

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Aldo Pacheco Ferreira que aceitou mais este desafio na orientação desta dissertação.

Ao Professor Dr. Adacto Benedicto Ottoni, Professor Dr. Odir Clécio da Cruz Roque e Professor Dr. Antonio Nascimento Duarte por comporem a banca de avaliação desta dissertação e pelas considerações de extrema valia que muito ajudaram na conclusão final do trabalho.

A Professora Maria José Salles pela disponibilização de vasto material bibliográfico.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental/Ensp/Fiocruz.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha mãe Elvia Garrido e ao meu pai Ernesto Maure pelo estímulo constante.

Ao primo Edwin Pile Maure que possibilitou com incentivo e companheirismo ao desenvolvimento desta dissertação.

Resumo da dissertação apresentada a FIOCRUZ/ENSP como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

***Cryptosporidium parvum* - patógeno emergente de veiculação hídrica: desafios metodológicos de detecção ambiental**

Luis Ernesto Maure Garrido

Fevereiro / 2003

Orientador: Prof. Dr. Aldo Pacheco Ferreira

Programa: Saneamento Ambiental

A qualidade e segurança da água são questões que estão chamando a atenção das autoridades em saúde pública. Várias espécies do gênero *Cryptosporidium* foram descritas, mas somente o *Cryptosporidium parvum* têm sido associado às doenças gastrintestinais (TEUNIS & HAVELAAR, 2002). A criptosporidiose pode ser fatal em imunocomprometidos e pode debilitar severamente indivíduos imunocompetentes. Outro agravante dá-se pelo fato de oocistos de *Cryptosporidium* serem resistentes às pressões ambientais, podendo sobreviver por vários meses no ambiente aquático e são também resistentes à desinfecção por cloro utilizada no tratamento convencional de água (MULLER, 2000).

Atualmente existem diferentes métodos propostos, mais ainda não padronizados. A ausência de uma metodologia padronizada para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* dificulta a viabilização de um monitoramento ou pesquisa deste patógeno emergente. No Brasil, os dados acerca da ocorrência deste parasito em água de abastecimento são limitados. A portaria 1469 de 2000, que em seu padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano recomenda inclusão de pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência, dentre outros, oocistos de *Cryptosporidium* spp. Recomenda-se, mundialmente, o monitoramento de *Cryptosporidium* em sistema de água potável que abastecem cidades com população entre 10000 e 100000 pessoas. Entretanto, os métodos normalmente usados na determinação de oocisto na água são ineficientes e extremamente variáveis, citando como exemplos a identificação de falsos-positivos por interferências com algas e outras espécies de protozoários (FRANCO *et al.*, 2001).

Conclui-se que a inexistência ou inadequação do tratamento de dejetos pode gerar a contaminação dos mananciais de água, podendo veicular e disseminar *C. parvum*. Em face disso, torna-se fundamental o desenvolvimento e aprimoramento de métodos diagnósticos de detecção.

Abstract of Dissertation presented to FIOCRUZ/ENSP as partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.).

***Cryptosporidium parvum* - patógeno emergente de veiculação hídrica: desafios metodológicos de detecção ambiental**

Luis Ernesto Maure Garrido

February / 2003

Advisor: Prof. Dr. Aldo Pacheco Ferreira

Program: Environmental Sanitary

The water quality and safety are subjects that are getting the attention of authorities in public health. Several species *Cryptosporidium* were described, but only the *Cryptosporidium parvum* have been associated to the gastrointestinal diseases (TEUNIS & HAVELAAR, 2002). The criptosporidiose can be fatal in immunodeficients and it can weaken individuals immunocompetents severely. Another added difficulty feels for the fact of *Cryptosporidium* oocysts be resistant to the environmental pressures, could survive for several months in the aquatic atmosphere and they are also resistant to the disinfection for chlorine used in the conventional water treatment (MULLER, 2000).

Now different proposed methods exist, not yet standardized. The absence of a methodology standardized for detection *Cryptosporidium* oocysts may difficult the monitoring viable researches of this pathogen emergent. In Brazil, the data concerning the occurrence of this parasite in supply water are limited. The norm 1469/2000, that in your microbiologic potability pattern of water for human consumption recommends inclusion for research of pathogenic organisms, with the objective of reaching, as goal, an absence pattern, among other, *Cryptosporidium* spp. oocysts. It is recommended, globally, the *Cryptosporidium* monitoring in drinking water system in cities supplies with population between 10000 and 100000 people. However, the methods usually used in the water oocysts determination are inefficient and extremely variables, mentioning as examples the identification of false-positive for interferences with algae and other species of protozoa (FRANCO *et al.*, 2001).

It is concluded that inexistence or inadequacy of sewage treatment can generate the contamination to the rivers water, transmitting and disseminating *C. parvum*. In face of that, becomes fundamental the development and improve diagnose methods for its detection.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE DO TEXTO.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
I – INTRODUÇÃO.....	1
II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
II.1. Gênero <i>Cryptosporidium</i> : Patogenicidade e aspectos epidemiológicos....	10
II.2. Surtos de veiculação Hídrica.....	16
II.3. Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em esgoto.....	18
II.4. Métodos de Detecção em Amostras Ambientais.....	19

III – MATERIAL e MÉTODOS.....	23
III.1. Introdução.....	23
III.2. Métodos de detecção.....	26
III.2.1. Métodos de detecção de oocistos em fezes.....	26
III.2.1.1. Método de Ritchie ou Formol-éter.....	26
III.2.1.2. Concentração pelo açúcar de Sheather.....	26
III.2.1.3. Concentração pelo sulfato de zinco modificado.....	27
III.2.1.4. Concentração pela formalina-etil acetato modificado.....	27
III.2.1.5. Separação Imunomagnética.....	28
III.2.1.6. Teste de imunofluorescência.....	29
III.2.1.6.1. Imunofluorescência direta.....	29
III.2.1.6.1.1. Utilização de anticorpos monoclonais....	29
III.2.1.6.2. Imunofluorescência indireta.....	31
III.2.1.7. Teste de ELISA.....	32
III.2.1.8. Citometria de fluxo.....	33
III.2.1.9. Reação polimerásica em cadeia.....	34
III.2.1.10. Microscopia Eletrônica.....	35
III.2.1.11. Detecção por coloração.....	36
III.2.1.11.1. Coloração pela Giemsa.....	36
III.2.1.11.2. Coloração Ziehl- Neelsen modificada.....	37
III.2.1.11.3. Coloração ácido-resistente com tricromo.....	37
III.2.1.11.4. Coloração pela Safranina (1).....	38
III.2.1.11.5. Coloração pela Safranina (2).....	38
III.2.1.11.6. Coloração fluorescente Auramina O-fenol.....	39

III.2.2. Detecção de oocistos em água.....	40
III.2.2.1. Concentração por dissolução da membrana filtrante.....	40
III.2.2.2. Concentração por filtro de cartucho.....	41
III.2.2.3. Concentração por precipitado de carbonato de cálcio....	42
III.2.2.4. Purificação pela flotação em gradiente de Percoll-Sucrose.....	43
III.2.2.5. Purificação pela separação imunomagnética.....	44
III.2.2.5.1. Captura de oocisto e IMS.....	44
III.2.2.5.2. Dissociação do complexo dynabead/oocisto.....	44
III.2.3. Detecção de oocistos em esgoto.....	46
III.2.3.1. Concentração por precipitado do carbonato de cálcio....	46
III.2.3.2. Concentração por centrifugação em fluxo contínuo.....	47
III.2.3.3. Detecção pela imunofluorescência.....	47
 IV – RESULTADOS.....	 49
IV.1. Indicadores de eficiência de tratamento em ETAs.....	50
IV.2. Indicadores de eficiência de recuperação por filtração em diferentes tipos de água (bruta e tratada).....	52
IV.3. Indicadores de eficiência de recuperação em ETEs.....	61
IV.4. Indicadores de eficiência de recuperação em fezes.....	63
 V – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	 70
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium parvum</i>	2
Figura 2. Efeito do Tempo x Temperatura sobre a infectividade de <i>C. parvum</i>	3
Figura 3. Rotas de transmissão e fontes de infecção de <i>C. parvum</i>	11
Figura 4. Concentração de oocistos de <i>C. parvum</i> por filtro de cartucho.....	42
Figura 5. Percentual comparativo de recuperação de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> usando métodos de concentração (filtro de cartucho e filtro de membrana).....	53
Figura 6. Análises comparativas de concentrações de <i>C. parvum</i> na água bruta, tratada e filtrada de quatro ETAs.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Método de concentração de *C. parvum* por carbonato de cálcio..... 57

Tabela 2. Métodos de concentração pela Metodologia 1622 e 1623 – USEPA..... 59

Capítulo I

INTRODUÇÃO

A água é o composto químico mais comum e importante sobre a terra. Cerca de 2,6 % da quantidade global de água ($1,4 \times 10^9 \text{ Km}^3$) é potencialmente disponível para consumo humano. Mais de um bilhão de pessoas não têm acesso à água potável, aproximadamente 2 bilhões, não têm acesso a serviços de saneamento, e cerca de 3 milhões morrem por ano, na sua maioria crianças, atingidas por doenças de veiculação hídrica, principalmente na África e demais países em desenvolvimento. Tal fato tem sido o ponto mais crítico para a sustentabilidade do ecossistema.

A água pode veicular parasitas patógenos, indicando a inexistência ou inadequação do tratamento de dejetos e da proteção aos mananciais de água potável. Os objetivos gerais desta dissertação são o levantamento metodológico de detecção de *Cryptosporidium* spp., correlacionando o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e a avaliação de estratégias de identificação de áreas problema, especialmente, estações de tratamento de água (ETAs) e estações de tratamento de esgoto (ETEs), o monitoramento de efluentes, o monitoramento da qualidade da água de abastecimento, avaliando o risco de veiculação deste patógeno. Também foi objetivado a determinação da ocorrência e densidade de *Cryptosporidium* spp. Foram realizadas análises discriminativas de técnicas de detecção de *Cryptosporidium* spp. em água de consumo e de corpos hídricos, no esgoto e em fezes. Analisaram-se dados epidemiológicos e coproparasitológicos, com a finalidade de se obter critérios que possibilitem analisar e avaliar métodos de diagnóstico de detecção deste microrganismo. Pretende-se, ainda, formar subsídios para se ter um padrão metodológico de coleta e análises de água, esgoto e fezes, levantar o risco de transmissão desta parasitose em cada situação-problema, gerando recomendações para ações de controle e vigilância e orientar futuros temas e linhas de pesquisa básica e aplicada em saneamento ambiental, que contribuam ao gerenciamento dos recursos hídricos.

