiente de Correlação	Significado da Correlação
$r=1$	Perfeita Positiva
$0,8 \leq r < 1$	Forte Positiva
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderada Positiva
$0,1 \leq r < 0,5$	Fraca Positiva
$0 \leq r < 0,1$	Intima Positiva
0	Nula
$-0,1 < r \leq 0$	Intima Negativa
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fraca negativa
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderada negativa
$-1 < r \leq -0,8$	Forte Negativa
$r=-1$	Perfeita Negativa

* Fonte: Santos, 2007.

5.1) Caracterização molecular para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

A pesquisa de DNA de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foi efetuada somente para as amostras positivas na Reação de Imunofluorescência Direta.

A extração do material genético do protozoário *Giardia* e *Cryptosporidium* foi conduzida mediante utilização de kit comercial ZR Fungal/ Bacterial DNA Kit (Zymo Research®) e Power Soil DNA Isolation Kit (MoBio®), respectivamente de acordo com as instruções do fabricante. Ao final da extração, 100µl de DNA foram obtidos e armazenados a -20°C.

5.0.1) Amplificação do gene *tpi*

Para a identificação do grupo genético de *Giardia* para o gene *tpi* presente em cada amostra, foi realizado a *Nested* PCR de forma a aumentar o sucesso das amplificações conforme Sulaiman et al. (2003). Para a primeira amplificação foram utilizados os iniciadores:

- AL3543 (5'-AAATATGCCTGCTCGTCG-3') e
- AL3546 (5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3') que amplificam um fragmento

de 605pb.

Para a segunda amplificação, foram utilizados os iniciadores:

- AL3544 (5'-CCCTTCATCGGGGTAACCTT-3') e
- AL3545(5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3') que amplificam um

fragmento de 530pb.

Na primeira reação a *mix* da PCR continha: 4,5 µl de Nuclease - Free Water (1X), 12,5 µl de GoTaq® (PROMEGA) Colorless Master Mix (2x), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP and 3 mM de MgCl₂, 2 µL de BSA (0,1g/10mL), 1,5 µL de cada iniciador (10 µM), 3 µL de DNA, com um volume total de reação de 22 µl.

Na segunda reação a *mix* da PCR continha: 5,5 µL de *Nuclease-Free Water* (1X), 12,5 µl de GoTaq® (PROMEGA) Colorless Master Mix (2x), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP and 3 mM de MgCl₂, 1,5 µL de cada iniciador (10 µM), 4 µL de DNA dos produtos amplificados da primeira reação, com um volume total de reação de 21 µl.

As reações foram realizadas em termociclador BIORAD C1000 Thermal Cycler®, e as condições de amplificação para as duas reações foram: um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 5min., seguido de 35 ciclos de 94°C por 45s, 50°C por 45s, 72°C por 60s e a extensão final foi realizada sob 72°C por 10 minutos.

5.1.2) Amplificação do gene *bg*

Para a identificação do grupo genético de *Giardia* para o gene *bg* presente em cada amostra, foi realizada *Nested* PCR de forma a aumentar o sucesso das amplificações. Para a primeira amplificação foram utilizados os iniciadores G7 e G759 descritos por Cacciò et al. (2002).

- G7 (5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC'3) e

- G759 (5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3') que amplificam um fragmento de 753pb.

Para a segunda amplificação, foram utilizados os iniciadores descritos por Lalle et al. (2005).

- (5'-GAACGAGATCGAGGTCCG-3') e

- (5'-CTCGACGAGTTCGTGTT-3') que amplificam um fragmento de 511 pb.

Na primeira reação a *mix* da PCR continha: 4,5 µl de Nuclease - Free Water (1X), 12,5 µl de GoTaq® (PROMEGA) Colorless Master Mix (2x), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP and 3 mM de MgCl₂, 2 µL de BSA (0,1g/10mL), 1,5 µl de cada iniciador (10 µM), 3 µL de DNA, com um volumen total de reação de 22 µl. As condições do termociclador foram: um ciclo de denaturação inicial de 94°C por 5min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30s, 65°C por 30s, 72°C por 1min e extensão final foi realizada sob 72°C, 7min. em termociclador BIORAD C1000 Thermal Cycler ®.

Na segunda reação a *mix* da PCR continha: 4,5 µl de Nuclease - Free Water (1X), 13,5 µl de GoTaq® (PROMEGA) Colorless Master Mix (2x), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP and 3 mM de MgCl₂, 1,5 µl de cada iniciador (10 µM), 4 µL de DNA dos produtos amplificados da primeira reação, com um volumen total de reação de 21 µl. A termociclagem foi realizada nas seguintes condições: um ciclo de denaturação inicial de 95°C por 15min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30s, 72°C por 1min e extensão final a 72°C, 7min. em termociclador BIORAD C1000 Thermal Cycler ®.

5.1.3) Amplificação do gene *18S rRNA*

Para a detecção molecular da presença de *Cryptosporidium* spp. nas amostras ambientais foram realizadas amplificações do gene *18S rRNA* comum a todas as espécies de forma a aumentar o sucesso das amplificações conforme Xiao et al. (1999).

Para a primeira amplificação foram utilizados os iniciadores:

:

-(5'TTCTAGAGCTAATACATGCG 3')

-(5'CCCATTTCTTCGAAACAGGA3') que amplificam um fragmento de

1025pb.

Para a segunda amplificação, foram utilizados os iniciadores:

-(5'GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG3')

-(5'AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA3') que amplificam uma região de

830 pb do gene *18S rRNA*.

Na primeira reação a *mix* da PCR continha: 5 µl de tampão buffer sem MgCl₂ (1X PCR buffer), 31,5 µl de H₂O (1X), 3 µl de MgCl₂ (3 mM), 2,5 µl de BSA (0.1g/10ml), 2 µl de dNTPs (0,2 mM), 0,5 µl de Taq (2,5 U Taq) e 0,25 µl de cada iniciador (1 µM), 5 µl de DNA em um volume total de 45 µl de volume da reação. As reações foram incubadas no termociclador BIORAD C1000 Thermal Cycler®, as condições da amplificação foram: um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos que consiste em 94°C por 45 segundos; 59°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Na segunda reação a *mix* da PCR continha as mesmas da anterior com exceção de 35,25 µl de H₂O (1X), 1,5 µl de MgCl₂ (1,5mM) e de 3 µl de DNA dos produtos amplificados da primeira reação, com um volume de reação total de 47 µl. Para a segunda reação as condições de amplificação foram: um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30s, 58°C por 90s, 72°C por 2 minutos e extensão final foi realizada sob 72°C por 7 minutos de acordo com Santín et al. (2004).

5.1.4) Eletroforeses em gel de agarose

Os produtos amplificados da segunda PCR de *Giardia* foram avaliados por eletroforese em géis de agarose a 3,0% e 1.5% em tampão TAE com aplicação de 5µl de DNA de cada amostra e corados com 5µl de Safer Dye® utilizado para visualização de DNA. Para comprovação do tamanho dos fragmentos amplificados, utilizou-se 5µl de marcador Ladder de Safer Dye®.

Os produtos amplificados da segunda PCR para *Cryptosporidium* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TAE, sendo utilizados 5 µl do produto da PCR corados com 1 µl gel Red e 2µl de marcador e tampão de carregamento gel Pitot.

As migrações eletroforéticas da segunda PCR de *Giardia* y *Cryptosporidium* foram conduzidas a 80 mV durante 90 minutos, em tampão de corrida TBE 1x. Os géis foram visualizados e fotografados sobre luz ultravioleta, em um transiluminador – Fotodocumentador Compact Digimage Sytem UVDI (Major Science).

5.1.5) Purificação dos produtos amplificados

Após a separação dos produtos da PCR em gel de agarose a 3,0% os sedimentos foram purificados para *Giardia* com o *Kit Illustra™ GFX™ PCR DNA*, e para *Cryptosporidium* com o *kit Exo SAP-IT* de acordo com as instruções do fabricante.

5.1.6) Sequenciamento do DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas a partir do protocolo desenvolvido pelas empresas Helixxa e LaCTAD como segue: empregaram o *kit Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, após a reação a *mix* gerada foi colocada no Termociclador Veriti da Applied Biosystems para o seguinte ciclo de sequenciamento:

95°C por 4 minutos e 25 ciclos de: 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

Para a precipitação do produto de PCR proveniente da reação de sequenciamento, foi preparada uma solução de etanol absoluto, EDTA e acetato de sódio, a formamida foi depois adicionada para separação da dupla hélice, previamente à corrida no sequenciador. O sequenciamento foi obtido no equipamento ABI3500 *Genetic Analyzer* da *Applied Biosystems* Foster City, CA, USA, de acordo com o protocolo de operação do fabricante.

5.1.7) Alinhamento de DNA

Após a obtenção das sequências obtidas pela empresa LacTAD, estas foram alinhadas com o auxílio do programa Seq Man Pro (DNASTAR) e submetidas ao sistema BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*) para a comparação das sequências consenso com o banco de dados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e assim, obter-se sequências similares (Tabelas 3 e 4).

5.1.8) Posicionamento filogenético

As sequências consenso do sequenciamento "forward" e "reverse" dos locus *tpi* e *bg* foram alinhadas com o uso do algoritmo de alinhamento múltiplo MAFFT v.7 (KATO e STANDLEY, 2013) usando o método de refinamento G-INS-i para sequências com homologia global disponível no software.

As pontas não alinhadas das sequências foram removidas manualmente. A partir dos alinhamentos, o software jModelTest2 (DARRIBA et al., 2012) foi usado para estabelecer o modelo de substituição de melhor ajuste aos dados com base no "*Bayesian Information Criterion*".

Para o alinhamento do *locus tpi* e do *locus bg*, o modelo de melhor ajuste foi o TN93 + G. Para o *locus 18S rRNA* de *Cryptosporidium* o modelo de melhor ajuste foi o T92 + G.

O método Bayesiano foi usado no pacote de programas BEAST v.2 (BOUCKAERT et al., 2014) com distribuição log - normal permitindo variação da taxa entre ramos da filogenia e 6 cadeias de Markov - Monte Carlo rodadas independentemente em 10 milhões de passos cada. As sequências que serviram para as análises filogenéticas foram amostras do Peru e as outras retiradas seletivamente do banco de dados do GenBank com 100% de similaridade.

Tabela 3- Sequencias de referência de genes *tpi* e *bg* de grupos genéticos de *Giardia* obtidas do *Genbank* (NCBI) e utilizadas para o posicionamento filogenético.

	<i>tpi</i> nº de acesso	<i>bg</i> nº de acesso
AI	L02120.1*	M36728.1
AII	U57897.1	AY072723.1
	KM190784.1	
	AY228647.1*	
	KR105400.1	
	AY228647.1	
AIII	KT235929.1	
	DQ650648.1	DQ648777.1
BIII	AY228628.1*	AY072726.1
	AY228631.1*	DQ090528.1
	AY228632.1*	JF918485.1
	AY228633.1*	DQ090524.1
	AY228630.1*	AY072726.1
BIV	AY228635.1*	AY072725.1
	AY228634.1*	
D	DQ246216.1	AY545647.1
E	AY655705.1	AY072729.1
F	AF069558.1	AY647264.1
G	EU781013.1	EU769221.1
C		JF422719.1
<i>G. muris</i>	AF069565.1	AY258618.1
<i>G. ardeae</i>	AF069564.1	-
<i>G. microti</i>	AY228649.1	-

* = Grupos genéticos de *Giardia* obtidas do *Genbank* (NCBI) procedentes do Peru.

Tabela 4- Sequencias de referência de genes *18S rRNA* para espécies de *Cryptosporidium* obtidas do *Genbank* (NCBI) e utilizadas para o posicionamento filogenético.

	<i>18S rRNA</i> nº de acesso
<i>C. hominis</i>	AB830590.1
	AB830589.1
<i>C. meleagridis</i>	AF112574.1
<i>C. baileyi</i>	AY954884.1
<i>C. wrairi</i>	AF115378.1
<i>C. viatorum</i>	JX644908.1
<i>C. cuniculus</i>	FJ262724.1
<i>C. canis</i>	AB210854.1
<i>C. felis</i>	AF159113.1
<i>C. bovis</i>	AY741305.1
<i>C. aalli</i>	AY737590.1
<i>C. andersoni</i>	AY954885.1
<i>C. muris</i>	AF093498.1
<i>C. molnari</i>	HM243547.1

6) RESULTADOS

6.1) Características físicas - químicas e vazão das águas superficiais do rio Rímac:

Os resultados são apresentados separadamente por ano e pontos de coleta (P1, P2, P3). Um total de 60 amostras de água bruta do rio Rímac foram analisadas, sendo 30 delas colhidas em janeiro de 2014 e 30 em janeiro de 2015.

6.1.1) Ponto P1: Distrito de Chaclacayo - Ponte “Los Angeles”:

Neste ponto de coleta, os valores de pH apresentaram pouca variação, gerando o menor desvio padrão (Tabela 5). Também foi registrado o menor valor de turbidez comparativamente aos demais pontos no ano de 2015 (Tabelas 6 e 7).

Tabela 5- Características físicas e químicas e vazão da água bruta no Rio Rímac no ponto 1 de coleta - Chaclacayo, Lima, Peru (2014-2015).

Ponto de coleta	Coletas e datas	Turbidez (NTU)	pH	Temperatura (°C)	Vazão (m³/s)
Chaclacayo Ponte “Los Angeles” (P1)	1º (06/01/14)	163,0	7.9	23,9	32,7
	2º (09/01/14)	232,0	8.0	22,5	33,7
	3º (13/01/14)	37,0	8.2	21,4	32,6
	Média Aritmética	144,0	8.0	22,6	33,0
	Desvio padrão	98,87	0,1	1,25	0,60
	1º (08/01/15)	30,0	8.1	18,0	49,0
	2º (12/01/15)	12,4	8.1	20,7	32,0
	3º (15/01/15)	20,7	7.8	20,2	20,4
	Média Aritmética	21,0	8.0	19,6	33,8
	Desvio	8,80	0.1	1,43	14,38

6.1.2) Ponto P2: Distrito de Cercado de Lima - Ponte “Balta”:

No ano de 2014, o pH apresentou valores ao redor da alcalinidade e a turbidez apresentou maior variação quando foi registrada a maior vazão do rio; no ano 2015 foi observada a maior temperatura média da água bruta comparativamente aos demais pontos de amostragem (Tabela 6).

Tabela 6- Características físicas e químicas e vazão da água bruta no Rio Rímac no ponto 2 de coleta – Cercado de Lima, Lima, Peru (2014-2015).

Ponto de coleta	Coleta e datas	Turbidez (NTU)	pH	Temperatura (°C)	Vazão (m³/s)
Cercado de Lima Ponte “Balta” (P2)	1º (16/01/14)	45,0	8.0	24,9	31,8
	2º (20/01/14)	554,0	8.1	21,1	49,3
	3º (23/01/14)	136,0	8.0	21,1	42,4
	Média Aritmética	245,0	8.0	22,3	41,1
	Desvio padrão	271,44	0.05	2,19	8,81
	1º (19/01/15)	71,5	7.9	22,4	32,0
	2º (22/01/15)	52,4	7.8	25,8	45,0
	3º (26/01/15)	68,3	7.4	23,0	29,0
	Média Aritmética	64,0	7.7	23,7	35,3
	Desvio	10,22	0.26	1,81	8,50

6.1.3) Ponto P3: Distrito de Callao - Ponte “Faucett”:

Neste ponto, os valores de pH apresentaram pouca variação, situando-se o pH ao redor da alcalinidade (Tabela 7). Enquanto no ano de 2014, o valor médio de turbidez foi de 28,4 NTU, em 2015, registrou-se o maior valor de turbidez (800 NTU), comparativamente aos valores de turbidez nos outros pontos (Tabelas 5 e 6).

Tabela 7- Características físicas e químicas e vazão da água bruta no Rio Rímac no ponto 3 de coleta – Callao, Peru (2014-2015).

Ponto de coleta	Coleta e datas	Turbidez (NTU)	pH	Temperatura (°C)	Vazão (m³/s)
Callao Ponte “Faucett” (P3)	1º (27/01/14)	37,0	8.2	21,4	34,8
	2º (06/02/14)	32,8	8.1	21,3	34,8
	3º (10/02/14)	15,6	8.1	20,4	30,8
	Média Aritmética	28,4	8.1	21,0	33,4
	Desvio padrão	11,33	0.05	0,55	2,30
	1º (29/01/15)	800,0	7.6	24,1	27,0
	2º (02/02/15)	60,8	8.2	21,7	44,2
	3º (05/02/15)	44,2	7.9	20,7	48,8
	Média Aritmética	301,6	7.9	22,1	40,0
	Desvio	431,64	0.30	1,74	11,49

6.2) Ocorrência de protozoários patogênicos:

Consideradas as 60 amostras de água bruta colhidas no estudo, 56 amostras apresentaram positividade para *Giardia* (93,3%)e, para *Cryptosporidium*, 14 amostras foram positivas (23,3%).

6.2.1) Ocorrência de *Giardia* spp. e de *Cryptosporidium* spp. na água bruta no rio Rímac no ano de 2014:

No ano de 2014, a positividade para cistos de *Giardia* spp. detectados nas 30 amostras de água bruta do rio Rímac foi de 86,6%, consideradas 26 amostras positivas (Tabela 8). Não foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em nenhum dos pontos de coletas.

Tabela 8- Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água bruta, empregada a Técnica de Filtração de Membrana e visualização por Reação de Imunofluorescência Direta em três pontos de coleta no Rio Rímac, Lima, Peru, (2014).

Amostras de água bruta do rio Rímac	Distrito de Chaclacayo Ponte “Los Angeles” (P1)		Distrito de Cercado de Lima Ponte “Balta” (P2)		Distrito del Callao Ponte “Faucett” (P3)	
	Cistos	Oocistos	Cistos	Oocistos	Cistos	Oocistos
1	-	-	+	-	+	-
2	+	-	+	-	+	-
3	+	-	+	-	+	-
4	+	-	+	-	+	-
5	-	-	-	-	+	-
6	+	-	+	-	+	-
7	+	-	+	-	+	-
8	+	-	+	-	+	-
9	+	-	-	-	+	-
10	+	-	+	-	+	-
Porcentagem	80%	0%	80%	0%	100%	0%

+ = Positividade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.

- = Negatividade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.

6.2.2) Ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. na água bruta no rio Rímac no ano de 2015:

Ambos os protozoários foram detectados nas amostras de água bruta do rio Rímac no ano de 2015, sendo que a positividade para cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foi de 100,0% (n= 30) e 30,0% (n= 9), respectivamente (Tabela 9). Oocistos foram detectados em 20% no P1 (n= 2) e 20% no P2 (n= 2) das amostras de água, em 50% (n= 5) das amostras do ponto P3.

Tabela 9- Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água bruta, empregada a Técnica de Filtração de Membrana e visualização por Reação de Imunofluorescência Direta em três pontos de coleta no Rio Rímac, Lima, Peru, (2015).