Um dos impactos potencialmente relevantes da descarga de águas residuárias em um meio aquático é a contaminação microbiológica. Os microrganismos transmitidos via água incluem bactérias, vírus, fungos e parasitos que provêm de excretas de

indivíduos infectados. O *Cryptosporidium* spp. causa gastroenterite moderada a severa no homem e nos animais. É um protozoário cuja transmissão ocorre através de águas contaminadas. Seus oocistos apresentam grande resistência às condições ambientais e aos descontaminantes empregados para tornar a água potável. A criptosporidiose pode causar surtos diarréicos de grande magnitude e não é mais considerado apenas um problema de pacientes imunocomprometidos. É uma das mais freqüentes protozooses intestinais, e cada vez mais vem sendo reconhecida como uma doença veiculada pela água. É uma anfixenose, tendo animais silvestres ou domésticos como reservatórios e fontes de contaminação dos mananciais. O ciclo de *Cryptosporidium parvum* no hospedeiro é demonstrado na **figura 1**.

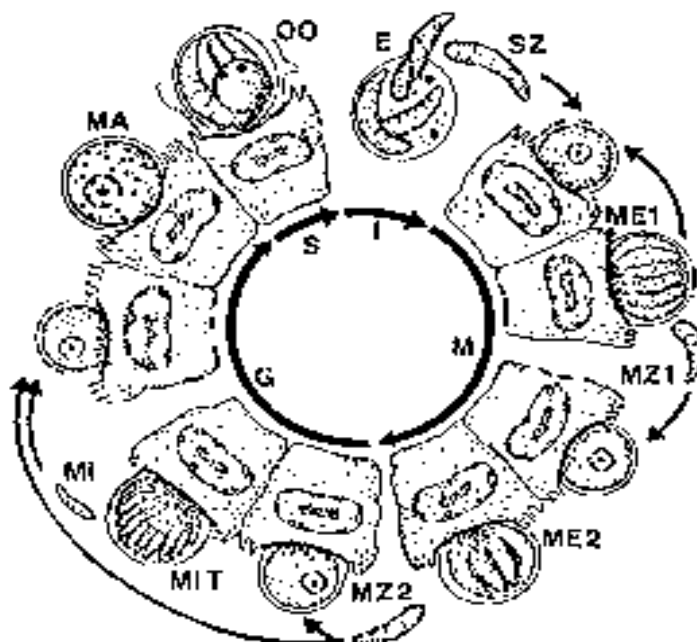


Figura 1. Ciclo de vida de *Cryptosporidium parvum*

Abreviaturas: (E) Excistância, resultando na liberação de 4 esporozoítos através da sutura na parede, (G) Gamogonia, (I) Fase Infectiva, (M) Merogonia, (ME1) Meronte Tipo I contendo 8 merozoítos, (ME2) Meronte Tipo II contendo 4 merozoítos, (MA) Macrogameta, (Mi) Microgameta, (MiT) Microgametócitos com 16 microgametas, (MZ1) Merozoítos Tipo I, (MZ2) Merozoítos Tipo II, (OO) oocistos, (S) Esporogonia; (SZ) Esporozoítos.

O protozoário parasita *Cryptosporidium* emergiu como um dos mais importantes contaminantes da água responsável por vários surtos de criptosporidiose, afetando até meados de 2001, aproximadamente, 427.000 pessoas em todo mundo. Várias espécies do gênero *Cryptosporidium* foram descritas, mas somente o *C. parvum* têm sido associado às doenças gastrintestinais (TEUNIS & HAVELAAR, 2002). A criptosporidiose pode ser fatal em imunocomprometidos e pode debilitar severamente indivíduos imunocompetentes. Outro agravante dá-se pelo fato de oocistos de *Cryptosporidium* serem resistentes às pressões ambientais, podendo sobreviver por vários meses no ambiente aquático e são também resistentes à desinfecção por cloro utilizada no tratamento convencional de água (MULLER, 2000). A **figura 2** evidencia o efeito do Tempo x Temperatura sobre a infectividade de *C. parvum*.

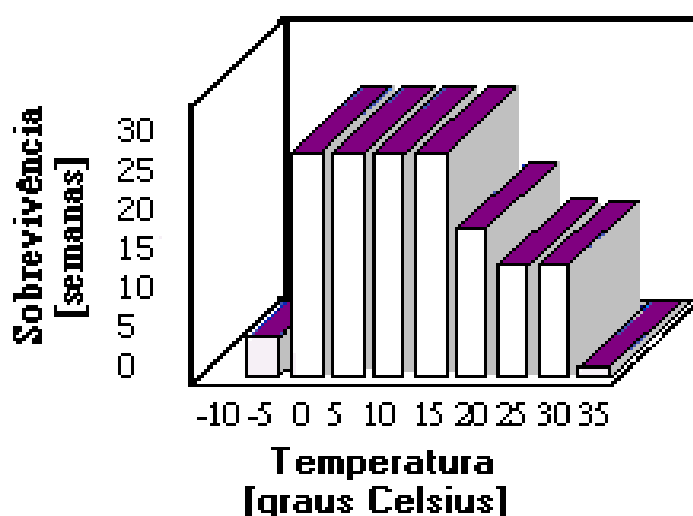


Figura 2. Efeito do Tempo x Temperatura sobre a infectividade de *C. parvum*

A qualidade e segurança da água são questões que estão chamando a atenção das autoridades em saúde pública. O aumento da população durante o último século, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, tem incrementado o número de surtos epidêmicos relacionados à água devido a pressões sobre a mesma. Estas pressões incluem a contaminação por resíduos domésticos, industriais e provenientes da agricultura além de efeitos menos diretos causados por mudanças climáticas e outros distúrbios ecológicos. Estes fatores associados à susceptibilidade individual contribuem no aumento da incidência de infecções transmitidas pela água (SANCHEZ,1997).

Uma área de especial preocupação é a de microrganismos indicadores (FORD & COLWELL, 1995). A dependência das análises microbiológicas da água sobre os indicadores tradicionais tais como os coliformes, pode ser duvidosa, particularmente, quando se suspeita da presença de vírus e parasitos na água. Como resultado, os últimos anos tem registrado surto de doenças entéricas transmitidas pela água que cumpriram satisfatoriamente com os critérios de qualidade. Isso tem chamado poderosamente a atenção sobre o significado dos indicadores (CIFUENTES *et al.*, 1998).

A necessidade de proteção e tratamento adequado da água de consumo humano relaciona-se, diretamente, com os diferentes surtos epidêmicos onde microrganismos acometem a população por via hídrica. Recentemente, vários patógenos novos e patógenos emergentes têm evidenciado problemas. Dentre outros, ressalta o *Cryptosporidium parvum* que foi primeiramente descrito em 1907, reconhecido como patógeno animal em 1955, mas somente a partir da década de 80 caracterizado como patógeno humano (SZEWZYK *et al.*, 2000).

O *C. parvum* pertence ao reino Apicomplexa, classe Sporozoa e a família Cryptosporidiidae. É um ser parasito coccídeo entérico obrigatório, que infecta o trato gastrointestinal, sendo um dos patógenos entéricos mais importante dentro do gênero *Cryptosporidium*. Há correntemente 10 espécies: *C. baileyi* e *C. meleagridis* encontrados em pássaros, *C. felis* encontrados em gatos, *C. muris* encontrados predominantemente em camundongos, *C. wrairi* em porquinhos-da-índia, *C. andersoni* no gado, *C. nasarum* em peixes, *C. serpentis* e *C. saurophilum* encontrados em répteis (FAYER *et al.*, 2000).

O transporte de microrganismos patogênicos pelas águas tem representado um fator importante no comprometimento dos recursos hídricos e na disseminação de processos infecciosos em populações, especialmente quando sistemas de abastecimento de águas e tratamento de esgotos são precários (RIVERA & MARTINS, 1996).

A história nos tem relatado numerosos casos de epidemias provocadas pelo consumo de água contaminada por diferentes agentes etiológicos. Nos Estados Unidos, entre 1990 e 1992, ocorreram 1.768 epidemias de veiculação hídrica, afetando 472.228 indivíduos e ocasionando 1.091 mortes. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), dos 51 milhões de óbitos registrados mundialmente em 1993, aproximadamente um terço (16,4 milhões) foram causados por infecções e doenças parasitárias. Em países em desenvolvimento estas infecções equivalem a 44% dos óbitos e 71% da mortalidade infantil. Estima-se que ocorram mundialmente cerca de 900 milhões de casos de diarreias e, aproximadamente, 2 milhões de óbitos infantis por ano, associados ao consumo de água contaminada (WORLD DEVELOPMENT REPORT, 1992).

Epidemias de origem e/ou veiculação hídrica são freqüentemente descritas em diferentes proporções, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, de 1986 a 1996, foram notificadas em torno de 320 epidemias provocadas por águas de consumo e águas recreacionais contaminadas por microrganismos patogênicos, atingindo, aproximadamente, 500 mil pessoas (LEVINE *et al.*, 1990; HERWALDT *et al.*, 1991; MOORE *et al.*, 1993; KRAMER *et al.*, 1996; LEVY *et al.*, 1998). Consta, ainda, no relatório da OMS que 80% das doenças que ocorrem nos países em desenvolvimento são ocasionadas pela contaminação da água. Sabe-se também que a cada ano, 15 milhões de crianças de 0 a 5 anos morrem, direta ou indiretamente, pela falta ou deficiência dos sistemas de abastecimento de águas e esgotos, e que somente 30% da população mundial tem garantia de água tratada, sendo que os 70% restantes dependem de poços e outras fontes de abastecimento viáveis de contaminação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1984).

No Brasil, os serviços de água e esgoto são ainda precários, o que poderia explicar o ressurgimento de enfermidades já erradicadas e a incidência de óbitos provocados por doenças de veiculação hídrica. Dados de 1995 indicam que 76% dos domicílios existentes no país estão conectados à rede de abastecimento de água,

proporção que atinge 90% nas áreas urbanas e 17% nas áreas rurais. A distribuição por regiões mostra coberturas mais elevadas na região sudeste (96%), seguindo-se as regiões sul (93%), nordeste (84%) centro-oeste (82%) e norte (70%). As informações mais recentes de âmbito nacional sobre a qualidade da água abastecimento referem-se a inquéritos realizados em 1989, indicando que em 83,4% das cidades servidas por serviços públicos de abastecimento de água, existia alguma forma de tratamento, convencional, parcial ou simples desinfecção (OPAS, 1998).