Amostras de água bruta do rio Rímac	Distrito de Chaclacayo Ponte “Los Angeles” (P1)		Distrito de Cercado de Lima Ponte “Balta” (P2)		Distrito del Callao Ponte “Faucett” (P3)	
	Cistos	Oocistos	Cistos	Oocistos	Cistos	Oocistos
1	+	-	+	-	+	+
2	+	-	+	-	+	+
3	+	-	+	-	+	+
4	+	-	+	-	+	+
5	+	-	+	-	+	+
6	+	-	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	-
8	+	-	+	-	+	-
9	+	+	+	-	+	-
10	+	+	+	-	+	-
Porcentagem	100%	20%	100%	20%	100%	50%

+ = Positividade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.

- = Negatividade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.

6.3) Estimativa do número de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por litro de amostra e ponto de coleta:

No P1 (Chaclacayo, Ponte “Los Angeles”) o número de cistos de *Giardia* spp. por litro variou de 7,5 a 36,0, com uma estimativa média de 16,7 cistos/L, consideradas as três coletas realizadas no estudo (Tabela 10), sendo que na primeira e na segunda coleta, cistos não foram detectados em uma das três amostras colhidas quando valores médios de turbidez foram de 163 NTU e 232 NTU (Tabela 5).

No Ponto P2 (Callao, Ponte “Balta”), o número de cistos de *Giardia* por litro variou de 15,0 a 291,7, sendo esse o maior número de cistos detectado por litro de amostra

nesse ano. Nesse ponto, consideradas as três amostras/coleta, registrou-se a maior média de cistos/L por coleta (201,4) na primeira coleta (Tabela 10).

Nesse mesmo ponto, na segunda coleta, foi assinalada a maior turbidez e vazão das águas superficiais do rio Rímac, comparativamente aos pontos P1 e P3 (Tabelas 5 e 7), sendo obtida a menor média de cistos/L por coleta (20,0) para esse ponto. Consideradas as 10 amostras colhidas, em duas não foram detectados cistos de *Giardia*.

Já no ponto P3, foi observado o menor valor (média) de turbidez (15,6 NTU) sendo que o número médio de cistos/litro por coleta foi de 132,0. Cistos de *Giardia* foram detectados em todas as amostras colhidas nesse ponto, resultando na maior estimativa média de cistos por litro (110,7), considerados os três diferentes pontos de coleta no ano de 2014 (Tabela 10).

Para *Cryptosporidium*, oocistos não foram detectados nas amostras de água do rio Rímac, não sendo possível estimar o número de oocistos/L no ano de 2014.

Tabela 10- Estimativa do número de cistos de *Giardia* spp. por litro de amostra e turbidez em três diferentes pontos de coleta da água bruta do Rio Rímac (Janeiro e Fevereiro, 2014), Lima e Callao, Peru.

		CHACLACAYO Ponte “Los Angeles” (P1)			CERCADO DE LIMA Ponte “Balta” (P2)			CALLAO Ponte “Faucett” (P3)		
Nº de Colheita	Amostra	Estimativa do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por /L	Média do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por/L. por colheita.	Turbidez (Média)	Estimativa do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por /L	Média do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por/L. por colheita.	Turbidez (Média)	Estimativa do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por /L	Média do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por/L. por colheita.	Turbidez (Média)
1 ^o	1	ND			291,7			50,0		
	2	18,0	8,5	163,0	125,0	201,4	45,0	50,0	50,0	37,0
	3	7,5			187,5			50,0		
2 ^o	1	7,9			45,0			133,3		
	2	ND	5,1	232,0	ND	20,0	554,0	200,0	143,1	32,8
	3	7,5			15,0			96,0		
3 ^o	1	24,0			90,0			168,0		
	2	35,0			180,0			168,0		
	3	31,5	31,6	37,0	ND	85,0	136,0	120,0	132,0	15,6
	10	36,0			70,0			72,0		
Média		16,7		144,0	100,4		245,0	110,7		28,4

ND = Não determinado (Abaixo do limite de detecção da metodologia).

Em 2015, no P1 (Chaclacayo, Ponte “Los Angeles”) o número de cistos de *Giardia* spp. por litro variou de 30,0 a 105,0 com uma estimativa média de 51,8 cistos/L, consideradas as três coletas realizadas no estudo (Tabela 11), sendo que cistos foram detectados em todas as amostras colhidas nesse ponto; a turbidez (média) foi de 21,0 NTU. Para *Cryptosporidium*, oocistos foram detectados apenas na terceira coleta (média de 13,1 oocistos/L).

No Ponto P2 (Cercado de Lima, Ponte “Balta”), o número de cistos de *Giardia* por litro variou de 96,0 a 739,1. Nesse ponto, consideradas as três amostras/coleta, registrou-se a maior estimativa média de cistos/L (385,5) na segunda coleta (Tabela 11). Para *Cryptosporidium*, oocistos foram detectados em duas coletas (2ª e 3ª), com número médio de oocistos/L por coleta de 115,9 e 44,0, respectivamente e turbidez (média) não ultrapassando 64,0 NTU.

Já no ponto P3, foi observado o maior valor de turbidez no ano de 2015 (média de 301,6 NTU) sendo que cistos de *Giardia* foram detectados em todas as amostras colhidas nesse ponto, resultando na maior estimativa média de cistos por litro, considerados os três diferentes pontos de coleta (média de 374,5) (Tabela 11). Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em cinco amostras, sendo três amostras positivas na primeira coleta (média de: 314,6 oocistos/L) e duas, na segunda coleta (média de: 330,7 oocistos/L).

Ressalte-se que a turbidez média da água do rio Rímac na primeira coleta foi de 800 NTU e apesar desse alto valor, a maior ocorrência, no ano de 2015, de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi registrada nesse ponto (P3: Callao, Ponte “Faucett”), com uma média por coleta de 740 cisto/L e 314,6 oocistos/L, respectivamente.

Tabela 11- Estimativa do número de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. por litro de amostra e turbidez em três diferentes pontos de coleta da água bruta do Rio Rímac (Janeiro e Fevereiro, 2015), Lima e Callao, Peru.

		CHACLACAYO Ponte “Los Angeles (P1)					CERCADO DE LIMA Ponte “Balta” (P2)					CALLAO Ponte “Faucett” (P3)				
Nº de Colheita	Amostra	Estim. do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por /L	Média do número de cistos de. por/L/colheita	Estim. do número de oocistos por /L	Média de número de oocistos por /L/colheita	Turbidez (média)	Estim.do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por /L	Média de número de cistos. por/L/colheita	Estim. do número de oocistos por /L	Média do número de oocistos por L/ colheita	Turbidez (média)	Estimativa do número de cistos de <i>Giardia</i> spp. por /L	Média de número de cistos de por L/ colheita	Estim. do número de oocistos por /L	Média do número de oocistos por L/ colheita	Turbidez (média)
1º	1	35,0		ND			150,0		ND			360,0		24,0		
	2	40,0	35,0	ND	ND	30,0	150,0	200,0	ND	ND	71,5	900,0	740,0	600,0	314,6	800,0
	3	30,0		ND			300,0		ND			960,0		320,0		
2º	1	45,0		ND			260,9		ND			346,2		800,0		
	2	37,5	55,0	ND	ND	12,4	156,5	385,5	ND	115,9	52,4	653,8	405,1	192,3	330,7	60,8
	3	82,5		ND			739,1		347,8			215,4		ND		
3º	1	40,0		ND			396,0		176,0			120,0		ND		
	2	35,0		ND			480,0		ND			100,0		ND		
	3	67,5	61,8	15,0	13,1	20,7	96,0	355,0	ND	44,0	68,3	45,0	77,5	ND	ND	44,2
	10	105,0		37,5			448,0		ND			45,0		ND		
	Médi	51,8		5,25		21,0	317,7		52,3		64,0	374,5		193,6		301,6

ND = Não determinado (Abaixo do limite de detecção da metodologia).

6.4) Visualização dos cistos e oocistos nas diversas amostras de água bruta do Rio Rímac:

Cistos de *Giardia* spp. observados durante a leitura ao Microscópio de Epifluorescência apresentaram uma acentuada fluorescência na cor verde maçã brilhante, tendo sido observados nas diversas preparações somente cistos íntegros (Figura 4A), evidenciando-se a presença de conteúdo interno mediante microscopia de contraste interferencial diferencial (DIC) (Figura 4B) e quanto à marcação com DAPI, observou-se uma coloração azul do cisto, com núcleos apresentando coloração (Figura 4C) azul esbranquiçado.

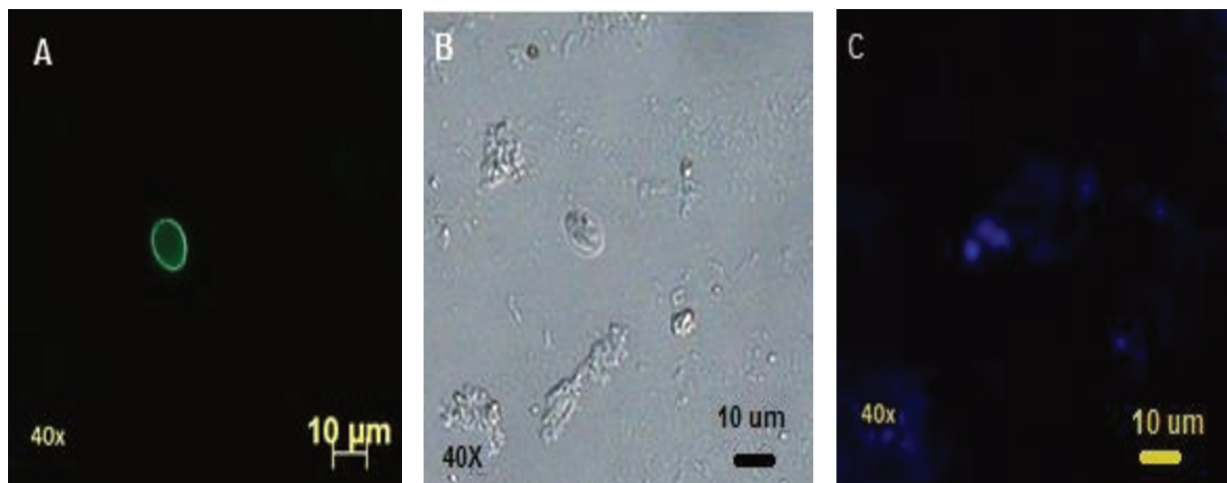


Figura 4- Cisto de *Giardia* spp. marcado com anticorpos monoclonais anti-*Giardia*, conjugados com Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Fig. 4a), visualizados mediante Contraste interferencial diferencial (DIC) (Fig. 4b) e Teste confirmatório com corante fluorogênico vital, DAPI (4'6- diamidino-2-fenilindole) (Fig. 4c) detectados em uma amostra de água bruta no Distrito de Chaclacayo - Ponte "Los Angeles" do Rio Rímac Lima, Peru (Janeiro e Fevereiro, 2014).

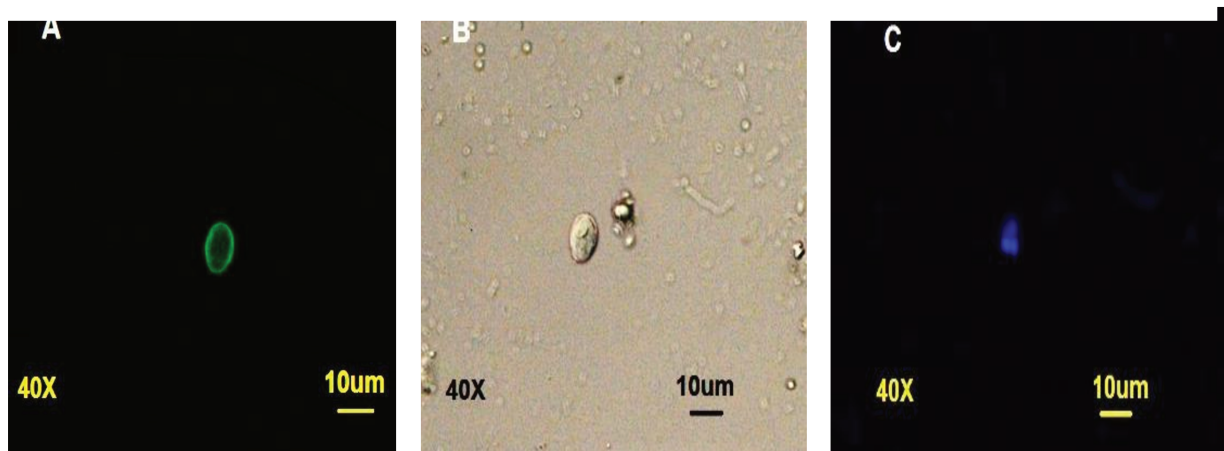


Figura 5- Cisto de *Giardia* spp. marcado com anticorpos monoclonais anti-*Giardia*, conjugados com Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Fig. 5a), visualizados mediante Contraste interferencial diferencial (DIC) (Fig. 5b) e Teste confirmatório com corante fluorogênico vital, DAPI (4'6- diamidino-2-fenilindole) (Fig. 5c) detectados em uma amostra de água bruta no Distrito de Cercado de Lima - Ponte "Balta" do Rio Rímac Lima, Peru (Janeiro e Fevereiro, 2015).

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados durante a leitura ao Microscópio de Epifluorescência apresentaram uma acentuada fluorescência na cor verde maçã brilhante e presença de sutura, tendo sido observados nas diversas preparações somente oocistos íntegros (Figura 6A), presença de conteúdo interno mediante microscopia de contraste interferencial diferencial (DIC) (Figura 6B) e quanto à marcação com DAPI, observou-se uma coloração azul intensa (Figura 6C).

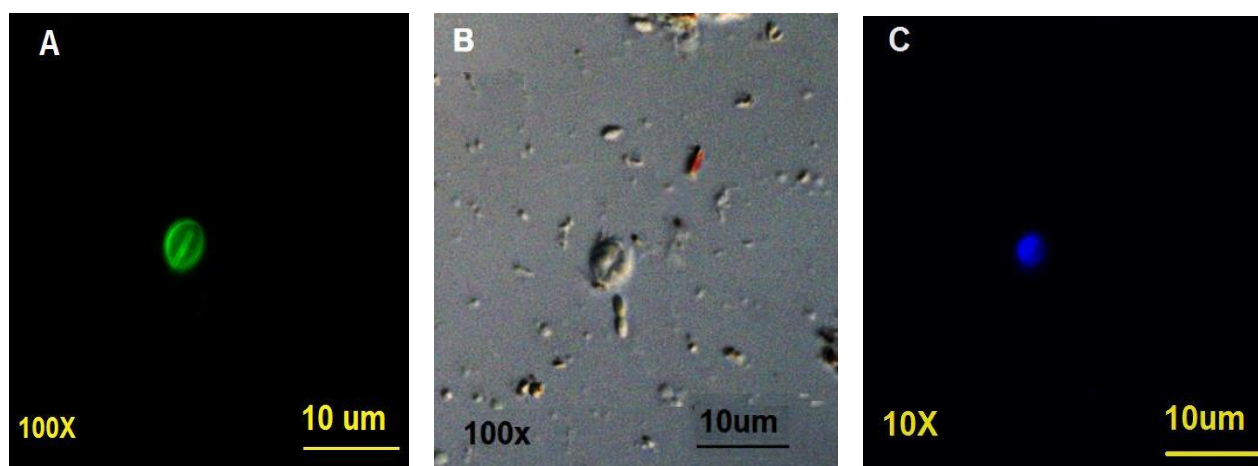


Figura 6- Oocisto de *Cryptosporidium* spp. marcado com anticorpos monoclonais anti- *Cryptosporidium*, conjugados com Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Fig. 6a), visualizado mediante Contraste interferencial diferencial (DIC) (Fig. 6b) e Teste confirmatório com corante fluorogênico vital, DAPI (4'-diamidino-2-fenilindole) (Fig. 6c) presente em uma amostra de água bruta no Distrito de Callao - Ponte "Faucett" do Rio Rímac Lima, Peru (Janeiro e Fevereiro, 2015).

5.4.1) Pesquisa dos oocistos de *Cyclospora cayetanensis* nas diversas amostras de água bruta do Rio Rímac:

Nas diferentes alíquotas examinadas por microscopia de epifluorescência, com filtros para a luz UV, não foram detectados oocistos de *Cy. cayetanensis*. As formas visualizadas não apresentaram fluorescência na cor azul brilhante, embora apresentando tamanho e formato compatíveis.

6.6) Análises Estatísticas:

No ano de 2014, em relação à comparação das médias do número de cistos de *Giardia* por litro de água bruta e os diferentes pontos de coleta, quando aplicado o teste de Tukey, evidenciou-se que são significativamente diferentes entre si (P1 difere de P2 e P3) (Tabela 12).

Tabela 12- Comparação múltipla de médias do número de cistos de *Giardia* spp. por litro de água bruta do Rio Rímac entre os diferentes pontos de coleta (P1, P2, P3) no ano 2014.

	Média [#]	N	Ponto de Coleta	Agrupamento de Tukey ⁺
Cistos/L	110,73	10	P3	A
	100,42	10	P2	A
	16,74	10	P1	B

= Ordenamento das média foi feito de forma decrescente.

+ = Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação de Tukey.

Já para o ano de 2015, a comparação entre as médias de cistos de *Giardia* detectados na água bruta do rio Rímac e os diferentes pontos de coleta, também mostrou que o Ponto P1 (Chaclacayo, Ponte “Los Angeles”) difere significativamente de P2 e P3 (Tabela 13).

Tabela 13- Comparação múltipla de médias do número de cistos de *Giardia* spp. por litro de água bruta do Rio Rímac entre os diferentes pontos de coleta (P1, P2, P3) no ano 2015.

	Média [#]	N	Ponto de Coleta	Agrupamento de Tukey ⁺
Cistos/L	374,5	10	P3	A
	317,7	10	P2	A
	51,8	10	P1	B

= Ordenamento das média foi feito de forma decrescente.

+ = Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação de Tukey.

Para *Cryptosporidium*, no ano de 2014, não foram detectados oocistos na água bruta do rio Rímac, não sendo possível realizar a comparação entre os pontos de coleta. Já para o ano de 2015, não houve diferença significativa entre os pontos de coleta e as médias de oocistos por litro de amostra (Tabela 14).

Tabela 14- Comparação múltipla de médias do número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por litro de água bruta do Rio Rímac entre os diferentes pontos de coleta (P1, P2, P3) no ano 2015.

	Média [#]	N	Ponto de Coleta	Agrupamento de Tukey ⁺
Oocistos/L	193,6	10	P3	A
	52,3	10	P2	A
	5,2	10	P1	A

= Ordenamento das média foi feito de forma decrescente.

+ = Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação de Tukey.