De um forma geral, o tratamento de água utilizado por ETAs operam convencionalmente envolvendo processos de coagulação, floculação, decantação, filtração e desinfecção. Porém, cada ETA é abastecida por diferentes afluentes que possuem características próprias e que variam quanto à qualidade de água. Portanto, dependendo das características da água bruta, as ETAs têm autonomia para alterar o tratamento, tornando-o mais eficiente para solucionar os problemas apresentados pelo manancial. Assim sendo, quanto mais conservado um manancial, mais simples torna-se o tratamento, com conseqüente redução de custos, e quanto mais comprometida à água bruta, mais investimentos serão necessários. Entretanto, vale ressaltar que algumas características importantes da presença de oocistos no meio ambiente são a sua resistência ao estresse ambiental, aos processos convencionais de tratamento de água, como a cloração e a filtração, e aos processos de tratamento de esgoto por lodos ativados (MATURANA *et al.*, 1992).

Segundo ROSE (1990), a veiculação hídrica do *Cryptosporidium* é facilitada pelo longo período que o oocisto permanece viável no ambiente, pelo tamanho reduzido (2-5 μm). Hospedeiros infectados eliminam pelas fezes em torno de 10^9 a 10^{10} oocistos (SMITH & ROSE, 1998), que podem ser transmitidos pelas rotas indivíduo-indivíduo, animal-indivíduo, ou ainda pela ingestão de água e alimentos contaminados. Os oocistos de *Cryptosporidium* são altamente infectantes e a ingestão de até 30 oocistos podem resultar em infecções humanas (DUPONT *et al.*, 1995).

Recentes estudos de epidemias de criptosporidiose sugerem que a contaminação dos recursos hídricos com oocistos representa um importante fator para o desenvolvimento e transmissão desta doença (D'ANTONIO *et al.*, 1985; HAYES *et al.*, 1989). De 1983 a 1998, 64 epidemias de origem hídrica foram associadas ao

Cryptosporidium em todo mundo, atingindo aproximadamente 460 mil pessoas, incluindo o maior surto em Milwaukee/Estados Unidos, com 403 mil pessoas infectadas (UPTON, 1999).

No Brasil, embora subestimada, segundo o Ministério da Saúde, a ocorrência da criptosporidiose em portadores do vírus HIV, no período de 1980 a abril de 1999, foi de 4.691 casos em 155.590 portadores. Foram documentadas infecções endêmicas por *Cryptosporidium* em cidades como Fortaleza, atingindo, sobretudo a população mais carente e crianças (SHUXIAN ZU *et al.*, 1994; NEWMAN *et al.*, 1994). Dados da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo foram notificados entre 2000 e 2001, 2070 casos na cidade de Santos e 1013 casos na cidade de São Paulo, principalmente, em portadores do vírus HIV.

Por ser a água o veículo mais importante na transmissão de oocistos de *Cryptosporidium*, muitos estudos têm sido feitos sobre a ocorrência do parasita em esgotos, águas superficiais, subterrâneas e tratadas (SMITH & ROSE, 1998). Em águas de esgoto o número de oocistos presentes é variável, e esta taxa pode ser influenciada pelo tamanho da população. MADORE e colaboradores (1987) encontraram concentrações de até 13.700 oocistos/L em efluentes de esgoto bruto e 3960 oocistos/L em efluentes tratados. ROSE (1988) encontrou oocisto em 91% das amostras de efluentes de esgotos dos EUA, 77 a 75% dos rios e lagos e 28% das águas tratadas.

Em decorrência do número de casos registrados de criptosporidiose e da dificuldade de se inativar oocistos, muitos pesquisadores e agências de proteção ambiental vêm estudando métodos mais sensíveis de detecção e limites para a densidade de oocistos presentes em águas destinadas ao consumo, visando assegurar a qualidade de água e sugerindo o monitoramento das águas de abastecimento. Embora não exista um limite estabelecido pelo padrão internacional, alguns estudos têm proposto níveis de tolerância para a ocorrência e números de oocistos em amostras de água superficial e tratada (HSU *et al.*, 2001).

Atualmente existem diferentes métodos propostos, mais ainda não padronizados, para a pesquisa de oocistos na água. Os métodos preconizados pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) e outros órgãos relacionados para o

isolamento e contagem de oocistos consomem muito tempo e não são altamente eficientes para garantir a ausência destes em águas tratadas, tornando difícil assegurar a qualidade da água de abastecimento (SMITH & ROSE, 1998). Por outro lado, alguns estudos relatados na literatura científica demonstraram ausência de correlação entre os parâmetros físico-químicos da água e a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras ambientais (THURMAN *et al.*, 1998; TEUNIS & HAVELAAR, 2002). Do mesmo modo, muitos estudos vêm demonstrando que os indicadores bacteriológicos regulamentados por lei (coliformes totais e coliformes termotolerantes), usados para acessar a qualidade microbiológica da água, são inadequados para determinar a qualidade parasitológica da mesma (TZIPORI & WARD, 2002).

A ausência de uma metodologia padronizada para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* dificulta a viabilização de um monitoramento ou pesquisa deste patógeno emergente. Uma metodologia recomendada para pesquisa de oocistos na água é a proposta pela USEPA, que envolve processos de filtração da amostra através de filtros ou membranas, concentração por centrifugação, purificação utilizando gradientes de densidade ou separação imunomagnética, análise por imunofluorescência e confirmação por contraste de fase (LeCHEVALLIER *et al.*, 1995; EPA, 1999). A técnica de floculação e precipitação do carbonato de cálcio como método alternativo para concentração de amostra é considerada por alguns autores como uma metodologia simples, eficiente e econômica (VESEY *et al.*, 1993; SHEPHERD & WYN-JONES, 1996).

Métodos genéticos têm sido desenvolvidos para amostras ambientais, na tentativa de otimizar os processos de detecção de oocistos, tornando-os mais rápidos e sensíveis (JOHNSON *et al.*, 1995; MAYER & PALMER, 1996). Técnicas utilizando indicadores específicos (ROCHELLE *et al.*, 1997) como as de hibridização com sondas de oligonucleotídeos, marcados por quimiluminescência (JOHNSON *et al.*, 1995), endonucleases de restrição (AWAD-EL-KARIEU *et al.*, 1994), reação polimerásica em cadeia (MAYER & PALMER, 1996; KAUCNER & STINEAR, 1998), têm sido estudadas e aplicadas de modo a permitir a identificação de espécies de *Cryptosporidium*.

No Brasil, os dados acerca da ocorrência deste parasito em água de abastecimento são limitados. A portaria 1469 de 2000, que em seu padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano recomenda inclusão de pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência, dentre outros, oocistos de *Cryptosporidium* spp. Atualmente, recomenda-se, mundialmente, o monitoramento de *Cryptosporidium* em sistema de água potável que abastecem cidades com população entre 10000 e 100000 pessoas. Entretanto, os métodos normalmente usados na determinação de oocisto na água são ineficientes e extremamente variáveis, citando como exemplos a identificação de falsos-positivos por interferências com algas e outras espécies de protozoários (FRANCO *et al.*, 2001).

Há de se ter uma melhor compreensão da detecção e identificação de espécies de *Cryptosporidium* spp., de forma a acoplar ao dia-a-dia mecanismos advindos do avanço tecnológico que muito ajudarão neste monitoramento.

Capítulo II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. Gênero *Cryptosporidium*: Patogenicidade e aspectos epidemiológicos

Por 48 anos, após suas primeiras descrições por TYZZER em 1907, o *Cryptosporidium* manteve-se fora do “foco científico”, até 1955 quando passou a ser relacionado a doenças e mortes em criações de aves e 1971 em gado (SLAVIN, 1955; PANCIERA *et al.*, 1971). Infecções por *Cryptosporidium* foram descritas em humanos em 1976 (NIME *et al.*, 1976; MEISEL *et al.*, 1976), aumentando a incidência em função do aumento do número de portadores do vírus HIV na década de 80.

A criptosporidiose é uma doença que pode ser transmitida pelo contato direto entre animal-pessoa ou pessoa-pessoa, ou de forma indireta pelo contato com superfícies ou consumo de água e alimentos contaminados com até 30 oocistos, (ROSE, 1990; DUPONT *et al.*, 1995), ocasionando, após 3 dias de exposição ao agente uma diarreia profusa, com intensa desidratação, fortes dores abdominais, náusea, vômito e febre (NAVIN & JURANEK, 1984).

A diversidade de reservatórios e formas de veiculação de *Cryptosporidium* spp., associada à sua capacidade de sobrevivência no meio ambiente, gera uma rede de transmissão e fontes de infecção para o homem e/ou animais (CASEMORE, 1990). A **figura 3** exprime as rotas de transmissão e fontes de infecção de *C. parvum*.

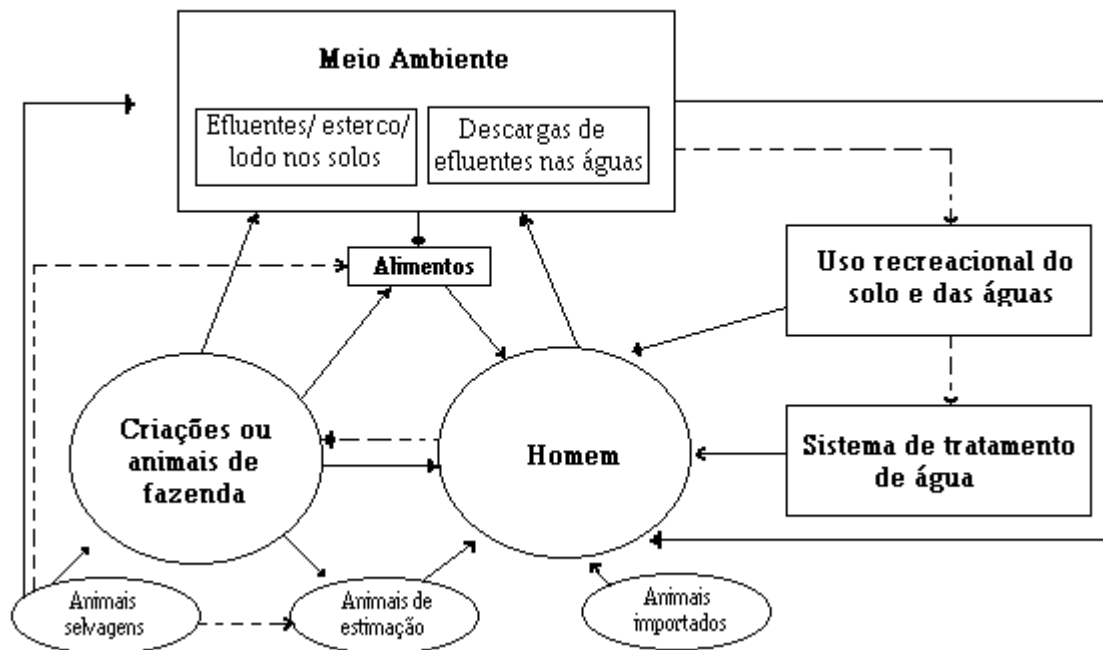


Figura 3. Rotas de transmissão e fontes de infecção de *C. parvum*

De modo geral, a transmissão zoonótica de criptosporidiose é associada à baixas práticas de higiene quando em contato com fezes, leite cru, água ou contato com animais infectados, considerados importantes reservatórios de contaminação humana e ambiental (FAYER, 1997). Diversos autores descreveram infecções por *Cryptosporidium* em adultos e crianças após o contato com vacas, ovelhas e animais domésticos (CASEMORE, 1990; SHIELD *et al.*, 1990; DAWSON *et al.*, 1995), bem como com animais de estimação, como gatos e cachorros, embora estes sejam raramente descritos como fonte de infecção humana (FAYER, 1997). CURRENT (1994) ressalta também a importância da transmissão direta entre profissionais da área veterinária, uma vez que foram notificados casos de criptosporidiose nestes indivíduos ou em pessoas que conviviam com os mesmos.

Quando relacionada ao consumo de alimentos contaminados, baseados em alguns estudos epidemiológicos realizados no Reino Unido, a ingestão de certos

alimentos, especialmente derivados animais como lingüiça fresca ou crua, leite, carne ou peixe em más condições, aparenta ser fator de risco para infecção por *Cryptosporidium* (CASEMORE, 1990; PALMER & BIFFIN, 1990). Em Maine, nos Estados Unidos, o primeiro relato de infecção por consumo de alimentos contaminados com oocistos de *Cryptosporidium* ocorreu em 1994, após a ingestão de suco de maçã fresco, infectando 213 pessoas (MILLARD *et al.*, 1994).

Segundo FAYER (1997), a transmissão de *Cryptosporidium* através do meio ambiente vem ganhando reconhecimento, especialmente, após a ocorrência de numerosos surtos associados ao consumo ou contato com águas contaminadas. Alguns fatores biológicos e características próprias do *Cryptosporidium* facilitam a transmissão da doença através da água. A ausência de uma terapia específica para o seu tratamento e o alto número de oocistos excretados por indivíduos infectados, em torno de 10^9 a 10^{10} oocistos, assim como a ampla variedade de hospedeiros que atuam como reservatório da infecção ou favorecem a transmissão cruzada, aumentam o potencial de disseminação da criptosporidiose (MULLER, 1999).

Com a implementação da especificidade e sensibilidade dos métodos de detecção de oocistos, antes restritos à biópsia de tecidos de hospedeiros infectados, para a observação dos mesmos (FAYER, 1997), a partir de 1983 a criptosporidiose, inicialmente descrita somente em imunocomprometidos, passa a ser relatada em mais de 60 países dos 6 continentes (UNGAR, 1995), envolvendo também indivíduos imunocompetentes, independentemente do sexo e idade, residentes em áreas urbanas e rurais (Muller, 1999). Em países desenvolvidos, a determinação da incidência de infecções por *Cryptosporidium* em humanos está associada ao diagnóstico clínico e laboratorial em centros de saúde, com índices de 1-2% sobre a população total, prevalecendo em crianças (4-5%) de 1 a 5 anos de idade (FAYER & UNGAR, 1986; JANOFF & RELLER, 1987; CRAWFORD & VERMUND, 1988; TZIPORI, 1988; REINTHALER, 1989; CASEMORE, 1990; FAYER, 1997).

Uma vez que a excreção dos oocistos pode ou não coincidir com o período sintomático da doença, pode haver imprecisões quanto a sua real ocorrência, pela carência de maiores informações de sua incidência em indivíduos assintomáticos. SHEPARD *et al.* (1988) verificaram uma média de 19 dias para adulto e 17 para

crianças, transcorridos do início dos sintomas ao término da excreção de oocistos. ROBERTS *et al.* (1989), estudando amostras de bile em endoscopias de rotina de 169 pacientes assintomáticos, detectaram 12,7% de positividade para os oocistos de *Cryptosporidium*. Outros estudos realizados com crianças de creches afirmaram que a excreção assintomática dos oocistos não é incomum, sugerindo ser subestimado o número de portadores (CRAWFORD *et al.*, 1988; TANGERMANN *et al.*, 1991)

Nos países em desenvolvimento, as diferentes e muitas vezes baixa sensibilidade das técnicas de pesquisa empregadas levam a variação de ocorrências do *Cryptosporidium* spp. em diversas áreas, entretanto permanece o consenso na diminuição da faixa etária atingida, geralmente abaixo dos 3 anos de idade (FAYER, 1997).

Ocorrendo na ordem de 0,1-9,1% na Europa, América do Norte e Oceania (Austrália e Nova Zelândia) e de 3,2-16,7% em países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina (FAYER & UNGAR, 1986; CURRENT & GARCIA, 1991) a criptosporidiose muda o seu contexto de infecção rara e assintomática para uma das mais prevalentes causas de diarreia no homem e numa ampla variedade de animais (BUTTLER & MAYFIELD, 1996).

No Reino Unido, depois da bactéria *Campylobacter*, o *Cryptosporidium* foi o segundo patógeno entérico mais observado em crianças entre 1 a 5 anos de idade, sendo tão freqüente quanto a *Salmonella* e mais que a *Shigella* (PALMER & BIFFIN, 1990).

Em Luzaka, Zambia, cujo índice de indivíduos adéticos atinge aproximadamente 25% da população, foi comprovada a relação de *C. parvum* com a persistência diarreica em adultos de 4 centros urbanos (KELLY *et al.*, 1997).

Na Itália, em 1731 membros de um grupo de usuários de drogas de um centro de recuperação, 13,6% dos indivíduos HIV negativo e 30,7% de HIV positivo apresentam criptosporidiose, com sintomas crônicos sendo observados em 15,4% (POZIO *et al.*, 1997).

Segundo SMITH & ROSE (1998), anualmente ocorrem de 250 a 500 milhões de infecções por *Cryptosporidium* na Ásia, África, e América Latina.

Em áreas rurais e urbanas da república da China, a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em crianças e adolescentes de até 15 anos foi de 5,06% e 0,7% respectivamente (CHEN *et al.*, 1992).

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, de 1988 a abril de 1999, consta a ocorrência de 4.691 casos de criptosporidiose em 155.590 portadores de HIV.

No estado de São Paulo, segundo a Secretaria de Saúde do Estado, 2.070 casos de criptosporidiose ocorreram dentre 78.396 casos de HIV notificados, e no município, consta a ocorrência de 1.013 casos para o total de 36.336 portadores de HIV. GUIZELINE & AMATOS (1992) verificaram a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em fezes de imunodeprimidos e imunocompetentes, com maior incidência em indivíduos HIV positivo e crianças. MARTINS *et al.* (1998), estudando a frequência de *Cryptosporidium* spp. em pacientes com diarreia na cidade de Ribeirão Preto-SP, encontraram positividade de 15,42%. TOMPS (1998) no distrito de Perus em São Paulo encontrou prevalência de *Cryptosporidium* spp. sobre os demais parasitas intestinais pesquisados em fezes, seguido de *Ascaris lumbricoides*, *Endolimax nana*, *Giardia lamblia* e *Trichuris trichura*. Em Santos-SP, em 131 pacientes aidéticos, o *Cryptosporidium* spp. esteve associado a 19,1% dos processos diarreicos nestes indivíduos, seguido da *Isospora belli* (SAUDA *et al.*, 1993).

No Rio de Janeiro, MOURA *et al.* (1989) e MADI *et al.* (1991) relataram o *Cryptosporidium* spp. como organismo mais frequente em diarreias de pacientes HIV positivo, juntamente com *Entamoeba coli* e *Endolimax nana*.

A determinação da sua ocorrência pela pesquisa de anticorpos na população, bem como a sua incidência em crianças também foi observada. Em comunidades em Fortaleza, NEWMAN *et al.* (1994) e SHU-XIAN ZU *et al.* (1994) demonstraram 94% e 75% respectivamente de soroconversão para *Cryptosporidium* spp.

MOITINHO *et al.* (1997) observaram a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em 6,6% de amostras de fezes em crianças no Município de Maringá PR, nas quais não foi observada a presença de outros protozoários ou helmintos.

Em Belém, LOUREIRO *et al.* (1990), estudando a ocorrência da criptosporidiose em crianças, encontraram prevalência de 5,2%.

No nordeste do Brasil, de 102 episódios diarréicos acompanhados dos 1476 ocorridos em 4 anos em crianças nascidas em centros urbanos, os oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram indicados em 7,4% de todas as amostras, prevalentemente em crianças com diarréia persistente 16,5%, que em crianças com diarréia aguda 8,4% ou não aguda 4% (NEWMAN *et al.*, 1999).

MANGINI *et al.* (1992), de agosto de 1987 a julho de 1990, verificaram a ocorrência de 17,43% de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de crianças de 1 a 48 meses com diarréia aguda, examinadas no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

A partir do estudo realizado inicialmente para detecção de *Torovírus* em espécimes fecais de crianças com diarréia aguda e persistente de uma cidade urbana brasileira foi demonstrado comumente o isolamento de *Cryptosporidium* spp. (KOOPMANS *et al.*, 1997).

Em 310 crianças de 2 a 60 meses em creches de Campinas-SP, o *C. parvum* foi detectado em 6,4% das crianças entre 7 a 20 meses sem diferença de sexo, com a possível transmissão por parentes destas crianças que trabalhavam em postos de saúde (73,6%) (FRANCO & CORDEIROS, 1996).

II.2. Surto de veiculação Hídrica

A determinação da potabilidade das águas devido à ausência do grupo coliformes e *E. coli*, vem sendo questionada (CRAUN, 1990), alertando para a possível inadequabilidade dos padrões microbiológicos de qualidade da água (BATIK *et al.*, 1983; CRAUN, 1990), uma vez que epidemias de gastroenterites, hepatites (WILSON *et al.*, 1982; BLOCH *et al.*, 1990; MACKENSIE *et al.*, 1994; KRAMER *et al.*, 1996), giardíase e criptosporidiose (HAYES *et al.*, 1989; SMITH *et al.*, 1989; SMITH & SMITH, 1990) têm sido descritas em comunidades onde estes indicadores encontravam-se adequados.

PAYMENT *et al.* (1997), a partir de um estudo realizado de setembro de 1993 a dezembro de 1994, demonstraram que 14 a 40% das doenças gastrintestinais são provenientes do consumo de águas, com padrões adequados aos determinados pela regulamentação Norte Americana referente a cloração das águas e o número de coliformes.