Em 2014, para os pontos P1 e P2 de coleta, houve uma correlação forte negativa ($r = -0.89247$) e moderada negativa ($r = -0.66370$) entre a turbidez e o número médio de cistos de *Giardia* por litro de amostra; assim, o aumento do número de cistos de *Giardia*/litro ocorre de forma inversamente proporcional aos valores de turbidez, significando que o aumento da turbidez prejudica a detecção dos cistos de *Giardia* (Tabela 15).

Também obteve-se, no ano de 2014, correlação forte negativa entre temperatura ($r = -0,72360$) e o número de cistos/L de água bruta no Ponto P1 e, entre pH ($r = -0,76576$) e cistos de *Giardia* no Ponto P2. Nesse ponto, a correlação entre o número de cistos e a vazão do rio foi forte e negativa ($r = -0,78419$) (Tabela 15).

Tabela 15- Teste de correlação de Pearson entre o número médio de cistos de *Giardia*/L e as características física e químicas da água bruta do Rio Rímac nos três pontos de coleta, Lima, Peru, 2014.

Ponto de Coleta		Turbidez (Média)	Temperatura (Média)	pH (Média)	Vazão (Média)
Chaclacayo P1		r= -0.89247 p= 0.0005	r= -0.72360 p= 0.0180	r= 0.6879 p= 0.0279	r= -0.62753 p= 0.0521
Cercado de Lima P2	Estimativa média de cistos de <i>Giardia</i> /L	r= -0.66370 p= 0.0364	r= 0.72703 p= 0.0172	r= -0.76576 p= 0.0098	r= -0.78419 p= 0.0072
Callao P3		r= -0.43973 p= 0.2035	r= -0.38423 p= 0.2730	r= -0.57217 p= 0.0839	r= -0.32876 p= 0.3537

Resultados com significância ($p < 0,05$): célula da tabela sombreada.

Em 2015, para o ponto P3, houve uma correlação moderada negativa entre o número médio de cistos por litro de amostra e turbidez ($r = -0,73595$) bem como entre cistos de *Giardia* e vazão do rio ($r = -0,79701$), enquanto verificou-se uma correlação forte positiva ($r = 0,81640$) entre a temperatura e número de cistos por litro de água bruta (Tabela 16).

Tabela 16- Teste de correlação de Pearson entre o número médio de cistos de *Giardia*/L e as características física e químicas da água bruta do Rio Rímac nos três pontos de coleta, Lima, Peru, 2015.

Ponto de Coleta		Turbidez (Média)	Temperatura (Média)	pH (Média)	Vazão (Média)
Chaclacayo P1		r= -0.34002 p= 0.3364	r= -0.43381 p= 0.2104	r= -0.30760 p= 0.3873	r= -0.47285 p= 0.1675
Cercado de Lima P2	Estimativa média de cistos de <i>Giardia</i> /L	r= -0.28596 p= 0.4232	r= 0.28878 p= 0.4184	r= -0.26304 p= 0.4628	r= -0.16850 p= 0.6417
Callao P3		r= -0.73595 p= 0.0152	r= 0.81640 p= 0.0040	r= -0.46139 p= 0.1795	r= -0.79701 p= 0.0058

Resultados com significância ($p < 0,05$): célula da tabela sombreada.

Em relação aos oocistos de *Cryptosporidium*, os mesmos somente foram detectados no ano de 2015; entretanto, não houve correlação significativa entre o número médio de oocistos/L de água bruta do rio Rímac e as características físicas e químicas da água nos diferentes pontos de coleta (Tabela 17).

Tabela 17- Teste de correlação de Pearson entre o número médio de oocistos de *Cryptosporidium*/L e as características física e químicas da água bruta do Rio Rímac nos três pontos de coleta, Lima, Peru, 2015.

Ponto de Coleta		Turbidez (Média)	Temperatura (Média)	pH (Média)	Vazão (Média)
Chaclacayo P1	Estimativa média de oocistos /L	r= -0.01983 p= 0.9566	r= 0.20431 p= 0.5713	r= -0.54821 p= 0.1009	r= -0.43973 p= 0.2035
Cercado de Lima P2		r= -0.39471 p= 0.2590	r= 0.39565 p= 0.2577	r= -0.05817 p= 0.8732	r= 0.33712 p= 0.3408
Callao P3		r= 0.29634 p= 0.4058	r= 0.41813 p= 0.2292	r= -0.03066 p= 0.9330	r= -0.38196 p= 0.2761

Resultados com significância ($p < 0,05$).

6.7) Caracterização Molecular de *Giardia* spp e *Cryptosporidium* spp.:

6.7.1) Comparação dos resultados pela Reação de Imunofluorescência Direta (RID) e *Nested* PCR:

Das 26 amostras positivas para cistos de *Giardia* pela técnica de RID nos três pontos de coleta e no ano 2014, foram positivas 25 (96,2%) para a caracterização molecular mediante a *Nested* PCR para o gene *tpi* (Tabela 18).

Tabela 18- Resultado obtido pela RID e aqueles obtido pela Técnica de PCR para as amostras de água bruta do Rio Rímac Lima, Peru (2014).

Nº de amostras	RID	<i>Nested</i> PCR (<i>tpi</i> - 530pb)
25	+	+
1	+	-
4	-	NR
Total:30		

+ = Positividade para cistos de *Giardia duodenalis*.

- = Positividade para cistos de *Giardia duodenalis*.

NR = Não foi realizada.

Em 2015, de um total de 30 amostras positivas para cistos de *Giardia* pela técnica de (RID) foram escolhidas 9 amostras com maior número de cistos /L para a caracterização molecular mediante a realização da *Nested* PCR para os genes *tpi* e *bg* (Tabela 19). A escolha de algumas amostras para serem analisadas pela *Nested* PCR foi devido à limitação de recursos.

Tabela 19- Resultado obtido pela RID e aqueles obtido pela Técnica de PCR para as amostras de água do Rio Rímac Lima, Peru (2015).

Nº de amostras	RID	<i>Nested</i> PCR (<i>tpi</i> - 530pb)	<i>Nested</i> PCR (<i>bg</i> - 511pb)
9	+	+	+
21	+	NR	NR
Total: 30			

+ = Positividade para cistos de *Giardia duodenalis*.

- = Positividade para cistos de *Giardia duodenalis*.

NR = Não foi realizada.

Mediante a técnica de RID 9 amostras foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium* das quais 3 amostras foram positivas para a caracterização molecular através da *Nested* PCR para o gene *18S rRNA* (Tabela 20).

Tabela 20- Resultado obtido pela RID e aqueles obtido pela Técnica de PCR para as amostras de água do Rio Rímac Lima, Peru (2015).

Nº de amostras	RID	<i>Nested</i> PCR (<i>18S rRNA</i> -830pb)
3	+	+
6	+	-
21	-	NR
Total: 30		

+ = Positividade para cistos de *Giardia duodenalis*.

- = Positividade para cistos de *Giardia duodenalis*.

NR = Não foi realizada.

6.7.2) Eletroforese em gel de agarose:

As amostras positivas para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. por meio da Reação de Imunofluorescência, provenientes das águas brutas do rio Rímac dos 3 pontos de coleta (P1, P2, P3) foram caracterizadas visando a amplificação do DNA a partir de fragmentos de 530 pb do gene *tpi* e fragmentos de 511 pb do gene *bg* para *Giardia duodenalis* e do fragmento de 830 pb do gene *18S rRNA* para *Cryptosporidium* (Figuras 7,8,9).

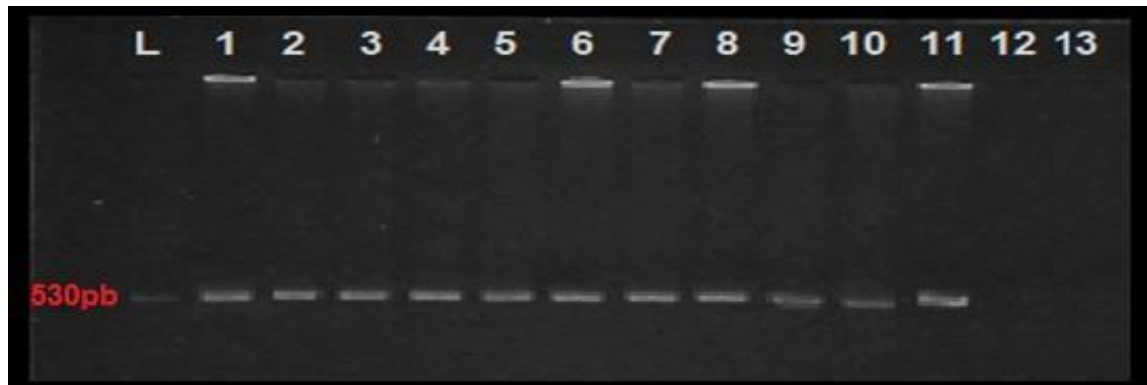


Figura 7- *Nested PCR* aplicada as amostras de água bruta no ponto P3 Ponte Faucett – Callao, Rio Rímac Lima, Peru (Jan/Fev de 2014), amplificação de DNA para fragmentos de gene *tpi* de *Giardia duodenalis* (Banda de interesse: 530pb). Visualização em gel de agarose 3% corado com *Safer Dye*, L: *Ladder* (marcador molecular: 100pd). 1-10: amostras estudadas, 11: controle positivo, 12: controle negativo, 13: controle negativo da 2ª Reação de PCR.

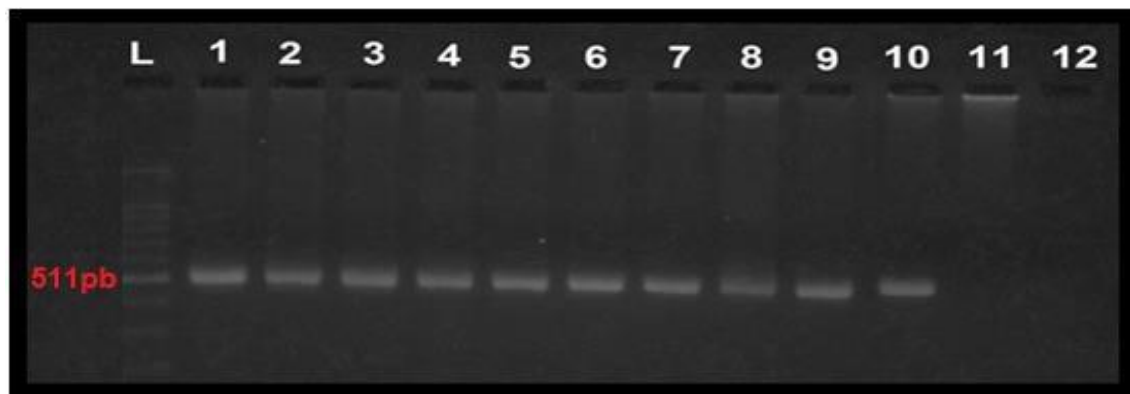


Figura 8- *Nested PCR* aplicada as amostras de água bruta no ponto P1 Ponte Los Angeles – Chaclacayo, Rio Rímac Lima, Peru (Jan/Fev de 2015), amplificação de DNA para fragmentos de gene *bg* de *Giardia duodenalis* (Banda de interesse: 511pb). Visualização em gel de agarose 3% corado com *Safer Dye*, L: *Ladder* (marcador molecular: 100pd). 1-9 amostras estudadas, 10: controle positivo, 11: controle negativo, 12: controle negativo da 2ª Reação de PCR.

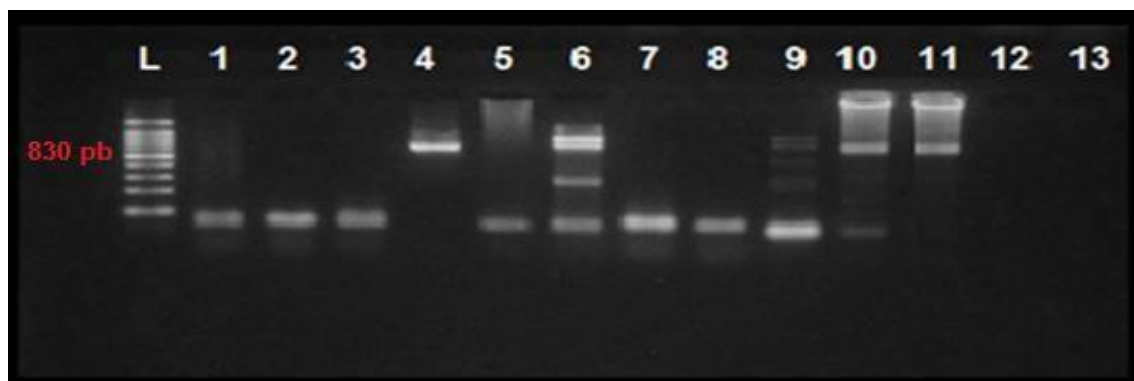


Figura 9- *Nested PCR* aplicada as amostras de água bruta no ponto P3 Ponte Faucett – Callao, Rio Rímac Lima, Peru (Jan/Fev de 2015), amplificação de DNA para fragmentos de gene *18S rRNA* de *Cryptosporidium* (Banda de interesse: 830pb). Visualização em gel de agarose 3% corado com *Gel Red*, L: *Gel Pitot* (Marcador Molecular: 100pd). 1-9 amostras estudadas, 10,11: controle positivo, 12: controle negativo, 13: controle negativo da 2ª Reação de PCR.

6.7.3) Sequenciamento para os genes *tpi*, *bg* de *Giardia* e *18S rRNA* de *Cryptosporidium*:

Das 25 amostras positivas para o gene *tpi*, foram sequenciadas 3 amostras, cada uma delas pertencente a um dos três pontos de coleta, no ano de 2014, porém apenas uma delas resultou em dados adequados. Já no ano de 2015, as 9 amostras positivas para o gene *tpi* e *bg* foram sequenciadas, as mesmas eram referentes aos 3 pontos de coleta (P1, P2, P3) (Figuras 10 e 11). No mesmo ano, as 3 amostras positivas para o gene *18S rRNA* também foram sequenciadas (Figura 12).

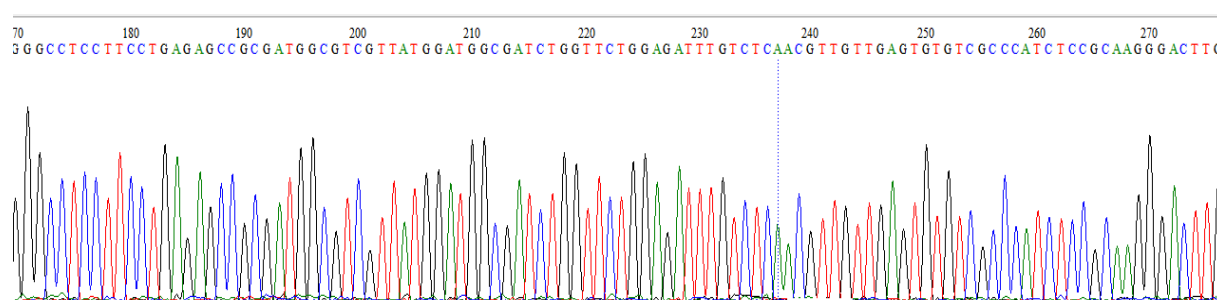


Figura 10- Cromatograma da amostra amplificada pelo gene *tpi*.

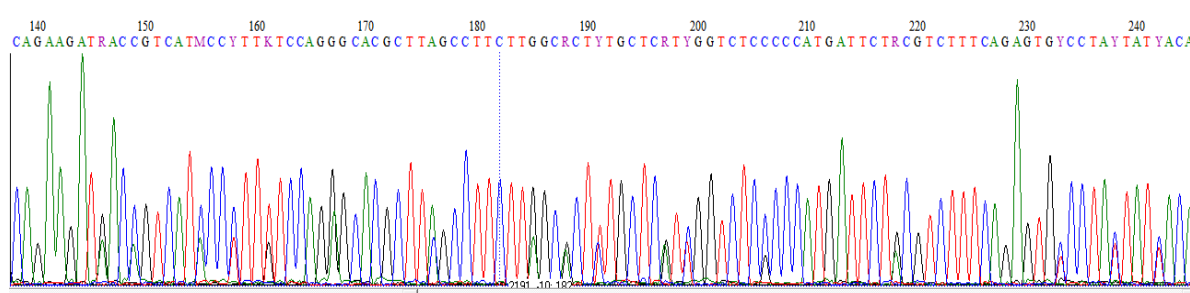


Figura 11- Cromatograma da amostra amplificada pelo gene *bg*.

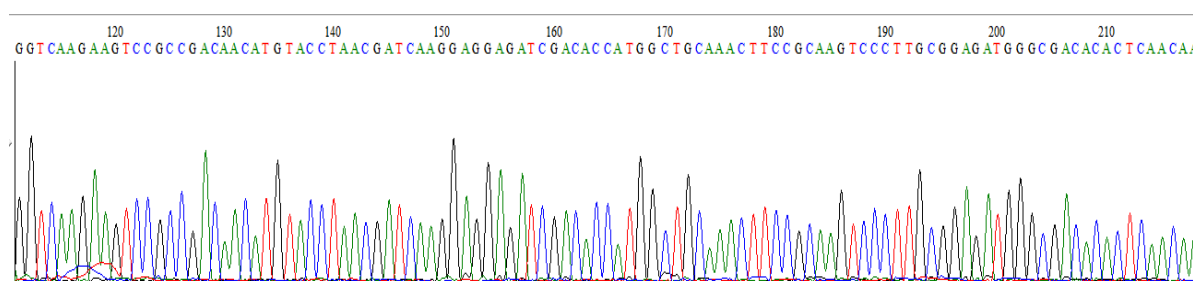


Figura 12- Cromatograma da amostra amplificada pelo gene *18S rRNA*.

6.7.4) Alinhamento dos genes *tpi*, *bg* de *Giardia* e 18S rRNA de *Cryptosporidium*:

Em relação aos grupos genéticos de *G. duodenalis*, a caracterização genética mostrou a ocorrência dos grupos genotípicos A (em 10 amostras) e B (em 1 amostra) (Tabela 21). Quando considerados os subtipos e os genes estudados, em duas amostras os resultados não foram concordantes, sugerindo múltipla fonte de contaminação (Tabela 21).

Tabela 21- Caracterização molecular das amostras de água do Rio Rímac, Lima, Peru (2014-2015) representativas dos 3 pontos de coleta, positivas para *Giardia duodenalis*.

Amostra	Origem	<i>Giardia duodenalis</i>	
		Nested – PCR (<i>tpi</i> / 530pb)	Nested – PCR (<i>bg</i> / 511pb)
(1) P1.5.6	Chaclacayo	+ (AII)	+ (BIII)
(2) P1.5.9	Chaclacayo	+ (AII)	+ (AII)
(3) P1.5.10	Chaclacayo	+ (AII)	+ (AII)
(4) P2.5.6	Cercado de Lima	+ (AII)	+ (AII)
(5) P2.5.7	Cercado de Lima	+ (AII)	+ (AII)
(6) P2.5.8	Cercado de Lima	+ (AI)	+ (AII)
(7) P3.5.2	Callao	+ (AII)	+ (AII)
(8) P3.5.4	Callao	+ (AII)	+ (AII)
(9) P3.5.5	Callao	+ (AII)	+ (AII)

+ = Positiva para *Giardia duodenalis*.