O *C. parvum* tem sido reconhecido mundialmente como um dos maiores contaminantes das águas de consumo. A descrição da contaminação dos recursos hídricos pela presença de oocistos, provavelmente de origem humana e animal, estão freqüentemente associadas a surtos diarréicos e conseqüentemente a altos índices de morbidade e mortalidade, atingindo preferencialmente imunocomprometidos e crianças, mas também imunocompetentes e animais.

Nos Estados Unidos, o *C. parvum* é considerado uma das maiores causas de infecções intestinais pelo consumo de águas, levando um dos maiores órgãos de proteção e vigilância ambiental do país, a USEPA, à tentativa de desenvolver, nos últimos cinco anos, métodos para pesquisa e controle deste contaminante biológico (FAYER, 1997).

Rios, lagos e águas subterrâneas foram todos implicados como fontes de criptosporidiose, e a ocorrência de infecções pelo consumo de água tratada sugerem a ineficiência dos processos convencionais de tratamento de água e despertam a

preocupação para manutenção e preservação dos pontos de captação da água a ser tratada para o abastecimento público.

O programa de vigilância das doenças de veiculação hídrica (WBDOs), mantido pelo *Center for Disease Control* e a USEPA, divulgou a ocorrência de 162 epidemias de veiculação hídrica associadas a águas de consumo, atingindo 455.531 pessoas, e 158 epidemias relacionadas a águas recreacionais, acometendo, aproximadamente, 12.016 pessoas de 1986 a 1996, nos Estados Unidos, sendo 38 ocasionadas por *Cryptosporidium*, com 426.274 indivíduos doentes (MOORE *et al.*, 1993; KRAMER *et al.*, 1996; LEVY *et al.*, 1998). As cinco maiores epidemias documentadas, destacando-se a de Milwaukee (403 mil infectados), tiveram como causa a contaminação dos corpos de água (rios, lagos, águas subterrâneas e águas tratadas destinadas ao consumo) por águas de esgoto ou por algum tipo de falha durante tratamento de águas (FAYER, 1997).

No Reino Unido, de 1983 a 1998, epidemias de criptosporidiose de veiculação hídrica foram registradas, acometendo, aproximadamente, 2 mil pessoas. Na Inglaterra e no país de Gales, de janeiro de 1992 a 31 de dezembro de 1995, 26 epidemias de veiculação hídrica foram notificadas, 14 implicando o *Cryptosporidium* pelo consumo de águas ou contato com águas de piscina contaminadas por oocistos (FURTADO *et al.*, 1998).

Segundo CRAUN *et al.* (1999), as informações referentes aos surtos de veiculação hídrica não apresentam a dimensão real do problema, uma vez que estes não são corretamente documentados, são inadequadamente investigados e, em alguns casos, não são relatados ou podem simplesmente não serem reconhecidos.

II.3. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em esgoto

A presença de *Cryptosporidium* spp. no meio ambiente é demonstrada pela ocorrência de seus oocistos. MADORE *et al.* (1987), examinando águas de esgoto bruto do Arizona, descreveram as densidade de 850 a 13.700 oocistos/L em efluentes tratados de 140 a 3.960 oocistos/L. De LEON *et al.* (1988), também examinando amostras de esgoto bruto, encontraram de 521 oocistos/L a 39.7 oocistos/L, respectivamente.

Nos Estados Unidos, a densidade de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de esgoto bruto estão na ordem de 4 a 5.180 oocistos/L, e em efluentes tratados por lodos ativados, de 4 a 1.297 oocistos/L. Em efluentes tratados por lodos ativados e laguna de estabilização do Reino Unido e do Oeste da África, o número de oocistos detectados variaram de 3.3 a 8.51 à 1×10^3 a 2×10^4 oocistos/L (SMITH & ROSE, 1990).

No Brasil, as pesquisas de *Cryptosporidium* em amostras ambientais são recentes e encontra-se em fase de expansão.

NEWMAN *et al.* (1994), em Fortaleza, e GAMBA *et al.* (1997), no município de Itaquaquecetuba-SP, descreveram a ocorrência de *Cryptosporidium* em águas de poços utilizadas para o consumo, observando a ocorrência de 22,2% (18) e 100% (8) do total de amostras analisadas, respectivamente.

No distrito de Perus, em São Paulo, TOMPS (1998) observou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em 50% das 6 amostras de águas de consumo analisadas.

MULLER (1999), demonstrou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 74,45% das águas de dois mananciais que abastecem duas estações de tratamento de águas na região metropolitana de São Paulo e confirmou a eficiência do tratamento aplicado nestas águas para apenas uma das estações, uma vez que 22,91% das amostras de águas tratadas foram positivas para este patógeno.

Em Araras- SP, a ocorrência e circulação do *Cryptosporidium* spp. foi descrita por DIAS JÚNIOR (1999) que verificou 100% de positividade nas águas de esgoto analisadas com densidades de 472 oocistos/L e em 58,4% das águas superficiais.

II.4. Métodos de Detecção em Amostras Ambientais

O reconhecimento do *Cryptosporidium* spp. como um agente infeccioso potencialmente de veiculação hídrica, pela descrição de diversos surtos associados ao consumo ou contato com águas contaminadas por seus oocistos, gerou um grande interesse na pesquisa de sua prevalência em amostras de águas (BUTLER & MAYFIELD, 1996) e no desenvolvimento de metodologias mais sensíveis, simples, econômicas, rápidas, reprodutíveis e específicas para sua detecção nestas amostras, uma vez que não há um método padronizado para o seu estudo (JAKUBOWSKI *et al.*, 1996).

As metodologias que vêm sendo utilizadas para detecção destes organismos na água baseiam-se na concentração dos oocistos de *Cryptosporidium* presentes nestas amostras seguido da sua detecção. Como estes podem ocorrer em baixas densidades no meio ambiente (JAKUBOWSKI *et al.*, 1996), métodos de concentração por filtração, utilizando membranas de diferentes materiais e diferentes porosidades, centrifugação, cartuchos filtrantes ou ainda precipitação química, foram descritos e propostos para sua pesquisa.

Muitos trabalhos descreveram a filtração de grandes volumes de água através de cartuchos de fibra de vidro e resina ou nylon (LeCHEVALIER *et al.*, 1995; JAKUBOWSKI *et al.*, 1996) e uma ampla variedade de resultados que podem ou não confirmar a eficiência de recuperação de oocistos por este método. CLANCY *et al.* (1994) observaram, ao inocular quantidades conhecidas de oocistos, que a recuperação pelo método utilizando cartuchos era pouco eficiente, com níveis de 9% para cistos de *Giardia* e 3% para oocistos de *Cryptosporidium*, enquanto LeCHEVALIER *et al.* (1991) descreveram que estes resultados podem ser variáveis dependendo do tipo de amostra analisada.

A filtração utilizando membranas tem sido descrita como método eficiente para pesquisas de oocistos de *Cryptosporidium* em amostra de água tratada, devido a menor turbidez destas amostras que permite maior tempo para saturação das membranas, favorecendo a concentração de um maior volume de água. Métodos utilizando membranas de policarbonato (ONGERTH & STIBBS, 1987; HANSEN & ONGERTH,

1991) ou acetato de celulose (ALDOM & CHAGLA, 1995; GRACZYK *et al.*,1997) foram descritos com índices de recuperação de oocistos, em torno de 5% a 50% para policarbonato, e de 70,5% a 77,7% para acetato de celulose.

Segundo BUTLER & MAYFIELD (1996) e GRACZYK *et al.* (1997), as membranas filtrantes têm demonstrado maior eficiência na recuperação de oocistos, facilidade e segurança na manipulação de amostras, além de permitirem estudos de viabilidade e infectividade dos oocistos, o que representa um importante aspecto para a epidemiologia.

De acordo com VESEY *et al.* (1993), um dos problemas da concentração por filtração é a compactação de partículas sob ou ao redor dos oocistos encobrendo-os e, conseqüentemente, resultando em falsos negativos, ou mesmo no acúmulo de partículas autofluorescentes, como as algas, resultando em falso positivo durante a detecção de oocistos por imunofluorescência ou citometria de fluxo. Deste modo, foi proposto um método de concentração de volumes de 10L de água por precipitação e floculação química de carbonato de cálcio, contornando, assim, estas dificuldades, por este causar menos compactação e agregação de partículas, além de ser mais simples, econômico e apresentar uma recuperação de 76% para água deionizada, 73,7% para água de torneira e 75,6% para águas de rio.

TOMPS (1998), DIAS JÚNIOR (1999), RÉ (1999) e MULLER (1999) também verificaram bons resultados a partir do emprego da floculação de carbonato de cálcio em amostras de águas de consumo, de esgoto e esgoto tratado.

Uma metodologia (nº1623) foi proposta pela USEPA e tem sido utilizada como alternativa para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em volumes de 10L de amostras de águas superficiais ou de outros tipos, e consiste na concentração deste volume por filtração, seguido de purificação por separação imunomagnética, detecção dos oocistos por imunofluorescência e confirmação por microscopia de contraste de fase ou coloração com 4'6- diamidino -2-fenilindol (DAPI) (EPA, 1999).

ZUCKERMAN *et al.* (1999) também indicaram como método alternativo de concentração para grandes volumes de água, a centrifugação de fluxo contínuo, com

deposição de sedimento no fundo do tubo de centrífuga, aspiração do sobrenadante e análise por imunofluorescência em até duas horas, com recuperação de até 90% dos oocistos inoculados nas amostras avaliadas, sendo comparado como tão eficiente quanto o método de floculação e precipitação de carbonato de cálcio proposto por VESEY e colaboradores (1993), e de superior qualidade frente à concentração por cartucho, podendo ser utilizado com praticidade por ser compacto, móvel, flexível e reproduzir bons resultados.

Da comparação entre a utilização de cartucho de 1µm de porosidade, membrana de policarbonato e um ultrafiltro de fibra, foi observado que todos poderiam ser usados para pesquisa de oocistos, com alta recuperação de *Cryptosporidium* em amostras de água (SIMMONS *et al.*, 1999).

A detecção de *Cryptosporidium* está primordialmente associada à visualização dos oocistos por microscopia de imunofluorescência, acompanhada muitas vezes em amostras de alta turbidez de um processo de purificação feito por separação imunomagnética, gradiente de densidade de Percoll-sucrose ou soluções de sais (JAKUBOWSKI *et al.*, 1996).