Isolados obtidos para o gene *tpi*: Grupo genético A: amostras 1-3 de P1 – Chaclacayo; amostras 4-6 de P2 - Cercado de Lima; amostras 7-9 de P3 - Callao, de Lima, Peru.

Isolados obtidos para o gene *bg*: Grupo genético B: amostra 1 de P1 – Chaclacayo; Grupo genético A: amostras 2-3 de P1 – Chaclacayo; amostras 4-6 de P2 - Cercado de Lima, amostras 7-9 de P3 - Callao, procedentes de Lima, Peru.

A caracterização genética dos oocistos de *Cryptosporidium* isolados de amostras de água do Rio Rímac, representativas dos 3 pontos de coleta, resultou em perfis compatíveis com as espécies *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, quando comparadas às sequências disponível no banco de dados GenBank (Tabela 22).

Tabela 22- Caracterização molecular das amostras de água do Rio Rímac, Lima, Peru (2014-2015) representativas dos 3 pontos de coleta, positivas para *Cryptosporidium*.

Amostra	Origem	Nested – PCR (18S rRNA /830 pb)	Espécies
(1) P1.5.10	Chaclacayo	+	<i>Cryptosporidium hominis</i>
(2) P2.5.6	Cercado de Lima	+	<i>Cryptosporidium meleagridis</i>
(3) C3.5.4	Callao	+	<i>Cryptosporidium baileyi</i>

+ = Positiva para *Cryptosporidium*.

Isolados obtidos para o gene 18S rRNA: *Cryptosporidium hominis*: amostra 1 de P1 - Chaclacayo, *Cryptosporidium meleagridis*: amostra 2 de P2 - Cercado de Lima, *Cryptosporidium baileyi*: amostra 3 de P3 - Callao, de Lima, Peru.

Os posicionamentos filogenéticos considerados os três genes estudados (*tpi*, *bg*, 18S rRNA) e ambos os protozoários estão apresentados no Anexo 1.

6) DISCUSSÃO

A cada ano mais pessoas morrem devido à água poluída, nos dias de hoje, do que pelas guerras (UNEP, 2010). A falta de água limpa é motivo de morte de 1,8 milhão de crianças com menos de 5 anos de idade, por ano. Além disso, mais da metade dos leitos dos hospitais, no mundo, é ocupado por pessoas com doenças relacionadas à água contaminada (UNEP, 2010).

Segundo o Relatório *Sick Water? – The Central Role of Wastewater Management in Sustainable Development* em 2010, cerca de 2 milhões de toneladas de resíduos são vertidos nos corpos hídricos diariamente, ao redor do mundo e, grande parte desse despejo, ocorreu nos países em desenvolvimento que lançam 90,0% das águas de esgoto sem tratamento ao ambiente, ocasionando danos e desequilíbrios ao ecossistema aquático.

Desde a fundação da cidade em 1535, Lima depende do rio Rímac para o abastecimento de água. A água é retirada diretamente do rio e indiretamente do aquífero aluvial sobre o qual a cidade foi edificada (LA TOUCHE, 2007). A qualidade da água do rio Rímac é afetada por três problemas principais: - alto teor de metais pesados devidos à mineração à montante; - contaminação a partir das descargas de esgoto para o rio e – cargas muito elevadas de sedimento (até 35 000 mg/L) resultantes de deslizamentos de terra aluvião na parte íngreme a montante; esse material é levado a jusante, na forma de aluvião, resultando em níveis elevados de sólidos em suspensão que pode persistir por várias horas (LA TOUCHE, 2007).

Lima é considerada uma megacidade com 9,5 milhões de habitantes (INE/Peru 2013) localizada em um deserto, com apenas 9 mm³/ano de chuvas. Assim, a demanda pela água em Lima aumentou proporcionalmente à expansão da cidade: de uma média de 13 m³/s em 1970, para 22 m³/s em 2007, estimando-se que alcance 37 m³/s no ano de 2020 (LA TOUCHE, 2007).

Ao longo do seu trajeto, o rio Rímac apresenta 173 pontos de lançamento de efluentes de mineração, agrícolas e domésticos que contaminam as águas destinadas

ao consumo humano (SEDAPAL/Peru, 2015). Segundo a DIGESA/Peru, calcula-se que 3.189 litros por segundo de águas residuárias não tratadas são liberadas no rio Rímac (FLORIS, 2011).

Estima-se que 1,6 milhão de pessoas vivam dentro de um raio de 5 Km das zonas de mineração. Assim, os rejeitos das minas introduzem na bacia do rio Rímac grande quantidade de arsênio, cobre e chumbo. Colhidas 14 amostras de água bruta do rio Rímac, em seu trajeto através da cidade de Lima, foram encontrados níveis de arsênico entre 14,6 a 42,5 $\mu\text{g/L}$ (média de 21,7 $\mu\text{g/L}$), sendo que todas essas amostras apresentaram arsênico em excesso em relação aos limites recomendados pela WHO (10 $\mu\text{g/L}$), em alguns casos, quatro vezes mais (GEORGE et al., 2014).

Assim, o aumento da poluição das águas tem sido um dos maiores desafios a serem enfrentados na área de saneamento no Peru. Resíduos oriundos da mineração informal, das indústrias, das áreas agrícolas e das cidades de todos os tamanhos são lançados nos corpos hídricos no país. As águas do rio Rímac, fonte de abastecimento para 77,0% da população de 8,5 milhões de pessoas em Lima, revelaram valores de coliformes totais 184 vezes maior (920.000 NMP/100 mL) que o limite máximo de 5000 NMP/100mL estabelecido nos Padrões de Qualidade Ambiental – ECA/Peru (FLORIS, 2011).

No Peru, até o momento, não há estudos com foco na prevalência e ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. nas águas do rio Rímac, nem das espécies de *Cryptosporidium* e grupos genéticos de *Giardia* que predominam nesse manancial, como verificado em pesquisa científica realizada na base de dados SCOPUS (www.scopus.com), utilizando as palavras chaves “*surface waters*”, “*Giardia*”, “*Cryptosporidium*”, “Peru”, que resultou em nenhum documento encontrado. Ressalte-se, desse modo, a importância da realização deste estudo.

As principais características para a escolha dos pontos de coleta foram a caracterização ambiental, a localização e atividade da comunidade. O primeiro ponto de coleta Rio Rímac - Ponte Los Angeles (Distrito de Chaclacayo) está situado na periferia de Lima, sendo essa a localização mais distante da desembocadura do rio Rímac em direção ao Oceano Pacífico (Figura 13). Nesse ponto, as águas do rio

Rímac sofrem contaminação proveniente da extração ilegal de minérios das partes altas e, efluentes industriais da parte mediana da bacia hidrográfica do rio Rímac. Por outro lado, ao passar as águas do rio por distritos como Morococha, San Mateo, Matucana, Chosica e Chaclacayo, estas sofrem a primeira contaminação de esgotos domésticos e efluentes agrícolas (Figuras 14 e 15).



Figura 13- P1: Rio Rímac Ponte Los Angeles – Chaclacayo, 2014.



Figura 14- Cultivos de hortaliças nas margens do Rio Rímac – Ponte Los Angeles – Chaclacayo, 2014.



Figura 15- Contaminação pela ação humana da água do Rio Rímac – Ponte Los Angeles - Chaclacayo, 2014.

Neste ponto, foi registrada na terceira coleta a estimativa média de 31,6 cistos por /L, sendo essa a maior quantidade de cistos detectada no P1. Ressalte-se que na terceira coleta registrou-se também a menor turbidez da água (37 NTU), o que facilitou a filtração, eluição e visualização da amostra (Tabela 10).

Na segunda coleta, no mesmo ponto, houve um registro de chuva na serra do Peru 48 horas antes da coleta o que contribuiu para a grande concentração de material particulado oriundos do revolvimento do sedimento e do escoamento das águas das superfícies do solo que influenciaram nos valores de turbidez (232 NTU), obtendo-se a menor estimativa média: 5,1 cistos por /L (Tabela 10). Quanto aos valores de pH das diversas amostras de água, destaca-se alcalinidade da mesma resultante do despejo de esgotos *in natura* de origem doméstica, contendo detergentes, desinfetantes (Percy López Mariluz, chefe do Laboratório USAQ-FQIQ-UNMSM), comunicação pessoal).

A temperatura média da água registrada nesse ponto foi favorável à sobrevivência de cistos e oocistos no ambiente (Tabela 5).

Em comparação aos outros pontos de coleta (P2, P3), neste ponto obteve-se a menor estimativa média total no ano 2014 (16,74 cistos por /L.) e em 2015 (51,8 cistos por /L.) (Tabelas 10 e 11). Essa é uma região pouco populosa, com parte da população suburbana trabalhando na agricultura e pecuária (INEI, 2013), ressalte-se que uma parcela significativa das moradias lançam seus esgotos diretamente no ambiente e no rio Rímac. Nesse ponto, foi detectada, no ano de 2015, a presença de oocistos de *C. hominis* e o subtipo AII de *G. duodenalis* (Tabelas 21 e 22), que apresentam um ciclo de transmissão antroponótico (FELTUS et al., 2006; ABE et al., 2003; MONIS et al., 2003).

Também detectou-se a presença do subtipo BIII de *G. duodenalis*, sendo esse achado coerente já que essa é uma região agrícola, havendo pequenas criações de animais; o subtipo BIII de *G. duodenalis* pode, em alguns casos infectar o ser humano, mas é predominante em animais (70,0% das infecções ocorrem em animais) (THOMPSON, 2004; SPRONG et al., 2009).

O segundo ponto de coleta foi escolhido no Distrito de Cercado de Lima, Rio Rímac - “Ponte Balta”, localizado em área urbana (Figuras 16,17 e 18) e uma grande concentração industrial. No ano de 2014, neste ponto foi observada a maior quantidade média de cistos de *Giardia*, na primeira coleta (201,4 cistos por /L) (Tabela 10), tendo-se registrado uma turbidez de 45 NTU. Ressalte-se que houve registros de chuvas no curso superior e médio do rio Rímac, que apresentou os valores máximos de vazão (49,3m³/s e 42,4m³/s) 48 horas antes das coletas (Tabela 6). Tal fato contribuiu para os valores máximos de turbidez registrados na segunda e terceira coletas (554 NTU e 136 NTU) (Tabela 6), respectivamente. De acordo com Rose et al. (2002) a pluviosidade é um dos principais fatores de dispersão dos protozoários no ambiente. Sabe-se que o aumento da turbidez da água influencia negativamente o desempenho das metodologias de detecção de cistos e oocistos (Smith e Nichols, 2010).

Mesmo com tais valores de turbidez, detectou-se cistos de *Giardia* (médias de 20,0 e 85,0 cistos por /L (Tabela 10), embora tal turbidez possa ter prejudicado a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* que não foram encontrados nesse ponto no ano de 2014. A água apresentou tendência alcalinidade devido a influência do desaguamento do riacho Huaycoloro no rio Rímac, com efluentes industriais principalmente têxtil, curtume causando forte alcalinização do rio (ANA/Peru,2005; DIGESA, SEDAPAL/ Peru, 2011), além do crescimento de aglomerados urbanos que acarretaram a geração de esgoto doméstico e a disposição imprópria de despejo no meio ambiente.



Figura 16- P2: Rio Rímac Ponte Balta – Cercado de Lima, 2015.



Figura 17- Vendedores ambulantes na passareira de pedestres Rio Rímac - Ponte Balta (P2) Cercado de Lima.



Figura 18- Congestionamento do tráfego nas margens do Rio Rímac - Ponte Balta (P2) Cercado de Lima.

No ano de 2015, oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados nesse ponto (P2) e a caracterização molecular confirmou a ocorrência de oocistos da espécie *C. meleagridis*; entretanto, tal achado pode sugerir a ocorrência de transmissão antroponótica dessa espécie (originalmente de aves) por tratar-se de uma região urbanizada mas, para maiores conclusões, seria necessário realizar novos estudos empregando marcadores mais específicos como a glicoproteína *gp 60*. Por outro lado, há um assentamento de etnia amazônica (índios “Ashaninka”) que realizam cultivos diversos nas margens do rio Rímac nesse ponto, além da criação de animais para consumo próprio. Assim, outra possibilidade é a ocorrência de transmissão zoonótica dentro de uma área urbana.

O terceiro ponto corresponde a uma área urbana (Província constitucional del Callao – Rio Rímac – “Ponte Faucett”) que vem apresentando um crescimento populacional significativo desde os anos 70; assim, milhares de pessoas moram nas margens do rio Rímac (INEI, 2013). Um fenômeno social que ocorre nessa região (Figuras 19, 20 e 21) é a prática de agricultura urbana e o costume de criar aves no telhado das casas como frangos, pombos e perus, que são estratégias das populações menos favorecidas economicamente para enfrentar a pobreza e insegurança alimentar. Cerca de 20,5% de esgoto doméstico e industrial é tratado (OEFA/Peru, 2010) e o restante é despejado diretamente aos rios, estas águas estão sendo utilizadas pelas populações para irrigação de hortaliças que são destinadas para uso próprio e posteriormente comercializadas, provocando riscos para a saúde humana.



Figura 19- P3: Rio Rímac Ponte Faucett – Callao, 2015.



Figura 20- Lixo á margem do Rio Rímac Ponte doFaucett – Callao, 2015.



Figura 21- Presença de aves nas margens Rio Rímac Ponte Faucett – Callao, 2015.

Enquanto no ano de 2014, a turbidez foi baixa (média: 28,4 NTU) (Tabela 10), neste ponto de coleta, no ano de 2015, a turbidez alcançou na primeira coleta 800 NTU; ressalte-se que apesar dessas condições, foram detectados uma média por coleta de 740 cistos de *Giardia*/L e 314,6 oocistos de *Cryptosporidium*/L (Tabela 11).

O aumento expressivo da turbidez nessa coleta ocorreu devido ao fenômeno de aluvião, que pode persistir por horas e contém uma grande quantidade de pedras, pedregulhos, em uma matriz de areia e material granuloso fino. Apesar dessas características, especificamente nessa coleta/amostra, foi possível visualizar oocisto com aspecto morfológico típico (Figura 6A), apresentando sutura na microscopia de epifluorescência e, sendo possível a visualização de conteúdo interno com DIC (Figura 6B); posteriormente, foi confirmado na *Nested* PCR e caracterização genética como *Cryptosporidium baileyi* o que é coerente com as características epidemiológicas citadas acima, para esse ponto.

A carga superficial influencia na adesão dos oocistos nas superfícies sólidas (DAI et al., 2004); assim, a sua diminuição auxilia a concentração de oocistos no líquido de eluição.

Ressalte-se que na técnica de filtração em membranas empregada nesse estudo, a eluição dos organismos-alvo foi realizada com o uso de uma solução de Tween 80 (0,1%), que é um surfactante cuja ação é diminuir a carga superficial dos oocistos de *Cryptosporidium*, promovendo dessa forma a recuperação de organismos no líquido de lavagem das membranas.

Para cistos de *Giardia*, a interação mais importante é a hidrofobicidade (DAI et al., 2004). Segundo Huang (2002) e Cook et al. (2006) o pH influencia nos valores de recuperação dos cistos e oocistos, pois interfere com as características de superfície da célula e também influencia a estabilidade das ligações antígeno- anticorpo. Assim, sabe-se que turbidez, temperatura e pH são os principais fatores que influenciam a detecção de cistos e oocistos em amostras de água (SMITH E NICHOLS, 2010) o que também foi evidenciado neste estudo pelo achado de correlação significativa entre turbidez, temperatura, pH, vazão e cistos de *Giardia* (Tabelas 15 e 16). A temperatura da água favorece a persistência dos cistos e oocistos no ambiente aquático (ROCHELLE e DI GIOVANNI, 2014).

De acordo com Thompson et al. (2004) e Pilai (2009) os métodos moleculares apresentam um maior grau de sensibilidade e de especificidade para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em amostra de água. A técnica permite amplificar milhares de vezes uma única molécula de DNA alvo, o que é interessante quando se trabalha com amostras ambientais nas quais predominam baixas concentrações de cistos e oocistos dado a intermitência de contaminação.

Enfatize-se, assim, que o principal propósito dessa pesquisa foi a caracterização molecular das espécies de *Cryptosporidium* e dos grupos genéticos de *Giardia*, ocorrentes nos pontos de coleta do rio Rímac, o que contribuirá para elucidar a epidemiologia dessas parasitoses no Peru. Sendo esse o objetivo principal, nesse estudo, não se realizou ensaio visando determinar a sensibilidade da metodologia de filtração em membranas.

No ponto 1 e ponto 2 foram registradas a ocorrência de outros coccídias nas águas do rio Rímac (Figura 22). A pecuária e agricultura são atividades dominantes no curso médio e superior da bacia do rio Rímac.

Oocistos de *Cy. cayetanensis* não foram detectados nas amostras analisadas mediante microscopia de fluorescência; as formas observadas exibiram cor azul opaca e similariedade com diatomáceas; assim, somente a realização futura de estudos moleculares para esse protozoário poderá confirmar tais resultados.

Os dejetos de animais representam grande risco de contaminação, sabendo que possuem diversos microrganismos patogênicos. Nas áreas rurais, a contaminação das águas pode ocorrer devido ao processo de drenagem de fezes de animais das áreas de pastagem até as nascentes; tal evento é favorecido através das enxurradas que podem transportar as formas infectantes dos protozoários, até desembocar no rio (HOWE et al., 2002).

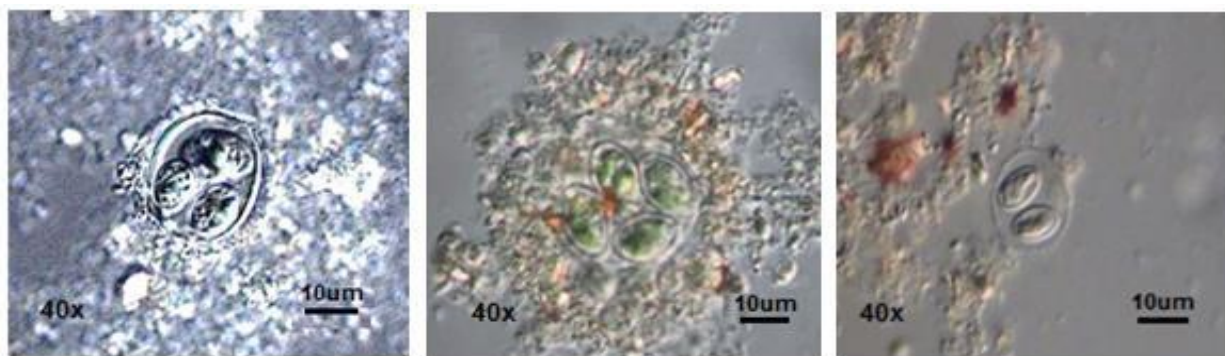


Figura 22- Oocistos de coccídias observados com solução saturada de sacarose em concentrados de amostras de água bruta de Rio Rímac, 2014.

Devido a inexistência de dados sobre a ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de água no Peru, sendo esse o primeiro relato da presença de cistos e oocistos nas águas do Rio Rímac, em Lima, visando a comparação dos dados, buscou-se informações sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em humanos e aves nesse país.

Sabe-se que há diferenças na distribuição geográfica das principais espécies de *Cryptosporidium* que acometem o ser humano entre os diferentes países (CACCIÒ e PUTIGNANI, 2014; WANG et al., 2014). Embora as espécies *C. hominis* e *C. parvum* sejam responsáveis pela maioria dos casos humanos de criptosporidiose ao redor do mundo (>90%), *C. hominis* é mais comum nos Estados Unidos, Austrália, China, Japão e na maioria dos países em desenvolvimento (CACCIÒ e PUTIGNANI, 2014).

No Peru, já foram registradas as espécies *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. canis*, *C. felis* (CAMA et al., 2003; CAMA et al., 2008; WANG et al., 2014), causando infecção humana. Assim, a ocorrência de 6 diferentes espécies de *Cryptosporidium* entre crianças e adultos peruanos vem demonstrar que o protozoário apresenta acentuada diversidade biológica no país, além da existência de múltiplas fontes de infecção já que tanto espécies zoonóticas (*C. meleagridis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. canis*, *C. felis*) como antroponótica (*C. hominis*) foram assinaladas.

C. muris foi detectado em uma mulher peruana HIV-positiva que apresentava diarreia severa e, segundo estimativas, eliminava cerca de 737.000 a 510.000 oocistos por grama de fezes (PALMER et al, 2003). Embora essa espécie não tenha sido encontrada nesse estudo, é relevante destacar o grande número de oocistos presentes nas fezes de um único paciente, o que favorece as chances de contaminação ambiental. Nas águas brutas do rio Rímac, foram detectadas três diferentes espécies do protozoário: *C. hominis*, *C. meleagridis* e *C. baileyi* tendo esse diagnóstico sido confirmado por análise do DNA e sequenciamento.

O achado de *C. hominis* e *C. meleagridis* era esperado considerando que em estudo realizado na década de 2000, entre 354 pacientes peruanos portadores de HIV/AIDS, *C. hominis* havia sido identificada como espécie predominante (67,5% dos casos), seguida por *C. meleagridis*, com 12,6% dos casos, sendo que *C. parvum* ocorreu em 11,3% dos episódios de infecção (CAMA et al., 2003). Os autores ressaltaram que 43% dessas infecções foram associadas com diarreia.

Entretanto, destaque-se que nas águas do rio Rímac oocistos de *C. parvum* não foram detectados, provavelmente porque dois dos pontos de coleta (P2 e P3)

situavam-se em área urbana, densamente populosa, no trajeto do rio Rímac ao longo de Lima, com condições epidemiológicas favorecendo a ocorrência da espécie *C. hominis* que apresenta um ciclo antroponótico (CACCIÓ, 2014).

A espécie *C. meleagridis* causa infecções não somente entre pacientes HIV+ mas também em pessoas imunocompetentes (WANG et al., 2014). Alguns estudos relataram uma alta porcentagem de infecções causadas por essa espécie, variando de 11,3% no nordeste da Índia, 20,0% entre pacientes HIV+ na Tailândia, sendo no Peru encontrada uma prevalência de 8,2% a 8,8% entre crianças e pacientes portadores de HIV, respectivamente (CAMA et al., 2007, CAMA et al., 2008). *C. meleagridis* exibe alta prevalência entre adultos portadores de HIV e crianças no Peru (CAMA et al., 2003; 2007; 2008).

Em um estudo de coorte de doença diarreica, durante o período de 3 anos (1995-1998), conduzido em Pampas de San Juan de Miraflores (Lima), *Cryptosporidium* foi detectado em 109 episódios de diarreia, em um total de 156 episódios de infecção, dos quais foi possível realizar a genotipagem em 127 isolados. *C. hominis* foi a espécie predominante (70%), seguida por *C. parvum* (13,0%), *C. meleagridis* (8,0%), *C. canis* (2,0%) e *C. felis* (5,0%).

Os autores desse estudo longitudinal concluíram que pelo fato da criptosporidiose ser uma parasitose endêmica no Peru, as crianças estão constantemente expostas ao protozoário, na existência de diferentes vias de transmissão. Também foram relatados casos de infecção concomitante envolvendo *C. hominis* e *C. canis* (1 caso) e *C. hominis* e *C. meleagridis* (1 caso).

Outra espécie detectada nas águas brutas do rio Rímac foi *C. baileyi*. É pouco provável que a presença de oocistos de *C. baileyi* na água bruta possa significar o envolvimento de infecção humana já que na literatura há apenas um caso clínico de infecção por essa espécie em um indivíduo severamente imunocomprometido.

C. baileyi foi, nesse estudo, detectado no Ponto P3, uma região onde há pequenas criações de aves nos telhados das casas. Sabe-se que *C. baileyi* é a

espécie do protozoário mais comumente detectada em aves de granjas, aves de estimação e aves silvestres (RYAN, 2010; WANG et al., 2014), tendo um espectro de pelo menos 31 diferentes espécies de aves como hospedeiro (WANG et al., 2012).

Assim, como as famílias peruanas menos favorecidas apresentam o hábito de criar galinhas no telhado das casas, para consumo próprio, é possível que oocistos dessa espécie estejam amplamente dispersos no ambiente em Lima, ocorrendo com frequência elevada nas águas do rio Rímac, próximo à sua desembocadura no oceano Pacífico.

Quando comparadas às sequências obtidas nesse estudo com a sequência consenso, para *C. meleagridis* houve similaridade (100%, 473pb) com sequência dessa espécie encontrada na China, isolada de aves poedeiras na faixa etária de 31 a 120 dias de idade (WANG et al., 2010).

Assim, pode-se especular a possibilidade da infecção humana ocorrer devido ao contato direto com galinhas infectadas; por outro lado, como *C. meleagridis* também é muito frequente entre indivíduos que são portadores de HIV no Peru, outra hipótese que pode ser tecida é a transmissão antroponótica dessa espécie que é originalmente um protozoário de animais. Porém, estudos moleculares de sub-tipagem devem ser realizados para confirmação dessas hipóteses. Ressalte-se que infecção humana com transmissão zoonótica de *C. meleagridis* foi relatada em uma fazenda na Suécia (SILVERLAS et al., 2012).

Para *C. hominis*, houve similaridade (100%; 473 pb) com sequência detectada em crianças na Espanha. Em relação a *C. baileyi*, o fragmento amplificado e sequenciado mostrou 100% de similaridade (798 pb) com sequências dessa espécie detectada em 273 pássaros (codornas) na China (XIAO et al., 2012).

Somente dois (A e B) dos 8 grupos genéticos de *Giardia duodenalis* são responsáveis pela maioria das infecções humanas. Em estudo sobre a ocorrência de cistos de *Giardia* em alpacas realizado na região de Puno, comprovou-se que os animais estavam infectados com o grupo genético A, principalmente aqueles com até

um mês de idade (positividade variando de 37,9% a 24,3%) conforme a região geográfica enquanto para os animais com mais de 2 anos, a positividade foi de 1,3% a 2,2%. Ressalte-se que o grupo genético A foi detectado nas três regiões estudadas (Cuzco, Huancavelica e Puno). O genótipo AI foi predominante em duas localidades delas já o genótipo AII foi relacionado apenas a 3 casos e o genótipo E, ocorreu em 9 animais. Não houve associação com diarreia (GÓMEZ- COUSO et al., 2012; GÓMEZ- PUERTA et al., 2014).

Em outra investigação, examinadas 845 crianças peruanas, 210 apresentaram positividade para o protozoário. Empregando o estudo molecular do gene *gdh*, foi verificado a ocorrência dos grupos genéticos A (e sub-genótipo AI e AII) bem como B (e sub-genótipo BIV) entre as crianças, destacando-se que houve predominância do subtipo AI. Todas as amostras contendo o grupo genético A eram diarreicas. Quando realizado o estudo molecular, das 210 crianças com exame fecal positivo, foi possível amplificar bandas de 432 pb em 16 amostras, sendo 09 do sub-genótipo AI, 6 do sub-genótipo BIV e um como AII (PEREZ CORDÓN et al., 2008).

Assim, é possível afirmar que a infecção por *Giardia duodenalis* é comum entre as crianças peruanas. Nas águas do rio Rímac, os estudos moleculares revelaram o predomínio do sub-genótipo AII (8+/9 amostras que amplificaram quando empregado o gene *tpi* e 8+/9 ao ser utilizado o marcador *bg*); esse sub-genótipo é predominantemente humano, isso é, apresenta um ciclo antroponótico, cuja manutenção ocorre ou pelo contato inter-pessoal, como em creches, ou pelo despejo de esgotos não tratados em corpos hídricos que são utilizados para abastecimento público. Ressalte-se que dois dos pontos de coleta selecionados nesse estudo incluem regiões urbanas densamente habitadas.

Os estudos moleculares proporcionaram maior conhecimento sobre a epidemiologia e entendimento da diversidade genética de *Cryptosporidium* e *Giardia*, a partir de oocistos e cistos isolados de amostras de água do rio Rímac.

Por outro lado, os achados de ocorrência de cistos e oocistos nas águas brutas do Rio Rímac, Lima, refletem, indiretamente, que as parasitoses intestinais ainda constituem um problema significativo de Saúde Pública no Peru.

7) CONCLUSÕES

As conclusões desse estudo foram:

- No ano de 2014, cistos de *Giardia duodenalis* foram detectados nas águas brutas do rio Rímac, Peru, nos três pontos de coleta, enquanto oocistos de *Cryptosporidium* não foram observados nas diversas amostras analisadas.
- No ano de 2015, ambos os protozoários foram detectados nas amostras de água bruta do rio Rímac, nos três pontos de coleta.
- De um total de 60 amostras analisadas, a positividade geral para cistos de *Giardia* foi de 93,3% (56 amostras positivas) e, para *Cryptosporidium* foi de 15% (9 amostras).
- No ponto de coleta P3 (Distrito del Callao- Ponte Faucett), nos anos de 2014 e 2015, foi detectado o maior número de cistos de *Giardia* por litro (110,7 cistos por /L) e (374,5 cistos por /L), respectivamente.
- O maior número médio de oocistos de *Cryptosporidium*/L foi registrado no ponto de coleta P3 (Distrito del Callao- Ponte Faucett), no ano de 2015.
- A metodologia de filtração em membranas permitiu a detecção de cistos de *Giardia* mesmo em condições de elevada turbidez da amostra (800 NTU).
- Para cistos de *Giardia*, verificou-se a existência de correlação negativa com turbidez, temperatura, pH e vazão nos pontos P1.
- Para oocistos de *Cryptosporidium* não houve correlação significativa entre o número de oocistos e as características físicas e químicas da água nos diferentes pontos de coleta.
- Oocistos de *Cyclospora cayetanensis* não foram detectados nas diversas amostras de água, mediante a observação de autofluorescência natural.

- A técnica de PCR apresentou alto grau de sensibilidade e especificidade para gene *tpi* e *bg* para *Giardia*.
- Três subtipos de *Giardia duodenalis* foram detectados nas águas brutas do rio Rímac, Lima, a saber: subtipo AI, subtipo AII e subtipo BIII.
- O sub-tipo AII de *Giardia duodenalis* foi predominante nos pontos de coleta estudados, sugerindo a ocorrência de um ciclo antroponótico de transmissão da giardiose em Lima.
- O sub-tipo BIII de *G. duodenalis* ocorreu em um ponto de coleta onde também detectou-se o sub-tipo AII sugerindo múltiplas fontes de contaminação das águas do rio Rímac, em Lima.
- O sub-tipo AI de *G. duodenalis* ocorreu em apenas um ponto de coleta, sugerindo a ocorrência de transmissão zoonótica.
- Três espécies de *Cryptosporidium* foram detectadas nas águas brutas do rio Rímac, em Lima, a saber: *Cryptosporidium hominis* (no ponto de coleta P1), *Cryptosporidium meleagridis* (no ponto de coleta P2) e *Cryptosporidium baileyi* (no ponto de coleta P3).
- Os achados de espécies zoonóticas (como *C. meleagridis*) e de espécies antroponóticas (como *C. hominis*), além do registro da espécie *C. baileyi*, evidenciam a diversidade biológica do protozoário e sua ampla disseminação no ambiente em Lima, Peru.

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, N., ISEKI, M. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from ferrets in Japan. **Parasitol. Res.**, v.89, p.422-424, 2003

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev**, v.3, n.3, p.447-475, 2001.

ADISS, D.G., LENCHERICH, E.J. Hypokalemic myopathy induced by *Giardia lamblia*. **N Engl J Med**. v.330, n.1, p.66-67, 1994.

ADL, S. M., SIMPSON, A. G. B., FARMER, M. A., ANDERSEN, R.A., ANDERSON, O.R., BARTA, J. R., BOWSER, S. S., BRUGEROLLE, G., FENSOME, R. A., FREDERICQ, S., JAMES, T. Y., KARPOV, S., KUGRENS, P., KRUG, J., LANE, C. E., LEWIS, L. A., LODGE, J., LYNN, D. H., MANN, D. G., MCCOURT, R. M., MENDOZA, L., MOESTRUP, O., MOZLEY-STANDRIDGE, S. E., NERAD, T. A., SHEARER, C. A., SMIRNOV, A.V., SPIEGEL, F. W., TAYLOR, M. F. J. R. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **J Eukaryot Microbiol**, v.52, n.5, p.399-459, 2005.

ADL, S.M., SIMPSON, A.G., LANE, C.E., LUKEŠ, J., BASS, D., BOWSER, S.S., BROWN, M.W., BURKI, F., DUNTHORN, M., HAMPL, V., HEISS, A., HOPPENRATH, M., LARA, E., LE GALL, L., LYNN, D.H., MCMANUS, H., MITCHELL, E.A., MOZLEY-STANRIDGE, S.E., PARFREY, L.W., PAWLOWSKI, J., RUECKERT, S., SHADWICK, R.S., SCHOCH, C.L., SMIRNOV, A., SPIEGEL, F.W. The revised classification of eukaryotes. **J Eukaryot Microbiol.**, v 59, n.5, p.429-493, 2012.

AGUAFONDO. Inversión en agua para Lima. Sé parte del cambio. (2013) <http://www.aquafondo.org.pe/aprende.php> Acesso em Setembro de 2015.

ALDEYARBI, H.M., KARANIS, P. The Ultra-Structural Similarities between *Cryptosporidium parvum* and the Gregarines. **J Eukaryot Microbiol**, 2015.

ANA (Autoridad Nacional del Agua). (2014). Más de 4 mil millones de dólares se necesitan para recuperar el Río Rímac. Disponível em: [http://www.ana.gob.pe/sala-de-prensa/noticias/noticias-2014/m%C3%A1s-de-4-mil-millones-de-d%C3%B3lares-se-necesitan-para-recuperar-el-r%C3%ADo-r%C3%ADmac-\(1\).aspx](http://www.ana.gob.pe/sala-de-prensa/noticias/noticias-2014/m%C3%A1s-de-4-mil-millones-de-d%C3%B3lares-se-necesitan-para-recuperar-el-r%C3%ADo-r%C3%ADmac-(1).aspx) Acesso em Maio de 2015.

ALDOM, J.E., CHAGLA, A.M. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Letters Appl Microbiol**, v.20, n.3, p.186-187, 1995.

ALONSO, J.L., AMORÓS I., CANIGRAL I. Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, p.1203-1211, 2011.

ANA (Autoridad Nacional del Agua /Peru). (2005). Disponível em: <http://www.ana.gob.pe/media/472457/quebrada%20huaycoloro%20abril%20-%20noviembre%202005.pdf> Acesso em Outubro de 2015.

ANDRADE NETO, J.L., ASSEF, M.C.V. Criptosporidiose e Microsporidiose. In: Tratado de Infectologia. Veronesi, R. p. 1170-1172, 1996.

ASSIS, D. C., RESENDE, D. V., SANTOS, M. C., CORREIA, D., OLIVEIRA-SILVA, M. B. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 55, n.3, p. 149-154, 2013.

BALDURSSON, S., KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004 - 2010. **Water Res**, v.45, n.20, p. 6603-6614, 2011.

BARER, M. R., WRIGHT, A. E. A review: *Cryptosporidium* and water. **Lett. Appl Microbiol**, v.11, p. 271–277, 1990.

BARWICK, R. S., LEVY, D. A., CRAUN, G. F., BEACH, M. J., CALDERON, R. L. Surveillance for waterborne-disease outbreaks: United States, 1997–1998. **MMWR Morb. Mortal Wkly Rep**, v.49, n.4, p.1-21, 2000.

BETANCOURT, W. Q., ROSE, J.B. Drinking water treatment process for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Vet Parasitol**, v.126, p.219-234, 2004.

BETANCOURT, W. Q., DUARTE, D.C., VÁSQUEZ, R.C., GURIAN, P. L. *Cryptosporidium* and *Giardia* in tropical recreational marine waters contaminated with domestic sewage: Estimation of bathing-associated disease risks. **Mar Pollut Bull**, v.85, n.1, p. 268–273, 2014.

BLANSHARD, C., JACKSON, A.M., SHANSON, D.C., FRANCIS, N., GAZZARD, B.G. Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. **Q J Med**, v.85, n.307-308, p. 813–823, 1992.

BOUCKAERT, R., HELED, J., KÜHNERT, D., VAUGHAN, T., WU, CH., XIE, D., SUCHARD, M.A., RAMBAUT, A., DRUMMOND, A.J. BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS Comput Biol**, v.10, n.4, 2014.

BOUZID, M., HUNTER, P.R., CHALMERS, R.M., TYLER, K.M. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. **Clin Microbiol Rev**, v.26, n.1, p. 115-134, 2013.

BURET, A.G., MITCHELL, K., MUENCH, D.G., SCOTT, K.G. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: Effects of epidermal growth factor. **Parasitology**, v. 125, p. 11-19, 2002.

BUTTLER, B.J., MAYFIELD, C.I. *Cryptosporidium* spp. A review of the organism, the disease, and implications for managing water resources. Waterloo Centre for Groundwater Researcher. Ontario: Canada, 1996.

CACCIÒ, S.M., THOMPSON, R.C.A., MCLAUCHLIN, J., SMITH, H.V. Unravelling. *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends Parasitol**, v.21, n.9, p. 430–437, 2005.

CACCIÒ, S.M., RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 160, n.2, p. 75-80, 2008.

CACCIÒ, M., PUTIGNANI, L. Epidemiology of Human Cryptosporidiosis. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, New York, USA, p.43–70, 2014.