A citometria de fluxo em conjunto com a separação imunomagnética têm reduzido o tempo necessário para o processamento das análises das amostras de água, isto por que reduzem o número de partículas interferentes presentes no meio que poderiam se ligar de maneira inespecífica ao anticorpo, dificultando a análise por imunofluorescência e também por concentrarem o número de oocistos presentes nas amostras (VESEY *et al.*, 1993b e 1994; STINEAR *et al.*, 1996; DENG *et al.*, 1997).

Métodos genéticos baseados na detecção do ácido nucleico de *Cryptosporidium*, como a técnica de reação polimerásica em cadeia (PCR), têm sido desenvolvidos para amostras ambientais (LAXER *et al.*, 1991; JOHNSON *et al.*, 1993; BEJ & MAHBUBANI, 1994; MAYER & PALMER, 1996) a fim de melhorar a efetividade na detecção de oocistos e otimizar o processo, tornando-o mais rápido e sensível (JAKUBOWSKI *et al.*, 1996; JOHNSON *et al.*, 1995). Porém substâncias como ácido húmico, presentes geralmente em amostras ambientais, podem inibir e alterar as reações

por PCR, sendo ainda necessário um aprimoramento desta técnica (JAKUBOWSKI *et al.*, 1996).

Entretanto, a eletroquimioluminescência, tem sido descrita como um método simples, de fácil execução e alta reprodutibilidade dos resultados, além de ser quantitativa e não requerer análise microscópica e ser específica para *C. parvum*, detectando até 1 oocisto em 1 ml de amostra com uma turbidez de até 10.000 NTU (LEE *et al.*, 1997).

Apesar de uma grande variedade de estudos mais sofisticados estarem sendo realizados e testados para pesquisa de oocistos em água como citometria de fluxo, cultura de células, métodos colorimétricos, ELISA, PCR, métodos imunoenzimáticos e eletroquimioluminescência, a imunofluorescência permanece como um dos métodos mais indicados para pesquisa de *Cryptosporidium* (VESEY *et al.*, 1993b; LEE *et al.*, 1999; FAYER, 1997).

A determinação da viabilidade dos oocistos detectados é considerada indispensável para a confirmação dos riscos para este patógeno, uma vez que somente oocistos viáveis e infectantes podem se constituir em problemas à saúde, sendo, entretanto, incipientes os métodos e estudos com este intuito.

Capítulo III

MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Introdução

O tratamento da água redonda numa série de metodologias de prevenção de doenças de veiculação hídrica. Há um amplo reconhecimento de que parasitos protozoários são mais resistentes à desinfecção que bactérias ou vírus. Por conseguinte, em adição à desinfecção, tem sido recomendada a filtração para assegurar a remoção de cistos de protozoários. Os oocistos de *Cryptosporidium* são menores que os cistos de outros protozoários, menores que outros coccídeos com um diâmetro de 4 a 5 μm e possuem forma esférica ou levemente ovóide (CLANCY & HANSEN, 1999).

O manual da *Surface Water Treatment Rule* (SWTR) da (USEPA) estabelece o tratamento conveniente e de fácil operação. Uma coagulação convencional, sedimentação e filtração que tem o poder de remover 2,5 log. Filtração direta, filtração lenta com areia assume 2,0 log de remoção. Uns dos problemas com a aplicação de SWTR é que a concentração de oocistos na água bruta é desconhecida. Ademais não tem indicadores de concentração de parasitos neste tipo de água. Outro problema é que tem pouco critério operacional que pode ser usado para determinar dentro dessa ampla escala da estação de tratamento uma adequada remoção do parasito.

Segundo LeCHEVALLIER & NORTON (1992) em alguns casos quando ocorre um incremento na turbidez da água bruta, a estação de tratamento responde proporcionando maior grau de coagulação ou eficiência de filtração. ONGERTH & PECORARO (1995) relatam sobre a remoção de partículas na filtração e na remoção de partículas específicas, em especial, oocistos de *Cryptosporidium*, que podem estar limitadas a fator de comportamento. Isto inclui, características determinadas por tamanho das partículas, forma, gravidade específica, concentração de partículas e carga de superfície.

A interação entre partículas e sua habilidade para ser floculada e removida por filtração depende, em parte, da carga de superfície que é indicado pelo zeta potencial. A

carga de superfície de muitas partículas em água de superfície com pH neutro é negativo. O zeta potencial de oocistos medidos na água destilada situa-se na faixa de – 25 mv com pH =7.0. Adicionalmente, as cargas tanto em cistos como em oocistos podem ser neutralizadas pela adição de íon hidrogênio, análogo à neutralização das cargas ocorre uma coagulação convencional usando metais como o ferro ou alumínio.

A linha geral sobre a qualidade da água é a proteção à saúde pública, visando assegurar a confiabilidade do fornecimento através da eliminação ou redução a concentrações mínimas de contaminantes biológicos, sabidamente perigosos à saúde. Água pura é um produto artificial, assim as águas naturais possuem substâncias em sua composição, em solução ou em suspensão, em proporções muito variadas, podendo modificar consideravelmente as propriedades, os efeitos e os usos.

A água de uso hospitalar deve ter suas características físico-químicas e biológicas controladas e dentro de parâmetros de qualidade definidos. Deve estar isenta de microrganismos e com os constituintes químicos dentro dos limites preconizados. Deve ser avaliada levando-se em consideração que a mesma deve atender aos seguintes aspectos:

- Não carrear poluentes além dos níveis permitidos;
- Receber tratamento prévio dos resíduos ou agentes poluidores;
- Possibilitar a detecção e correção de perigos potenciais no que se refere a patógenos;
- Não ser contaminada em qualquer parte do seu ciclo, por despejos radioativos ou metais pesados provenientes dos laboratórios.

O *Cryptosporidium* está presente no ambiente na forma de oocistos que lhe confere a capacidade de sobreviver sob as mais variadas condições ambientais. Entretanto os esporozoítos ao desencistar morrem rapidamente quanto expostos a condições diferentes daquelas encontradas nos seus hospedeiros (CLANCY & HANSEN, 1999).

Os oocistos são capazes de sobreviver por longos períodos na água (176 dias), incluindo a água do mar (35 dias), suportando ampla variação de temperatura. A luz natural do sol não altera a viabilidade dos oocistos, porém, estes são sensíveis à desidratação (SZEWZYK *et al.*, 2000).

A ocorrência de oocistos em esgotos é influenciada pelo tamanho da comunidade, assim como a variação microbiana neste efluente. Embora seja alto o número de oocistos que possa ser encontrado no esgoto bruto, em geral, a descarga destes em efluentes é baixa. Contudo é evidente que esta é uma fonte significativa de contaminação no ambiente, constituindo risco em potencial para infecções em homens e animais. Além disso, muitas águas superficiais destinadas a diferentes usos (abastecimento, irrigação, recreação) recebem despejos de esgotos (TEUNIS & HAVELAAR, 2002).

III.2. Métodos de detecção

III.2.1. Métodos de detecção de oocistos em fezes

A identificação de oocistos de *C. parvum* em fezes envolve concentração para logo sua posterior identificação.

III.2.1.1. Método de Ritchie ou Formol-éter

O método de RITCHIE consiste em misturar 1 volume de fezes com 10 volumes de água corrente. Coar em gaze em um tubo de centrífuga de 15 ml. Centrifugar a 2000 rpm, por 1 minuto, decantar o sobrenadante e lavar o sedimento com água corrente. Repetir a centrifugação, a lavagem e decantar novamente o sobrenadante. Adicionar 10 ml de solução formol a 7,5% no sedimento obtido, mantendo em repouso durante 20 a 30 minutos. Adicionar, então, 3 ml de éter e agitar vigorosamente. Centrifugar a 400 g durante 1 minuto. Limpar os detritos superficiais da parede o tubo com um bastão e decantar a mistura sobrenadante. Este método foi utilizado, inicialmente, para obtenção de cistos de protozoários (PESSOA & MARTINS, 1977). O método de RITCHIE (1948) foi modificado por RIDLEY & HAWGOOD (1956) utilizando-o para concentração de cistos e ovos de parasitos, sendo adaptado mais tarde para concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

O fundamento deste método baseia-se no mesmo princípio da centrífugo-sedimentação, para obtenção dos oocistos, por meio do sistema formol-éter.

III.2.1.2. Concentração pelo açúcar de Sheather

Este método é simples e seu procedimento faz-se misturando fezes em partes iguais com solução fisiológicas (NaCl a 0,9%). Homogeneizar bem e filtrar a suspensão em gaze dobrada em quatro partes. Recolher o filtrado em um tubo de centrífuga, colocando somente até sua metade. Encher completamente o tubo com solução saturada de açúcar. Cobrir o tubo com parafilme. Homogeneizar bem por agitação e centrifugar a

400 g por 5 minutos. Os oocistos de *Cryptosporidium* são encontrados na parte densa da solução saturada de açúcar (OLIVEIRA & ROCHA, 2000).

III.2.1.3. Concentração pelo sulfato de zinco modificado (Larsh)

Esta técnica consiste em retirar uma pequena quantidade de fezes da amostra e adicioná-la em sulfato de zinco (ZnSO₄) a 33% e densidade igual 1,18. Triturar bem as fezes, evitando a permanência de detritos e bolha de ar, utilizando um frasco de vidro. Transferir esta mistura para um tubo e adicionar soluto de ZnSO₄ e colocar solução de ZnSO₄ até formação de menisco, de modo que todas as bolhas sejam retiradas e o tubo seja completo até sua superfície total. Colocar uma lamínula, de modo a cobrir toda a superfície da boca do tubo. Após 15 minutos retirar a lamínula, fazendo uso de uma pinça. Colocá-la sobre uma lâmina com o líquido em contato com a mesma (PESSOA & MARTINS, 1977). Variações desta técnica, associada ao método de sedimentação pelo formol-éter e flutuação pelo sulfato de zinco foram descritas por outros autores (ADAM *et al.*, 1971).

III.2.1.4. Concentração pela formalina-etil acetato modificado

Em um tubo cônico de centrifuga de 15ml, colocar 4 ml de suspensão de fezes, adicionar 6 ml de formalina 10% e 3 ml de etil-acetato. Homogeneizar vigorosamente por 30 segundos e centrifugar a 500 g por 5 minutos.