CAMA, V.A., BERN, C., SULAIMAN, I.M., GILMAN, R.H., TICONA, E., VIVAR, A., KAWAI, V., VARGAS, D., ZHOU, L., XIAO, L. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. **J Eukaryot Microbiol**, v.50, n.531-533, 2003.

CAMA, V.A., ROSS, J.M., CRAWFORD, S., KAWAI, V., CHAVEZ-VALDEZ, R., VARGAS, D., VIVAR, A., TICONA, E., NAVINCOPA, M., WILLIAMSON, J., ORTEGA, Y., GILMAN, R.H., BERN, C., XIAO, L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. **J Infect Dis**, v. 196, n.5, p.684-691, 2007.

CAMA, V.A., BERN, C., ROBERTS, J., CABRERA, L., STERLING, C.R., ORTEGA, Y., GILMAN, R.H., XIAO, L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. **Emerg Infect Dis**, v.14, n.10, p. 1567–1574, 2008

CAREY, C.M., LEE, H., TREVORS, J.T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Res**, v.38, p.818-862, 2004.

CARDOSO, L.S., BERINO, E., DEUS, A.B.S., DE LUCA, S.J. *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas e efluentes: estado da arte. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitaria y Ambiental, Cancún. Anais, Cancún: Aidis, p. 8, 2002.

CARLSON, D.W., FINGER, D.R. Beaver fever arthritis. **J Clin Rheumatol**, v.10, n.2, p. 86-88, 2004.

CAVALIER-SMITH T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. **Eur J Protistol**, v.50, n.5, p. 472-495, 2014.

CDC (Centre Disease Control and Prevention). (2015). Parasites - *Cryptosporidium* Illness & Symptoms. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/illness.html>
Acesso em Junho de 2015.

CDC (Centre Disease Control and Prevention). (2013). Parasites – *Cyclospora cayetanensis* Illness & Symptoms. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/disease.html> Acesso em Dezembro de 2015.

CDC (Centre Disease Control and Prevention). (2015). Parasites – *Cyclospora cayetanensis*. Outbreak Investigations. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/outbreaks/index.html> Acesso em Dezembro de 2015

CDC (Centre Disease Control and Prevention). (2015). Parasites - *Giardia* Illness & Symptoms. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/illness.html> Acesso em Maio de 2015.

CELLO, J.P. Acquired immunodeficiency syndrome cholangiopathy: spectrum of disease. **Am J Med**, v. 86, n.5, p. 539–546, 1989.

CERVELLÓ, A., ALFARO, A., CHUMILLAS, M.J. Hypokalemic myopathy induced by *Giardia lamblia*. **N Engl J Med**, v.329, n.3, p.210-211, 1993.

CHALMERS, R.M., DAVIES, A.P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. **Exp Parasitol**, v.124, n.1, p.138-146, 2010.

CHECKLEY, W., EPSTEIN, L.D., GILMAN, R.H., BLACK, R.E., CABRERA, L., STERLING, C.R. Effects of *Cryptosporidium parvum* infection in Peruvian children: growth faltering and subsequent catch-up growth. **Am J Epidemiol**, v.148, n.5, p. 497–506, 1998.

CHECKLEY, W., EPSTEIN, L.D., GILMAN, R.H., CABRERA, L., BLACK, R.E. Effects of acute diarrhea on linear growth in Peruvian children. **Am J Epidemiol**, v.157, n.2, p.166-75, 2003.

CHEN, X.M., LEVINE, S.A., TIETZS, P., KRUEGER, E., MCNIVEN, M.A., JEFFERSON, D.M. *Cryptosporidium parvum* is cytopathic for cultured human biliary epithelia via an apoptotic mechanism. **Hepatology**, v.28, n.4, p.906-913, 1998.

CHEN, X.M., GORES, G.J., PAYA, C.V., LA RUSSO, N.F. *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand- dependent mechanism. **Am J Physiol**, v.277, p.599-608, 1999.

CHEN, X.M., LA RUSSO, N.F. Cryptosporidiosis and the pathogenesis of AIDS cholangiopathy. **Seminars in Liver Disease**, v.22, n.3, p. 277–289, 2002.

CHEUN, H.I., KIM, C.H., CHO, S.H., MA, D.W., GOO, B.L., NA, M.S., YOUN, S.K., LEE, W.J. The first outbreak of giardiasis with drinking water in Korea. **Osong Public Health Res**, v.4, n.2, p.89-92, .2013.

CHO, E.J., YANG, J.Y., LEE, E.S., KIM, S.C., CHA, S.Y., KIM, S.T., LEE, M.H., HAN, S. H., PARK, Y.S. A Waterborne Outbreak and Detection

of *Cryptosporidium* oocysts in Drinking Water of an Older High-Rise Apartment Complex in Seoul. **Korean J Parasitol**, v.51, n.4, p.461-466, 2013.

CLAVEL, A., ARNAL, A.C., SANCHEZ, E.C., CUESTA, J., LETONA, S., AMIGUET, J.A., CASTILLO, F.J., VAREA, M., GOMEZ-LUZ, R. Respiratory cryptosporidiosis: case series and review of literature. **Infection**, v.24, n.5, p.341-346, 1996.

CLANCY, J.L. (Ed). New Approaches for Isolation of *Cryptosporidium* and *Giardia*. American Water Works Association, 2000.

COUPE, S., SARFATI C., HAMANE, S., DEROUIN, F. Detection of *Cryptosporidium* and Identification to the species level by Nested PCR and restriction fragment length polymorphism. **J Clin Microbiol**, v.43, n.3, p.1017-1023, 2005.

COOPER, M.A., ADAM, R.D., WOROBEY, M., STERLING, C.R. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. **Curr Biol**, v.17, n.22, p.1984-1988, 2007.

COOPER, M.A., STERLING, C.R., GILMAN, R.H., CAMA, V., ORTEGA, Y., ADAM, R.D. Molecular analysis of household transmission of *Giardia lamblia* in a region of high endemicity in Peru. **J Infect Dis**, v.202, n.11, p. 1713-1721, 2010.

COOK, N., PATON, C.A., WILKINSON, N., NICHOLS, R.A.B., BARKER, K., SMITH, H.V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. **Int J Food Microbiol**, v.109, n.3, p.215-221, 2006.

CORDÓN, P.G., SOLDAN, C.P.O., VÁSQUEZ, V.F., SOTO, V. JR., BORDES, S.L., MORENO, S.M., ROSALES, M.J. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. **Parasitol Res**, v. 103, n.2, p. 459-465, 2008.

CORSI, A., NUCCI, C., KNAFELZ, D., BULGARINI, D., DI IORIO, L., POLITO, A., DE RISI, F., ARDENTI, MORINI. F., PAONE, F.M. Ocular changes associated with *Giardia lamblia* infection in children. **Br J Ophthalmol**, v.82, n.1, p.59-62, 1998.

CORSO, P.S., KRAMER, M.H., BLAIR, K.A., ADDISS, D.G., DAVIS, J.P., HADDIX, A.C. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerg Infect Dis**, v.9, p 426-431, 2003.

CRAUN, G.F., HUBBS, S.A., FROST, F., CALDERON, R.L., VIA, S.H. Waterborne Outbreaks of Cryptosporidiosis. **J Am Wat Work Assoc**, v.90, p. 81-91, 1998.

CURRENT, W.L., GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. **Clin Microbiol Rev**, v.4, n.3, p.325-358, 1991.

DAI, X., BOLL, J., HAYES, M.E., ASTON, D.E. Adhesion of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to solid surfaces: the role of surfaces charge and hydrophobicity. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 34, p. 259 -263, 2004.

D'ANTONIO, R.G., WINN, M.D., TAYLOR, J., GUSTAFSON, T.L., CURRENT, W.L., RHODES, M.M., GARY, G.W., ZAJAC, R.A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Ann Inter Med**, v.103, n.6, p.886-888, 1985.

DARRIBA, D., TABOADA, G. L., DOALLO, R., POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nat Methods**, v. 9, n.8, p.772-772, 2012.

DAVIS, J.J., HEYMAN, M.B., FERRELL, L., KERNER, J., KERLAN, R., THALER, M.M. Sclerosing cholangitis associated with chronic cryptosporidiosis in a child with congenital immunodeficiency disorder. **Am J Gastroenterol**, v.82, p. 1196–1202, 1987.

DAWSON, D.J., MADDOCKS, M., ROBERTS, J., VIDLER, J.S. Evaluation of recovery of *Cryptosporidium parvum* oocysts using membrane filtration. **Letters Appl Microbiol**, v.17; p.276-279, 1993.

DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **Int J Food Microbiol**, v.103, n.2, p. 207–227, 2005.

DE OLIVEIRA, D., DE SOUSA, T., ALVES, J.A., PEREIRA, S.S. O uso da água e o ecoturismo: desenvolvimento econômico, sustentabilidade e preservação. Portal Âmbito Jurídico. com.br. Rio Grande, XIV, n. 91, ago 2011. Disponível em: http://ambitojuridico.com.br/site/?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=10154&revista_caderno=5 Acesso em Abril de 2015.

DE SILVA, M.B., SCHAFER, S., KENDALL, SCOTT. M., ROBINSON, B., HILLS, A., BUSER, G.L., SALIS, K., GARGANO, J., YODER, J., HILL, V., XIAO, L., ROELLIG, D., HEDBERG, K. Community wide cryptosporidiosis outbreak associated with a surface water-supplied municipal water system - Baker City, Oregon, 2013. **Epidemiol Infect**, v.12, p.1-11, 2015.

DIGESA/SEDAPAL Evaluación de muestras de agua del río Rímac y principales afluentes con datos 15 / 16 de junio 2011. Disponível em: <http://www.digesa.minsa.gob.pe/depa/rios/2011/Rio-Rimac-junio-2011-DIGESA-SEDAPAL-1.pdf>. Acesso em Maio 2015.

DI GIORGIO, C.L., GONZALEZ, D.A, HUITT, C.C. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using EPA method 1623. **Appl Environ Microbiol** v.68, p.5952-5955, 2002.

DI PRISCO, M.C., HAGEL, I., LYNCH, N.R., JIMÉNEZ, J.C., ROJAS, R., GIL, M., MATA, E. Association between giardiasis and allergy. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 81, n.3, p.261-265, 1998.

DOWBOR, L., TAGNIN, R.A. Administrando a água como se fosse importante: gestão ambiental e sustentabilidade. São Paulo: Ed. Senac; 2005.

DOWSETT, J.F., MILLER, R., DAVIDSON, R., VAIRA, D., POLYDOROU, A., CAIRNS, S.R., WELLER, I.V. Sclerosing cholangitis in acquired immunodeficiency

syndrome. Case reports and review of the literature. **Scand J Gastroenterol**, v.23, n.10, p.1267-1274, 1998.

DUNAND, V.A., HAMMER, S.M., ROSSI, R., POULIN, M., ALBRECHT, M.A., DOWEIKO, J.P., DEGIROLAMI, P.C., COAKLEY, E., PIESSENS, E., WANKE, C.A. Parasitic sinusitis and otitis in patients infected with human immunodeficiency virus: report of five cases and review. **Clin Infec Dis**, v.25, n.2, 267–272, 1997.

EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos), (1995a). ICR Protozoan Method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by fluorescent antibody procedure. <http://www.epa.gov/microbes/documents/pvid.pdf> Acesso em Setembro de 2015.

EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos), (1995b). Information Collection Requirements Ruler – Protozoa and Enteric Virus Sample Collection Procedures <http://www.epa.gov/microbes/documents/icrsamp.pdf> Acesso em Setembro de 2015.

EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos), Office of Water. Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. EPA 815-R-05-001. US Environmental Protection Agency. Washington DC, EEUU, (2005a).

EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos), Office of Water. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. EPA 815-R-05-002. US Environmental Protection Agency. Washington DC, EEUU, (2005b).

EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos), Office of Water. Method 1623.1: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. EPA 816-R-12-001. US Environmental Protection Agency. Washington DC, EEUU, 2012

FARTHING, M.J.G. Clinical aspects of human cryptosporidiosis. In: Petry, F. (Ed.), *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis. Contributions in Microbiology*, vol. 6. Karger, Basel, p. 50–74, 2000.

FAYER, R. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boca Raton: CRC Press, p. 251, 1997.

FAYER, R., MORGAN, U., UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol**, v.30, N.12-13, p.1305-1322, 2000.

FELTUS, D.C., GIDDINGS, C.W., SCHNECK, B.L., MONSON, T., WARSHAUER, D., MCEVOY, J.M. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. **J Clin Microbiol**. v.44, p.4303-4308, 2006.

FENG, F., XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clin Microbiol Rev**, v.24, n.1, p.110-140, 2011.

FLORIS, V. The Challenges for improving the water and sanitation sector em Peru. Proceedings of the 2011 **World Environmental and Water Resources Congress**, pp.2665-2671, 2011.

FOX, K.R., LYTLE, D.A. Milwaukee's crypto outbreak: investigation and recommendations. **J AWWA**, v.88, p.87-94, 1996.

FRANCO, R.M.B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Rev Panam Infectol**, v.9, n.4, p.36-43, 2007.

FRANCO, R.M.B., ROCHA-EBERHARDT R., CANTUSIO NETO R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** v.43, n.2, p.109-111, 2001.

FRANCO, R.M., B; HACHICH, E.M., SATO, M.I.Z., NAVEIRA, R.M.L., CAMPOS, M. M., CANTÚSIO, R., CERQUEIRA, D.A., BRANCO, N., LEAL,D.A.G. Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. **Epidemiol Serv Saude**, Brasília, v. 21 n. 2, p. 233-242, 2012.

FRICKER, C.R., CRABB, J.H. Waterborne Cryptosporidiosis: Detection Methods and Treatment Options. **Adv Parasitol**, vol. 40, p.242-278, 1998.

GALBRAITH, N. S., BARRETT, N. J., STANWELL-SMITH, R. Water and disease after Croydon: A review of water-borne and water associated disease in the UK 1937–86. In IWES Summer, 1987.

GARDNER, T.B., HILL, D.R. Treatment of giardiasis. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.1, p. 114 – 128, 2001.

GASSER, R.B, O'DONOGHUE, P. Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*. **Int J Parasitol**, v.29, p.1379-1413, 1999.

GEMILIANO, P.V. Análise comparativa de Legislações relativas à qualidade da água para consumo humano na América do Sul. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.INEI (Instituto Nacional de Estatística e Informática). (2014). Población peruana asciende a 30 millones 814 mil personas. Disponível em: <http://www.inei.gob.pe/prensa/noticias/poblacion-peruana-asciende-a-30-millones-814-mil-personas-7641/> Acesso em Janeiro de 2015.

GENOVESE, A., SPADARO, G., SANTORO, L., GASPARO, R. P., ONORATI, A. M., MARONE, G. Giardiasis as a cause of hypokalemic myopathy in congenital immunodeficiency. **Int J Clin Lab Res**, v.26, n.2, p132-135, 1996.

GEORGE, C.M., SIMA, L., JAHUIRA, A., M.H., CHECKLEY, W., GILMAN, R.H. Arsenic exposure in drinking water: An unrecognized health threat in Peru. **Bulletin of the World Health Organization**, v.92, p.565-572, 2014.

GIACOMETTI, A., CIRIONI, O., ANTONICELLI, L., D'AMATO, G., SILVESTRI, C., DEL PRETE, M.S., SCALISE, G. Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic skin diseases. **J Parasitol**, v.89, n.3, p.490-492, 2003.

GOMEZ-PUERTA, L.A., LOPEZ-URBINA, M.T., ALARCON, V., CAMA, V., GONZALEZ, A.E., XIAO, L. Occurrence of *Giardia duodenalis* assemblages in alpacas in the Andean region. **Parasitol Int**, v.63, n.1, p. 31-34, 2013.

GÓMEZ-COUSO, H., ORTEGA-MORA, L.M., AGUADO-MARTÍNEZ, A., ROSADIO-ALCÁNTARA R., MATURRANO-HERNÁNDEZ, L., LUNA-ESPINOZA, L., ZANABRIA-HUISA, V., PEDRAZA-DÍAZ S. Presence and molecular characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. **Vet Parasitol**, v.187, n.3-4, p 414-420, 2012.

GRACZYK, T., SUNDERLAND, D., AWANTANG, G., MASHINSKI, Y., LUCY, F., GRACZYK, Z., CHOMICZ, L., BREYSSE, P. Relationships among bather density, levels of human waterborne pathogens, and fecal coliform counts in marine recreational beach water. **Parasitol Res**, v.5, p. 1103-1108, 2010.

GRIFFITHS, J.K., THEODOS, C., PARIS, M., TZIPORI, S. The gamma interferon gene knockout mouse: a highly sensitive model for evaluation of therapeutic agents against *Cryptosporidium parvum*. **J Clin Microbiol**, v. 36, n.9, p. 2503-2508, 1998.

GUY, R.A., PAYMENT, P., KRULL, U.J., HORGAN, P.A. Real-Time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. **Appl Environ Microbiol**, v.69, n.9, p.5178-5185, 2003.

HALLIEZ, M.C., BURET, A.G. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. **World J Gastroenterol**, v.19, n.47, p. 8974-8985, 2013.

HANEVIK, K., HAUSKEN, T., MORKEN, M.H., STRAND, E.A., MORCH, K., COLL, P., HELGELAND, L., LANGE, N. Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. **J Infect**, v.55, n.6, p.524-530, 2007.

HINRICHSEN, S.L. Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.358-364, 2005.

HONIBERG, B. M., BALAMUTH, W., BOVEE, E. C., CORLISS, J. O., GOJDICS, M., HALL, R. P., KUDOUDO, R. R., LEVINE, N. D., LOEBLICH, A. R., WEISER, J., ENRICH, D. H. A revised classification of the Phylum Protozoa. **J Protozool**, v.11, n.1, p.7-20, 1964.

HSU, B.M., HUANG, C., HSU, Y.F., JIANG, G.Y., HSU, C.L. Evaluation of two concentration methods for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. **Water Res**. v.35, n.2, p.419-424, 2001.

HSU, B.M. Evaluation of analyzing methods for *Giardia* and *Cryptosporidium* in a Taiwan water treatment plant. **J. Parasitol.** v.89, n.2, p.369-371, 2003.

HSU, B.M., HUANG, C. Influence of ionic strength and pH on hydrophobicity and zeta potencial of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Colloids Surf A: Physicoch Eng Asp**, v.201, p.201-206, 2002.

HUNTER, P.R., NICHOLS, G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. **Clin Microbiol.** v.15, n.1, p.145-54, 2002.

INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). (2013). 11 de Julio Día Mundial de la Población. Disponível em: http://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1095/libro.pdf Acesso em Setembro de 2015

JAKUBOWSKI, W.S., BOUTROS, S., FABER, F., FAYER, F., GHORSE, W., LECHEVALLIER, M., ROSE, J., SHAUB, S., SINGH, A., STERWART, M. Environmental methods for *Cryptosporidium*. **J AWWA** v 88; p. 107-21; 1996.

JENKINS, M.B., EAGLESHAM, B.S., ANTHONY, L.C., KACHLANY, S.C., BOWMAN, D.D., GHORSE, W.C. Significance of wall structure, macromolecular composition, and surface polymers to the survival and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl Environ**, v.76, n.6, p.1926-1934, 2010.

JEX, A.R.; GASSER, R.B. Current State of Genomics and Systems Biological Research. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, New York, USA, p.339, 2014.

KAMINSKY, R.G. Cuerpos similares a cyanobacteria asociados con diarrea en Honduras. **Rev Med Hondur**, v.59, n.179-182, 1991.

KARANIS, P., KOURENTI, C., SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a world wide review of outbreaks and lessons learnt. **J Wat Health**, v.5, n.1, p.1-38, 2007.

KARP, G. Biologia Celular e Molecular, 3ª Edição - Ed Manole, Barueri - São Paulo, 2005.

KATOH, K., STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol Biol Evol**, v.30, n.4, p.772-780, 2013.

KITAJIMA, M., HARAMOTO, E., BRANDON, C.I., GERBA, C.P. Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at waste water treatment plants in Arizona. **Sci Total Environ**, v.484, p.129-136, 2014.

KOTLOFF, K.L., NATARO, J.P., BLACKWELDER, W.C., NASRIN, D., FARAG, T.H., PANCHALINGAM, S., WU, Y., SOW, S.O., SUR, D.; BREIMAN, R.F.,

FARUQUE, A.S., ZAIDI, A.K., SAHA, D., ALONSO, P.L., TAMBOURA, B., SANOGO, D., ONWUCHEKWA, U., MANNA, B., RAMAMURTHY, T., KANUNGO, S., OCHIENG, J.B., OMORE, R., OUNDO, J.O., HOSSAIN, A., DAS, S.K., AHMED, S., QURESHI, S., QUADRI, F., ADEGBOLA, R.A., ANTONIO, M., HOSSAIN, M.J., AKINSOLA, A., MANDOMANDO, I., NHAMPOSSA, T., ACACIO, S., BISWAS, K., O'REILLY, C.E., MINTZ, E.D., BERKELEY, L.Y., MUHSEN, K., SOMMERFELT, H., ROBINS-BROWNE, R.M., LEVINE, M.M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v.382, n. 9888, p. 209–222, 2013.

LALLE, M., POZIO, E., CAPELLI, G., BRUSCHI, F., CROTTI, D., CACCIÒ, S.M. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **Int J Parasitol**, v.35, n.2, p.207-13. 2005.

LA TOUCHE, M.C. D. The Water Resources of Lima, Peru. **Wat Environ J**, v.11, p.437-439, 2007.

LAURENT, F., KAGNOFF, M.F., SAVIDGE, T.C., NACIRI, M., ECKMANN, L. Human intestinal epithelial cells respond to *Cryptosporidium parvum* infection with increased prostaglandin H synthase expression and prostaglandin E2 and F2 alpha production. **Infect Immun**, v.66, n.4, p.1787–1790, 1998.

LENZI, H. L.; VANNIER-SANTOS, M.A. Interface Parasito-Hospedeiro: Coabitologia: uma visão diferente do fenômeno parasitismo. In: COURA, J.R. (Org.). Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.v.1.

LEVINE, N. D., CORLISS, J. O., COX, F. E., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B. M., LEEDALE, G. F., LOEBLICH III, A. R., LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E. G., PAGE, F. C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J., WALLACE, F. G. A newly revised classification of the Protozoa. **J Protozool**, v.27, n.1, p. 37-58, 1980.

LEVINE, N.D. Phylum II: Apicomplexa Levine (1970).in LEE,J.J., HUNTER,S.H., BOVEE,E.C (eds) Illustrated Guide to the Protozoa, Society of Protozoologists, Lawrence,KS,pp.322-374.

LEETZ, A.S., SOTIRIADOU, I., ONGERTH, J., KARANIS, P. An evaluation of primers amplifying DNA targets for the detection of *Cryptosporidium* spp. using *C. parvum* HNJ-1 Japanese isolate in water. **Parasitol Res**, v.101, p.951, 2007.

LI, N., XIAO, L., ALDERISIO, K., ELWIN, K., CEBELINSKI, E., CHALMERS, R., SANTIN, M., FAYER, R., KVAC, M., RYAN, U., SAK, B., STANKO, M., GUO, Y., WANG, L., ZHANG, L., CAI, J., ROELLIG, D., FENG, Y. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. **Emerg Infect Dis**, v.20, n.2, p.217-224, 2014.

LI, X., PEREIRA, M.D., LARSEN, R., XIAO C., PHILLIPS, R., STRIBY, K., MCCOWAN, B., ATWILL, E.R. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species. **Int J Parasitol Parasites Wildl.** v.4, n.3, p.343-350, 2015.

MANSFIELD, L S. AND A. A. GAJADHAR. 2004. *Cyclospora cayetanensis* a food- and waterborne coccidian parasite. **Vet Parasitol**, v.126, n.73–90, 2004.

MASON, B.W., CHALMERS, R.M., CARNICER-PONT, D., CASEMORE, D.P. A *Cryptosporidium hominis* outbreak in north-west Wales associated with low oocyst counts in treated drinking water. **J Water Health**, v.8, p. 299-310, 2010.

MCLAUCHLIN, J., AMAR, C.F.L., PEDRAZA-DÍAZ, S., MIELI-VERGANI, G., HADZIC, N., DAVIES, E.G. Polymerase chain reaction-based diagnosis of infection with *Cryptosporidium* in children with primary immunodeficiencies. **Pediatr Infect Dis J**, v. 22, n.4, 329–335, 2003.

MELICHEROVÁ, J., ILGOVÁ, J., KVÁČ, M.; SAK, B., KOUDELA, B., VALIGUROVÁ, A. Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. **Parasitology**, v.141, n.2, p. 287-303, 2014.

MELONI, B.P., LYMBERY, A.J., THOMPSON, R.C. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. **J Parasitol**, v.81, n.3, p.368-383, 1995.

MESSNER, M. LT2 Round 1: *Cryptosporidium* matrix spike recovery, 2011
<http://water.epa.gov/lawregs/rulesregs/sdwa/lt2/upload/lt2round1cryptomatrix.pdf>
 Acesso em Junho de 2015

MEYER, W. T. Epidemic Giardiasis. A continued elusive entity. **Rocky Mt Med J**, v.70, p.48-49, 1973.

MEYER, A., TODT, C., MIKKELSEN, N.T., LIEB, B. Fast evolving *18S rRNA* sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. **BMC Evol Biol**, v.10, n.10, p.70, 2010.

MEZZARI, A., ANTUNES, B., WIEBBELLING, A.M.P. *Cyclospora cayetanensis*, um novo protozoário a ser pesquisado. **Rev Ass Med Brasil**, v.45, n.4, p.4, 1999.

MINAM (Ministerio de Ambiente del Perú). (2010). La situación del agua en el Perú. Disponível em: <http://cambioclimatico.minam.gob.pe/manejo-de-la-tierra-y-el-agua/manejo-del-agua/la-situacion-del-agua-en-el-peru/> Acesso em Maio de 2015.

MINAM (Ministerio de Ambiente del Perú). (2013). Perú es tercer país más vulnerable del mundo al cambio climático. Disponível em: <http://www.minam.gob.pe/cambioclimatico/por-que-el-peru-es-el-tercer-pais-mas-vulnerable-al-cambio-climatico/>

<http://cambioclimatico.minam.gob.pe/adaptacion-al-cc/por-que-adaptarnos/la-vulnerabilidad-del-peru/> Acesso em Maio de 2015.

MINAM (Ministerio del Ambiente). (2011). Plan nacional de acción ambiental. Planaa - Perú 2010 – 2021. Disponível em: http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/08/plana_2011_al_2021.pdf Acesso em Abril de 2015.

MINAG (Ministerio de Agricultura) e ANA (Autoridad Nacional del Agua). (2010) <http://www.ana.gob.pe/media/361223/1%20estudio%20hidrol%C3%B3gico%20cuenca%20r%C3%ADmac%20-%20volumen%20i%20-%20texto%20-%20final%202010.pdf> Acesso em Janeiro de 2015.

MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. Cryptosporidiosis Surveillance - United States, 2011–2012. Giardiasis Surveillance United States, 2011–2012. Surveillance summaries / Vol. 64 / No.3 May 1, 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss6403.pdf> Acesso em Outubro de 2015.

MONIS, P. T., ANDREWS, R. H., MAYRHOFER, G., EY, P.L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. **Mol Biol Evol**, v.16, n.9, p.1135–1144, 1999.

MONIS, P.T., THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium* and *Giardia*- zoonose: fact or fiction? **Infect Genet Ev**, v.3, n.4, p.233-244, 2003.

MONIS, P.T., ANDREWS, R.H., MAYRHOFER. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infect Genet Evol**, v.3, p.29-38, 2003.

MONIS, P.T., CACCIO, S.M., THOMPSON, R.C. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends Parasitol**, v. 25, n.2, p. 93-100, 2009.

NEIL, W.A., BROOKS, N., BENTHAM, G., AGNEW, M., ERIKSEN. New indicators of vulnerability and adaptive capacity. W. Tyndall Centre for Climate Change Research 2004. Disponível em: http://www.ccrasa.com/library_1/22826%20-%20New%20indicators%20of%20vulnerability%20and%20adaptive%20capacity.pdf Acesso em Abril de 2015.

NIEMINSKI, E.C., SCHAEFER, F.W., ONGERTH, J.E. Comparison of Two Methods for Detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Water. **Appl Environ Microbiol**, v.61, n.5, p.1714–1719, 1995.

NYGARD, K., SCHIMMER, B., SOBSTAD, O., WALDE, A., TVEIT, I., LANGE LAND, N., HAUSKEN, T., AAVITSLAND, P. A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non-endemic urban area. **BMC Public Health**, v.25, n.6, p.141, 2006.

O'CONNOR, R.M., SHAFFIE, R. Cryptosporidiosis in patients with HIV/AIDS, **AIDS**, v. 25, p. 549–560, 2011.

OEFA (Organización de Evaluación e Fiscalización Ambiental). (2014). Disponível em: https://www.oefa.gob.pe/?wpfb_dl=7827 Acesso em Outubro de 2015.

OMS (Organização Mundial da Saúde) e UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância). (2014). Progress on drinking water 2014 update and Sanitation. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2014/jmp-report/en/ Acesso em Abril de 2015.

OMS (Organização Mundial da Saúde). (2014). Preventing diarrhoea through better water, sanitation and hygiene. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/150112/1/9789241564823_eng.pdf?ua=1/&ua=1 Acesso em Maio de 2015.

OMS (Organização Mundial da Saúde). (2015). World Health Statistics 2015. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170250/1/9789240694439_eng.pdf?ua=1&ua=1 Acesso em Fevereiro de 2015.

ONU (Organização das Nações Unidas). (2014). World Population Prospects: The 2015 Revision. Key Findings and Advance Tables. Disponível em http://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/Files/Key_Findings_WPP_2015.pdf Acesso em Janeiro de 2015.

ONGERTH, J.E., STIBBS, H.H. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. **Appl Environ Microbiol**, v. 53, n.4, p.672-676, 1987.

ORTEGA, Y.R., STERLING, C.R., GILMAN, R.H., CAMA, V.A., DIAZ, F. *Cyclospora species* - A new protozoan pathogen of humans. **N. Engl J Med**, v. 328, p. 1.308-1312, 1993.

PALMER, C.J., XIAO, L., TERASHIMA, A., GUERRA, H., GOTUZZO, E., SALDÍAS, G., BONILLA, J.A., ZHOU, L., LINDQUIST, A., UPTON, S.J. *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Perú. **Emerg Infect Dis**, v.9, p1174-6, 2003.

PAPE, J.W. Cyclospora infection in adults infected with HIV: clinical manifestations, treatment, and prophylaxis. **Ann Intern Med**, v.121, p 654-657, 1994.

PERÉZ CORDÓN, G., CORDOVA, O., VARGAS, F., VELASCO, J.R., SEMPERE, B.L., SÁNCHEZ, M., ROSALES, M.J. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. **Parasitol Res**, v.103, n.2, p.459-465, 2008.

PETTOELLO, M. M., GIARDINO. I., MAGLI. A., DI MARTINO. L., GUANDALINI, S. Intestinal giardiasis associated with ophthalmologic changes. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.11, n.2, p.196-200, 1990.

PILAI, D.R. *Cryptosporidium* sp. Rabbit genotype, a newly identified human pathogen. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 5, p. 829-830, 2009.

POXLEITNER, M.K., CARPENTER, M.L., MANCUSO, J.J., WANG, C.J., DAWSON, S.C., CANDE, W.Z. Evidence for Karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. **Science**, v.319, n.5869, p.1530-1533, 2008.

PULESTON, R.L., MALLAGHAN, C.M., MODHA, D.E., HUNTER, P.R., NGUYEN-VAN-TAM, J.S., REGAN, C.M., NICHOLS, G.L., CHALMERS, R.M. The first recorded outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium cuniculus* (formely rabbit genotype), following a water quality incident. **J Water Health**, v.12, p. 41–50, 2014.

RYAN, U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Exp Parasitol**, v.124, n. 1, p.113-120, 2010.

RENDTORFF, R.C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. **Am J Hyg**, v. 59, n.2, p.209-220, 1954.

RENGIFO-HERRERA, C., ORTEGA-MORA, L.M., GÓMEZ-BAUTISTA, M., GARCÍA-PEÑA, F.J., GARCÍA-PÁRRAGA, D., PEDRAZA-DÍAZ, S. Detection of a novel genotype of *Cryptosporidium* in Antarctic pinnipeds. **Vet Parasitol**, v.191, n.1-2, p.112–118, 2013.

ROBERTSON, L. In: Lujan, H.D; **Svård, S.** (Eds.), *Giardia A Model Organism Disease*. Springer, New York, USA, p.47, 2011.

RHODES, E. R., VILLEGAS, L. F., SHAW, N. J., MILLER, C., VILLEGAS, E. N. A Modified EPA Method 1623 that Uses Tangential Flow Hollow-fiber Ultrafiltration and Heat Dissociation Steps to Detect Waterborne *Cryptosporidium* and *Giardia spp.* **J. Vis. Exp**, v.9, n.65, p. 3791-4177, 2012.

ROCHELLE, P.A. Detection of protozoa in environmental water samples. In: Rochelle PA (ed) *Environmental molecular microbiology: protocols and applications*. Horizon Scientific Press, Wymondham, p 91, 2001.

ROCHELLE, P.A., DI GIOVANNI, G. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, New York, USA, p.497-499, 2014.

ROEFER, P. A., MONSCVITZ, J. T., REXING, D. J. The Las Vegas cryptosporidiosis outbreak. **J AWWA**, v. 88, p. 95-106, 1996.

ROSE, J.B. Occurrence and Control of *Cryptosporidium* in Drinking Water. In: *Drinking Water Microbiol.* New York: Springer-Verlag, p. 294-321, 1990.

ROSE, J.B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. **Annu Rev Public Health**, v.18, p. 135-161, 1997.

ROSE, J.B., HUFFMAN, D.E. GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS Microbiol Rev**, v. 26, n.2, p.113-123, 2002.

RYAN, U., SIMONE, M., CACCIÒ, S.M. Zoonotic potential of *Giardia*. **Int J Parasitol**, v.43, n.12-13, p. 943-956, 2013.

RYAN, U., CACCIÒ, S.M. Zoonotic potential of *Giardia*. **Int J Parasitol**, v.43, n.12-13, p.943–956, 2013.

RYAN, U.M., XIAO, L. Taxonomy and molecular taxonomy. In: CACCIÒ, S.M., WIDMER, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, New York, USA, p.1–22, 2014.

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

RYAN, U., HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research. **Int J Parasitol**, v.45, n.6, p.367-373, 2015.

RYU, H., MAYER, B., ABBASZADEGAN, M. Applicability of quantitative PCR for determination of removal efficacy of enteric viruses and *Cryptosporidium* by water treatment processes. **J Water Health**, v.8, n.1, p.101-107, 2010.

SATO, M.I., GALVANI, A.T., PADULA, J.A., NARDOCCI, A.C., LAURETTO, M.S., RAZZOLINI, M.T., HACHICH, E.M. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Sci Total Environ**, v.442, p. 389-396, 2013.

SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the neglected diseases initiative. **Trends Parasitol**, v. 22, n.5, p. 203-8, 2006.

SENAMHI (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología) e MINAM (Ministerio del Ambiente). (2014). “El Fenómeno El Niño en el Perú”. Disponível em: http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2014/07/Dossier-El-Ni%C3%B1o-Final_web.pdf e http://www.senamhi.gob.pe/pdf/estudios/ninio_lambayeque2.pdf Acesso em Fevereiro de 2015.

SHIKANI, H., WEISS, L. M. Host-parasite Interaction. In: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, New York, USA, p.399-401, 2014.

SIMONE, M. CACCIÒ, S.M., LALLE, *Giardia*. Inc: XIAO, L., RYAN, U., FENG, Y. Biology of Foodborne Parasites. CRC Press, Food Microbiology, pp. 177-178, 186-188, 2015.

SEDAPAL (Servicio de Agua Potable y Alcantarillado de Lima). Disponível em: <http://www.equilibrium.com.pe/Sedapal.pdf> Acesso em Setembro de 2015.

SEDAPAL(a) (Servicio de Agua Potable y Alcantarillado de Lima) Viceministro de Construcción y Saneamiento: "rio Rímac recibe 173 descargas en su recorrido" Nota de prensa 16 -2015. Acesso em Outubro de 2015.

SILVERLÅS, C., MATTSSON, J.G., INSULANDER M, LEBBAD M. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. **Int J Parasitol**, v.42, n.11, p.963-967, 2012.

SMITH, H.V., ROSE, J.B. Waterborne Cryptosporidiosis: current status. **Parasitol Today**, v.14, n.1, p. 14-22, 1998.

SMITH, H.V., NICHOLS, R.A.B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Exp Parasitol**, v.124, p.61-79, 2010.

SOLO-GABRIELE, H.; NEUMEISTER, S. US outbreaks of Cryptosporidiosis. **J AWWA**, v.88, p.76-86, 1996.

SPRONG, H., CACCIÒ, S.M., VAN DER GIESSEN, J.W. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLOS Negl Trop Dis**, v.3, n.12, p.1-12, 2009.

STAGGS, S.E., BECKMAN, E.M., KEELY, S.P. The applicability of TaqMan based quantitative real-time PCR Assays for detecting and enumerating *Cryptosporidium* spp. oocysts in the Environment. **PLoS One**, v.8, n.6, 2013.

STROUP, S.E., ROY, S., MCHELE, J., MARO, V., NTABAGUZI, S., SIDDIQUE, A., KANG, G., GUERRANT, R.L., KIRKPATRICK, B.D., FAYER, R., HERBEIN, J., WARD, H., HAQUE, R., HOUP, E.R. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using scorpion probes. **J Med Microbiol** v.55, n.9, p. 1217-1222, 2006.