Desta centrifugação resulta 4 fases (de cima baixo): uma fase contendo etil acetato, uma segunda contendo os debrís fecais, uma terceira contendo formalina e a última fase contendo sedimento. O sobrenadante das três fases superiores é decantado e o sedimento é ressuspenso em 5 ml de água deionizada. Adicionar 5 ml de cloreto de sódio saturado (densidade 1,20) sobre o sedimento. Centrifugar a 500 g por 10 minutos. Esta segunda centrifugação resulta em 3 fases (de cima para baixo): uma fase superior composta com pequena quantidade de debrís fecais e oocistos de *Cryptosporidium*, os quais permanecem na superfície da solução saturada de cloreto de sódio, uma segunda fase contendo cloreto de sódio saturado e a terceira fase com o sedimento contendo a

maioria dos debrís fecais. A fase superior, aproximadamente, 3,5 a 4 ml é descartada. O restante contendo os parasitos e, aproximadamente, 0,5 ml da solução de cloreto de sódio é removido e lavado com 13 ml de água deionizada, após centrifugação a 500 g por 10 minutos (WEBER *et al.*, 1992).

III.2.1.5. Separação Imunomagnética

No processo de separação imunomagnética (IMS) de oocistos de *C. parvum* há necessidade do uso de um separador magnético e micro pérolas (MiniMacs magnétic), uma coluna de seleção positiva de gradientes e micro pérolas coloidais de óxido de ferro e de polissacarídeo (*Miltenyi Biotec Inc.*, Alburn, CA, EUA). Dois tipos de micro-pérolas podem ser utilizadas, sendo de 50 nm de diâmetro (Kit-Meridian Diagnostics Inc., Cincinnati, OH, EUA), recoberta por anticorpos monoclonais específicos para o *C. parvum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (anti-FITC) e com anti-IgG de coelho produzido em cabra.

São utilizados dois métodos IMS. No método direto, os oocistos são marcados com um anticorpo monoclonal anti-*C. parvum* produzido em coelho conjugado com FITC, pela incubação da suspensão de oocistos com 50 µl do anticorpo monoclonal, conjugado com FITC a temperatura ambiente, por 30 minutos.

No método indireto, os oocistos são marcados pela incubação com 50 µl de anti-soro de coelho infectado (diluição 1:400 em PBS) a temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida foram lavados com tampão PBS, contendo 0,5% de soro albumina bovina e 2 mM de EDTA, pH 7,2 e incubados com 50 µl anti-IgG de coelho produzido em cabra, conjugado com FITC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Os oocistos são, então, lavados com tampão PBS. Coloca-se 20 µl de micro-pérolas nos oocistos e um adicional de tampão PBS deve ser colocado para completar um volume final de 100 µl. A mistura é incubada a 4°C por 20 minutos. Os oocistos ligados as micro-pérolas serão passados pela coluna de separação magnética. Faz-se, a seguir, a lavagem da coluna por três vezes, utilizando 500 µl de tampão de IMS e o efluente é coletado como fração negativa. A coluna é então removida por um separador magnético

de células e lavada por três vezes, utilizando 500 µl de tampão PBS com a ajuda de bastão, sendo o efluente coletado como fração positiva.

O número total de oocistos purificados pela IMS, nas frações positiva e negativa, podem ser contados em câmara de Neubauer (DENG *et al.*, 2000).

III.2.1.6. Teste de imunofluorescência

III.2.1.6.1. Imunofluorescência direta

Este método foi desenvolvido inicialmente para a detecção de pequenas quantidades de oocistos presentes em amostras de fezes humanas, conservadas em formalina a 10%. Os primeiros relatos na literatura apontam para o uso de anticorpos monoclonais, produzidos a partir de oocistos isolados de pacientes ou da parede celular destes microrganismos (STERLING & ARROWOOD, 1986). A partir de 1992, o uso do Kit comercial Merifluor (*Cryptosporidium-Giardia* direct immunofluorescent detection kit) produzido pela Meridian Diagnostics (Cincinnati, Ohio, EUA) facilitou sua utilização na identificação de oocistos em amostras de fezes.

III.2.1.6.1.1. Utilização de anticorpos monoclonais

Na preparação das amostras para a reação de fluorescência as amostras de fezes são primeiramente tratadas com KOH a 10%, para remoção de muco, lavadas em formalina 10% e centrifugadas a 300 g por 2 minutos. Uma alíquota do sedimento deve ser finamente espalhada em lâminas de microscopia para imunofluorescência, previamente tratadas com glicerol-agar (0,1 g de Agar [Difco Laboratories], 0,5 ml de glicerol e 100 ml de água destilada), previamente fervida para promover adesividade do material, então fixadas em metanol.

Em cada um dos poços contendo as amostras de fezes são adicionadas alíquotas de 5 µl do anticorpo monoclonal (diluição 1:100) e incubados a 37°C por 20 minutos.

As lâminas são lavadas três vezes com PBS. Cinco microlitros (5 μ l) do anticorpo anticamundongo ligado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC, Kirkegaard and Perry Laboratory, inc.) é adicionado em cada poço e incubado a 37°C por 20 minutos. As lâminas são lavadas quatro vezes com PBS e montadas com o glicerol-PBS. As lâminas são examinadas em objetiva de 100 vezes e a confirmação dos parasitos feita em aumento de 250 vezes (GARCIA *et al.*, 1987).

Atualmente, anticorpos monoclonais (oocisto-específico conjugado com FITC) obtidos comercialmente, podem ser utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Assim, as amostras formolizadas são homogeneizadas em vórtex, por 30 segundos. Para cada amostra de fezes, 5 μ l são retirados para a confecção de 3 poços na lâmina de imunofluorescência. As lâminas são secas ao ar por 30 a 45 minutos e 20 μ l do anticorpo monoclonal é adicionado a cada poço incubando-se por 30 minutos, em câmara úmida a temperatura ambiente. As lâminas são lavadas delicadamente com solução tampão, que acompanham o Kit e o excesso é removido com uma delicada batida da lâmina sobre uma superfície, contendo um papel absorvente.

Os oocistos são contados em microscopia de fluorescência em 400 campos. O resultado em número de oocistos deve ser confirmado em objetiva de 40 vezes. O resultado em número de oocistos é obtido pela média da contagem de três poços, correspondentes às triplicatas (VALDEZ *et al.*, 1997).

Após o ano de 1992, outros Kits foram obtidos comercialmente para o teste de imunofluorescência direta. GARCIA & SHIMIZU (1997) avaliaram fezes humanas coletadas em formalina a 10%, concentradas pelo processo de sedimentação etil-acetato e centrifugadas a 500 g por 10 minutos. As lâminas foram previamente tratadas e alíquotas de 10 μ l do sedimento foram finamente espalhadas nos poços das lâminas, secas ao ar e fixadas em metanol.

Para cada teste foram utilizados três Kits diferentes: (i) TechLab *Giardia/Crypto* IF Kit, (ii) TechLab *Crypto* IF Kit, (iii) Meridian Merifluor *Cryptosporidium/Giardia*, sendo este último usado no mesmo ano por VALDEZ *et al.* (1997), de acordo com as instruções do fabricante.

As lâminas devem ser guardadas no escuro, antes de serem lidas, dentro de 1 hora. A observação foi realizada em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, inc., Nova York, EUA) em aumento de 100 vezes e os organismos confirmados em 250 vezes de aumento.

III.2.1.6.2. Imunofluorescência indireta

O método de imunofluorescência indireta pouco foi utilizado para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium*.

STIBBS & ONGERTH (1986) descreveram esta técnica em amostras de fezes humanas, de macacos e em bovinos. As amostras devem ser mantidas sob conservantes (dicromato de potássio) ou não e utilizadas de 1 dia a 6 semanas.

As amostras antes de serem utilizadas devem ser lavadas duas vezes com água destilada, o sedimento obtido pela centrifugação deve ser ressuspensão em água destilada, imediatamente antes de uso. Uma fina camada de cada amostra será preparada em lâminas de microscopia, previamente limpas com álcool, deixadas secar a temperatura ambiente e fixadas em acetona por 5 minutos. O esfregão de cada lâmina deve ser delgado para facilitar a visualização ao microscópio usando um cotonete aplicador. As lâminas devem ser mergulhadas em soro imune de coelho anti-*Cryptosporidium* ou em soro pré-imune diluído a 1:40 em PBS, pH 7,6 e incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e logo após, lavadas com PBS três vezes, por 5 minutos cada. As lâminas devem ser secas ao ar, para adicionar-se o anti-soro de cabra anti-IgG, de coelho conjugado a FITC, na diluição 1:40 em PBS. As lâminas devem ser incubadas novamente a 37°C por 30 minutos.

As lâminas devem ser montadas em glicerol 90% em PBS com p-fenilenediamine a 0,1 mg/ml. As lâminas de imunofluorescência indireta devem ser examinadas em microscópio de fluorescência, em aumento de 400 vezes, com epiiluminação.

III.2.1.7. Teste de ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent Assay)

O uso da técnica de ELISA para identificação de antígenos de *Cryptosporidium* spp. Em amostras de fezes foi realizado por ROSENBLATT & SLOAN (1993) utilizando Kit comercial (LMD Laboratórios). Os autores descreveram o uso de amostras preservadas em formalina ou congeladas a -65°C por até 18 meses.

As amostras mantidas em formalina foram usadas diretamente para o teste, enquanto que as amostras frescas ou congeladas foram diluídas 1:5 em PBS. Antes do uso, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e deixadas sedimentar até que o sobrenadante estivesse claro (cerca de 1 a 3 minutos).

Cinquenta microlitros (50 μl) do sobrenadante foram adicionados em cada poço da placa de ELISA, que continha anticorpo policlonais anti-*Cryptosporidium* e 100 μl do diluente de lavagem do Kit. Controles positivos e negativos foram incluídos. Após 45 minutos a 37°C , os poços foram lavados com a solução de lavagem. Anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* foram adicionados às placas, incubados 20 minutos e lavados. A demonstração da positividade foi feita pela adição de um anticorpo anti o segundo anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase, deixados por 10 minutos de incubação, lavado com o tampão, adicionado o substrato (tetrametil benzidina) para revelar a reação. Um período de 10 minutos foi necessário para o desenvolvimento de coloração (azul para amarelo). O resultado pode ser observado a olho nu ou a leitura pode ser feita em leitor de ELISA. Outros Kits, como o ProSpect Rapid Assay (GRACZIK *et al.*, 1996) e o BIOSITE (Diagnostics, Sam Diego, Califórnia, EUA) foram também utilizados (GARCIA *et al.*, 2000).

O teste de ELISA é também utilizado para detectar antígenos circulantes de *Cryptosporidium* (GOMES-MORALES *et al.*, 1995). Assim, as placas de ELISA são sensibilizadas com anticorpos anti-*Cryptosporidium* produzidos em coelhos infectados com oocistos purificados de fezes de bovino a uma concentração de 64 $\mu\text{g/ml}$ em PBS. As placas são incubadas a 4°C por 48 horas, lavadas três vezes em PBS com 0,05% de Tween-20 e bloqueadas por 1 hora a 37°C com 300 μl de soro fetal bovino a 1%. Soros sem diluição de pacientes e indivíduos controles são adicionados às placas por 4 horas a

temperatura ambiente. Cada poço é lavado três vezes em PBS-Tween a 10%. Anticorpo anti-*Cryptosporidium* conjugado a peroxidase é adicionado, incubado por uma hora a 37°C, lavado, revelado e lido em leitor de ELISA.