SULAIMAN, I.M., FAYER, R., BERN, C., GILMAN, R.H., TROUT, J.M., SCHANTZ, P.M., DAS, P., LAL, A.A., XIAO, L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerg Infect Dis**, v.9, n.11, p.1444-14452, 2003.

THOMPSON, R.C. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **Int J Parasitol**, n 12-13, p.1259-1267, 2000.

THOMPSON, R. C., MONIS, P. T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Adv Parasitol**, v. 58, p. 69–137, 2004.

THOMPSON, R. C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet Parasitol**. v.126, p. 15-35, 2004.

THOMPSON, R.C., PALMER, C.S., O' HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Vet J**, v.177, n.1, p.18-25, 2008.

TZIPORI, S., WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbiol Infect**, v.4, p.1047-1058, 2002.

TORTORA, G. J, FUNKE, B. R, CASE, C. L. Microbiologia. 8^a ed. Porto Alegre: Artmed p.894, 2007.

UNEP (United Nations Environment Programme). Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development. Disponível em: http://www.unep.org/pdf/SickWater_screen.pdf Acesso em Outubro de 2015.

UN-WATER (2015). Report on the Achievements during the International Decade for Action 'Water for Life' 2005-2015. Disponível em <http://www.unwater.org/publications/publications-detail/en/c/282474/> Acesso em Junho de 2015.

UN-WATER (2015a). International Decade for Action "Water for life 2005-2015" Water quality. Disponível em: <http://www.un.org/waterforlifedecade/quality.shtml> Acesso em Junho de 2015.

VEAZIE, L. Epidemic Giardiasis. **N. Engl. J. Med**, v.281, p.853, 1969.

VESEY, G., SLADE, J.S., BYRNE, M., SHEPHERD, K., FRICKER, C.R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **J Appl Bacteriol**, v.75, n.1, p.82-86, 1993.

WANG, R., JIAN, F., SUN, Y., HU, Q., ZHU, J., WANG, F., NING, C., ZHANG, L., XIAO, L. Large-scale survey of *Cryptosporidium* spp. in chickens and Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) in Henan, China: prevalence and molecular characterization. **Avian Pathol**, v.39, n.6, p.447-451, 2010.

WANG, R., WANG, F., ZHAO, J., QI, M., NING, C., ZHANG, L. *Cryptosporidium* spp. in quails (*Coturnix coturnix japonica*) in Henan, China: molecular characterization and public health significance. **Vet Parasitol**, v.187, n.3-4, p.534-537, 2012.

WANG, L., XUE, X., LI, J., ZHOU, Q., YU, Y., DU, A. Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. **Parasite**, Epub, v.21, n.36, p.1501, 2014.

WIDERSTRÖM, M., SCHÖNNING, C., LILJA, M., LEBBAD, M., LJUNG, T., ALLESTAM, G., FERM, M., BJÖRKHOLM, B., HANSEN, A., HILTULA, J., LÅNGMARK, J., LÖFDAHL, M., OMBERG, M., REUTERWALL, C., SAMUELSSON, E., WIDGREN, K., WALLENSTEN, A., LINDH, J. Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the publicwater supply, Sweden. **Emerg. Infect. Dis**, v. 20, n.4, p.581-589, 2014.

XIAO, L., SINGH, A., LIMOR, L., GRACZYK, T.K., GRADUS, S., LAL, A.A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n.3, p.1097-1101, 2001.

XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U., Upton, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy, recent advances and implications for public health. **Clin Microbiol Rev**, v.17, n.1, p 72-77, 2004.

XIAO, L., ALDERISIO, K., SINGH, A. Development and standardization of a *Cryptosporidium* genotyping tool for water samples. Awwa Research Foundation, Denver, 2006.

XIAO, L., FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **Int J Parasitol**, v.38, n.11, p.1239-1255, 2008.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Exp Parasitol**, v.124, n.1, p.80-89, 2010.

YODER, J., BEACH, M.J. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. **Exp Parasitol**, v. 124, n.1, p.31-39, 2010.

ZARLENGA, D.S., TROUT, J.M. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. **Vet Parasitol**, v.126, n.1-2, p.195-217, 2004.

ZHOU, L., SINGH, A., JIANG, J., XIAO, L. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. **J Clin Microbiol**, v. 41, p.5254–5257, 2003.

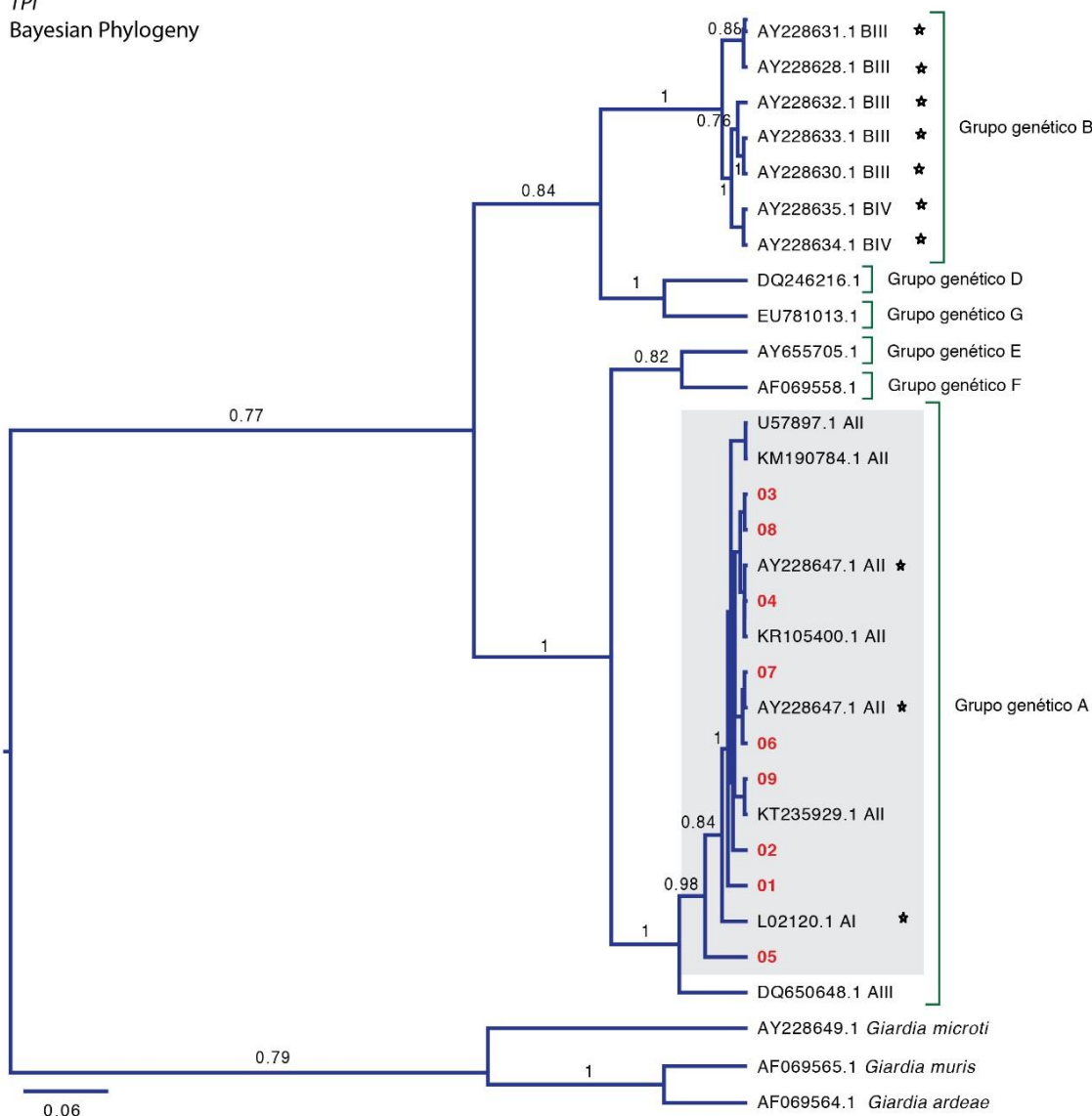
ZUCKERMAN, U., TZIPORI, S. Portable continuous flow centrifugation and method 1623 for monitoring of waterborne protozoa from large volumes of various matrices. **J Appl Microbiol**, v.100, n.6, p.1220-1227, 2006.

ANEXO 1

Posicionamento Filogenético:

TPI

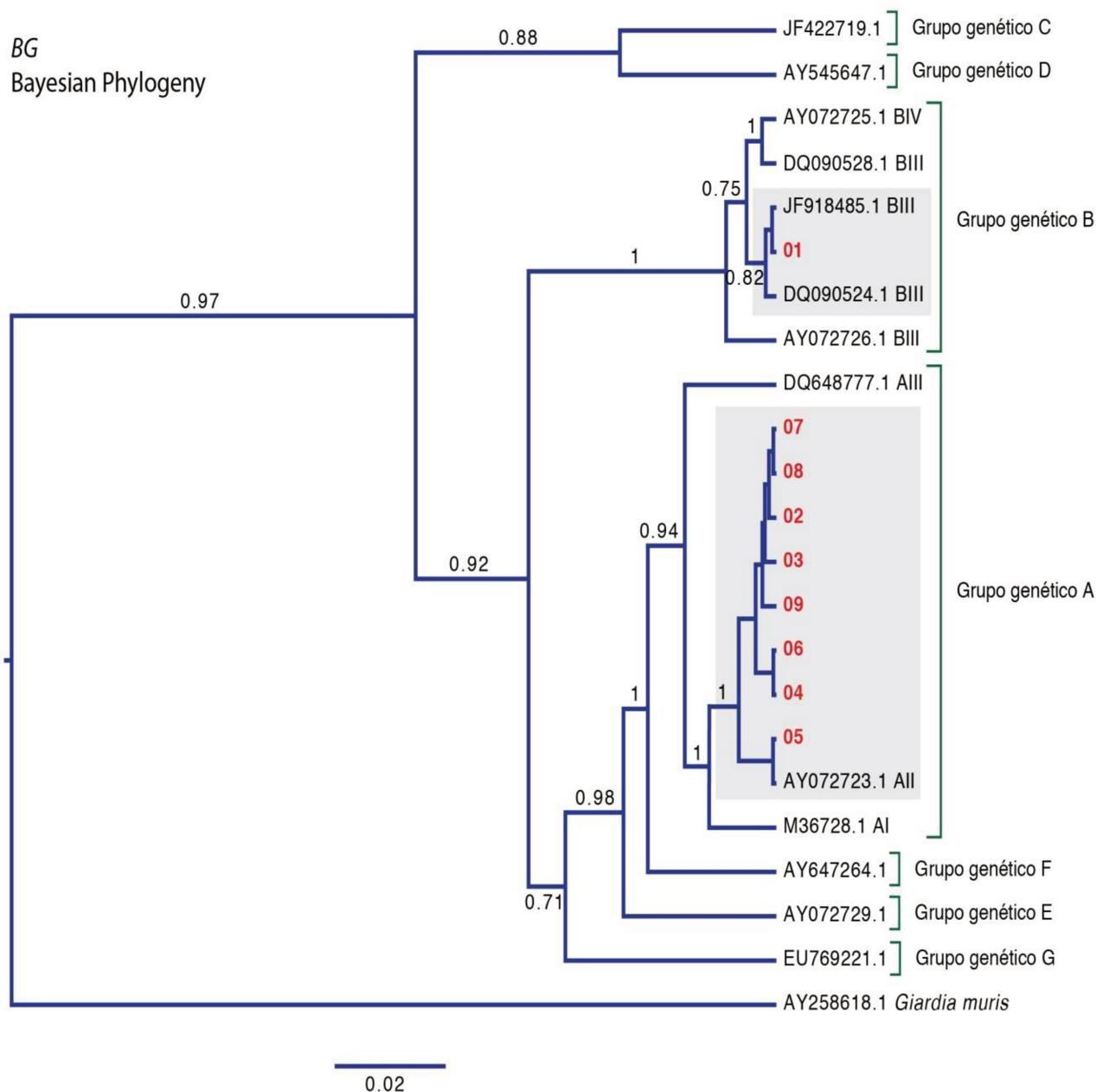
Bayesian Phylogeny



Posicionamento filogenético entre isolados de *Giardia duodenalis* construído a partir do alinhamento de 530 nucleotídeos da região codante do gene *tpi*, utilizando programa MAFFT v7. A hipótese filogenética foi gerada pelo método estatístico Bayesiano, usando modelo de substituição TN93+G, com 6 Cadeias de Markov rodadas em 100 mil passos de Monte Carlo, e burn-in de 10%, no pacote de programas BEAST v1.8.

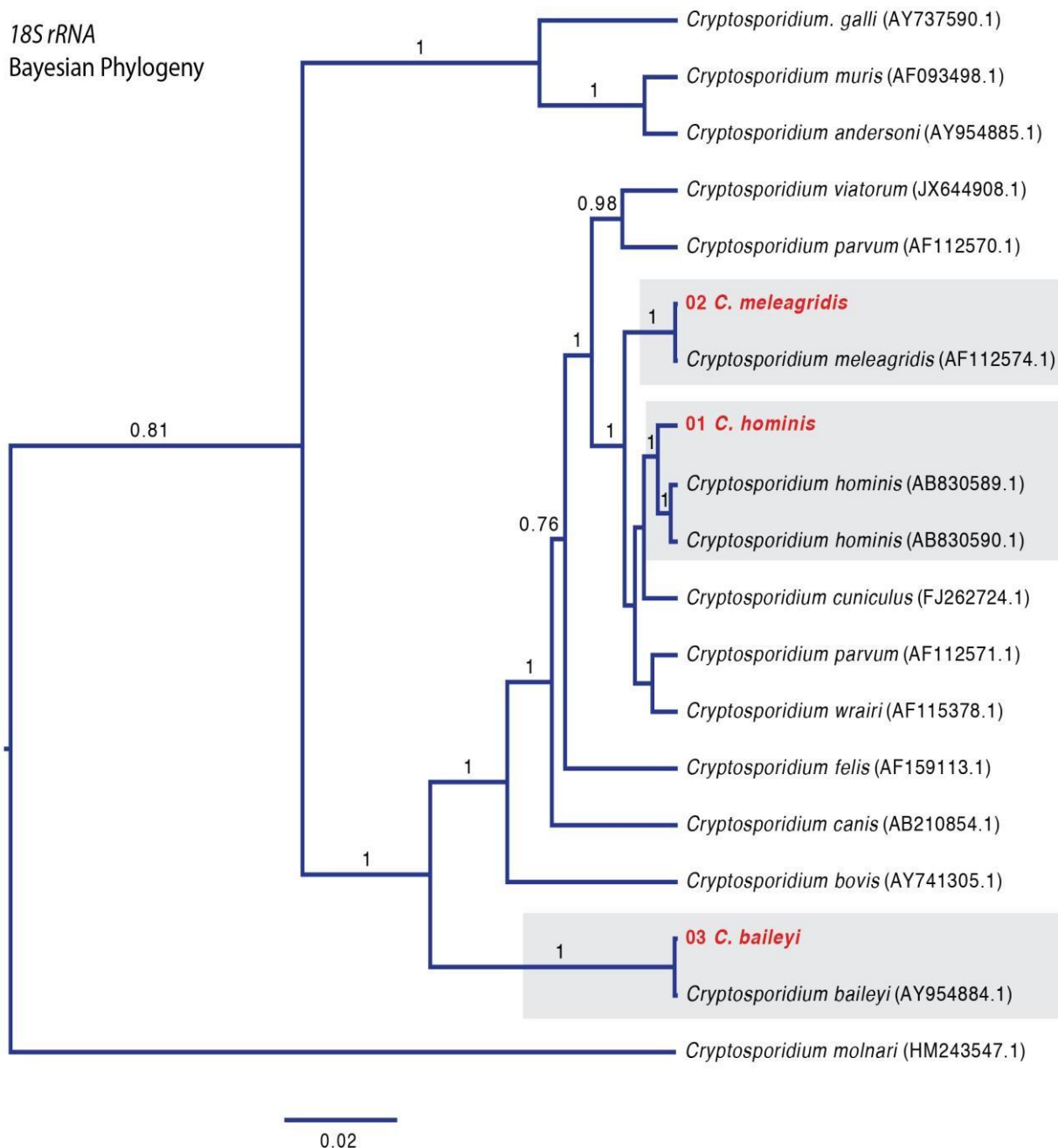
Área destacada (cinza): Grupo genético A; 01-03: amostras do P1 Chaclacayo, 04-06: amostras do P2 Cercado de Lima, 07-09: amostras do P3 Callao, de Lima, Peru.

* = Grupos genéticos de *Giardia* obtidas do GenBank (NCBI) procedentes de Peru.



Posicionamento filogenético entre isolados de *Giardia duodenalis* construído a partir do alinhamento de 511 nucleotídeos da região codante do gene *bg*, utilizando programa MAFFT v7. A hipótese filogenética foi gerada pelo método estatístico Bayesiano, usando modelo de substituição TB93+G, com 6 Cadeias de Markov rodadas em 100 mil passos de Monte Carlo, e burn-in de 10%, no pacote de programas BEAST v1.8.

Área destacada (cinza): Grupo genético A; 01-03: amostras do P1 Chaclacayo, 04-06: amostras do P2 Cercado de Lima, 07-09: amostras do P3 Callao, procedentes de Lima, Peru.



Posicionamento filogenético entre isolados de *Cryptosporidium* construído a partir do alinhamento de 830 nucleotídeos da região codante do gene *18S rRNA*, utilizando programa MAFFT v7. A hipótese filogenética foi gerada pelo método estatístico Bayesiano, usando modelo de substituição T92+G, com 6 Cadeias de Markov rodadas em 100 mil passos de Monte Carlo, e burn-in de 10%, no pacote de programas BEAST v1.8.

Área destacada (cinza): 01: amostras do P1 Chaclacayo, 02: amostras do P2 Cercado de Lima, 03: amostras do P3 Callao, procedentes do Lima, Peru.



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Cidade Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone: (+55) 051-2721-2728, e-mail: cpg@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada *Ocorrência e caracterização molecular de cistos Giardia spp. e oocistos de Cryptosporidium em água bruta do Rio Rimac, nas províncias de Lima e Callao, Peru* desenvolvida no Programa de Pós Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Moritz Bautista
Nome do(a) aluno(a): Moritz Bautista Gutierrez


Assinatura: Rogina Maura Bueno Franco
Nome do(a) orientador(a): Rogina Maura Bueno Franco


Data: 03/11/2015

Profa. Dra. Rachel Meneguello
 Presidente
 Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Ocorrência e caracterização molecular de cistos *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água bruta do Rio Rímac, nas províncias de Lima e Callao, Peru**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 05/02/2016

Assinatura: 
 Nome do(a) autor(a):
 RG n.º RNE : V824307-0

Assinatura: 
 Nome do(a) orientador(a): Regina Maura Bueno Franco
 RG n.º 10.572.126