III.2.1.8. Citometria de fluxo

Atualmente a citometria de fluxo tornou-se uma excelente ferramenta no diagnóstico de várias infecções pela sua praticidade. Contudo, poucos trabalhos descrevem o uso prático desta metodologia para o diagnóstico da criptosporidiose. Inicialmente, VALDEZ *et al.*, (1997) padronizaram o uso de citometria de fluxo em amostras de fezes. Estas são diluídas 1:4 em formalina e estocadas a 4°C até o momento do uso. Diversas concentrações de oocistos variando de 5 oocistos a 10 oocistos/ml de isolados padrões são adicionados (100 µl) em 900 µl das amostras de fezes. As fezes são submetidas a um vórtex por 30 segundos e deixadas em repouso por 30 segundos. Cem microlitros (100 µl) da suspensão são removidos e adicionados a 900 µl de PBS, passado pelo vórtex, centrifugados a 1.880 g por 30 minutos e o sobrenadante removido. O sedimento contendo os oocistos é ressuspensão em de PBS. Desta suspensão, 180 µl são removidos e misturados a 20 µl de anticorpos monoclonais antioocistos conjugados a FITC, incubados no escuro a 37°C por 1 hora, centrifugados a 1.880 g por 15 minutos. O sobrenadante é descartado e o sedimento misturado em 1 ml de PBS. As amostras são, então, transferidas para tubos de poliestireno e armazenadas a 4°C. As características ópticas dos oocistos purificados são analisadas pelo citômetro de fluxo (Becton Dickinson) pela aquisição de software LYSYS II.

MOSS & ARROWOOD (2001) publicaram o uso da citometria no diagnóstico de criptosporidiose em fezes coletadas e conservadas com dicromato de potássio a 2,5%, num volume final de 1,2 ml e estocadas a 4°C por até 50 dias. No momento do uso, as fezes são adicionadas partículas de látex (BioMag), recobertas com anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* para a captura de oocistos. Assim, 400 µl de amostras são coletadas e transferidas para tubos cônicos de 0,5 ml, centrifugados a 500 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O sedimento é ressuspensão em PBS contendo 0,2% de soro albumina bovina e 0,02% de azida sódica. O material é

centrifugado e lavado até o dicromato de potássio ser visível. O sedimento contendo os oocistos é ressuspensão em 400 µl de PBS/BSA contendo 30 µl das partículas recobertas pelo anticorpo monoclonal, incubado por 1 hora a 4°C sob agitação. As pérolas contendo os oocistos são recuperadas como descrito no item III.2.1.5.

Os oocistos purificados são submetidos à dupla coloração. As amostras são ressuspensas em 200 µl de PBS/BSA e coradas simultaneamente com anticorpo monoclonal (OW50) marcado com peroxidase e FITC por 1 hora a 4°C no escuro. Lavados uma vez em PBS/BSA, mantidos cerca de 50 µl do sedimento e adicionando 750 µl de PBS. Desta suspensão, 700 µl são adicionados pérolas de poliestireno fluorescentes para quantificação dos oocistos. Os tubos devem ser estocados a 4°C no escuro para análise por citometria de fluxo dentro de 48 horas.

III.2.1.9. Reação polimerásica em cadeia (PCR)

Durante os últimos anos, progressos consideráveis têm sido realizados em relação à identificação de *C. parvum* por PCR em amostras clínicas e ambientais. Da mesma forma, o sequenciamento do DNA do *C. parvum* tem sido utilizados com sucesso a partir de oocistos obtidos de amostra de fezes em água.

A extração de DNA das fezes humanas subsequente a detecção por PCR foi demonstrada por ZHU *et al.* (1998), coletando amostras recentes de 1 a 3 dias, fixadas em formalina ou conservadas por até 2 anos. Em todas as amostras contendo 1ml de suspensão de fezes, são adicionados 0,5 ml de Hemo-DE (Fisher, Pittsburg) para remoção de lípidos e polissacarídeos, homogeneizados em vórtex por 1 minuto e centrifugando-se a 20.000 g por 5 minutos. O sobrenadante e a interface devem ser descartados e o sedimento ressuspensão em 1,5 ml de água. Submeter novamente a um vórtex e proceder à centrifugação. O sobrenadante é descartado e o sedimento ressuspensão em 0,8 ml de DNAzol (Molecular Research Center, Cincinnati), transferindo para um outro microtubo com pérolas de vidro homogeneizadas (MiniBeadbeater-8 cell disrupter, Biospec Products) por 2 minutos. Para a completa lise dos esporozoítos de *C. parvum* fixados em formalina, faz-se necessário incubar o material a uma temperatura

de 90°C por 30-60 minutos, centrifugando-se em seguida a 3.000 g por 5-10 minutos. O lisado deve ser novamente centrifugado a 20.000 g por 10 minutos e o sobrenadante removido para um microtubo contendo 10 µl de “*poliacril carrier*”, sendo o DNA precipitado pela adição de 0,5 ml de etanol absoluto. O sedimento deve ser lavado com etanol a 95%, seco ao ar, redissolvido em DNAzol e centrifugado por 10 minutos para remoção dos materiais insolúveis. A seguir, o sedimento deverá ser lavado duas vezes com etanol 95%, seco ao ar e dissolvido em 90 µl de NaOH a 8mM, pH 8,0, ajustado pela adição de 10 µl de tampão HEPES, devendo ser estocado a -20°C.

Dois “*primers*” devem ser utilizados para a detecção do DNA de *C. parvum*, o CF291 e CR201, específico para o gênero de *Cryptosporidium* e o outro CPF202 e CPR202 específico para o *C. parvum*, amplificando 540 e 165 pares de base, respectivamente. Para a reação primária de amplificação deve usar-se 50 µl.

III.2.1.10. Microscopia Eletrônica

ENTRALA *et al.* (2001), utilizando a microscopia eletrônica, foram capazes de demonstrar a incorporação de moléculas pela parede externa do oocisto através de um processo que, aparentemente, não envolvia a presença de corpos formadores de parede, uma vez que esta parede estava totalmente desenvolvida.

Na purificação de oocistos as amostras fecais são obtidas de bezerros recém-nascidos, infectados com *Cryptosporidium*, diluídas em solução salina (NaCl a 0,9% p/v) e filtradas em filtros de poro de 1mm, para remoção de material grosseiro. Os oocistos são purificados usando o gradiente cloreto de cério e colocados em solução salina a 4°C, até serem utilizados.

Na microscopia imuno eletrônica os oocistos purificados de *C. parvum* são fixados em solução de glutaraldeído-formaldeído a 2% (v/v) em 50 mM de tampão cacodilato (pH 7,4) por 2 horas a 4°C. A amostra é, então, lavada com o mesmo tampão, desidratada em etanol e embebida em Spurr (Sigma) por 12 horas. Após a polimerização por 16 horas a 60°C, fazem-se cortes ultrafinos, usando lâminas de diamante,

colocando-os sobre grades de níquel. Estes cortes são colocados em soro albumina bovina a 1% em PBS (PBSA p/v) por 4 horas a 4°C. Em seguida, colocam-se os cortes incubados com anticorpo monoclonal anti-*Cryptosporidium* (OW3 Merifluor™ – *Cryptosporidium* Kit, Meridian Diagnostic Inc., Sterling & Arrowood, 1986) que reconhece o antígeno de parede de oocisto de 200 kDa, diluído 1:5 em PBSA, incubando por 1 hora a temperatura ambiente.

Após o processo de lavagem com PBSA, os cortes são incubados em soro de cabra anti-IgM murino, conjugado com 10 nm de pérolas de ouro (Sigma) diluído 1:100 em PBS, adicionando 0,1% de BSA, 0,05% de Tween 20 e 5% de soro fetal bovino, por 1 hora a temperatura ambiente. As grades secas são coradas com acetato de uranil a 3% em água, antes de serem observados pela microscopia eletrônica. Os cortes controles são incubados com soro de camundongos não infectados e um anticorpo monoclonal IgM de camundongo contra IgG1 de rato (Sigma).

Para visualização de componentes estruturais de paredes de oocistos de *C. parvum* pela microscopia eletrônica, necessita-se da digestão proteolítica de sua parede utilizando-se pepsina, tripsina e proteinase K. As amostras são preparadas sobre um filme de carbono, coradas com molibdato de amônio a 0,5%, 1,0% e 2% (p/v, pH 7,0), fosfotungstato de sódio (pH 7,0) e observadas pela microscopia eletrônica de transmissão (HARRIS & PETRY, 1999).

III.2.1.11. Detecção por coloração

III.2.1.11.1. Coloração pela Giemsa

Esta técnica consiste em fazer um esfregaço do material concentrado de fezes em lâminas e fixar em metanol por 3 minutos. Deixar secar e processar a coloração, diluindo 3 gotas do corante em 2 ml de água destilada livre de ácidos ou em solução tampão PBS, em pH 7,2, agitando-se bem. Colocar esta solução sobre a lâmina fixada, por 15 minutos. Descartar o corante e lavar a lâmina com água destilada até obtenção de cor rósea. Secar em papel absorvente. Examinar ao microscópio óptico em objetiva de

10 vezes, confirmando em objetiva de 40 vezes de aumento (PESSOA & MARTINS, 1977).

III.2.1.11.2. Coloração Ziehl- Neelsen modificada

Utilizando o concentrado obtido, faz-se um esfregaço delgado e homogêneo em lâminas de microscopia. Após isso, é deixado secar ao ar e posteriormente é fixado em metanol por 5 minutos. Deixar secar ao ar a temperatura ambiente. A seguir, corar com carbolfucsina por 5 minutos e processar as lavagens, utilizando primeiramente álcool etílico a 50% e a seguir água corrente. Descorar a lâmina mergulhando-a em álcool-ácido a 1% (ácido clorídrico concentrado em álcool etílico 95%). Lavar novamente em água corrente e contracorar com azul de metileno por 1 a 5 minutos. Lavar em água corrente e deixar as lâminas secarem ao ar. Examinar ao microscópio óptico em objetiva de 10 vezes, confirmando em objetiva de 40 vezes de aumento e, se necessário, em objetiva de imersão em aumento de 1.000 vezes (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981). A combinação de carbolfucsina e dimetilsulfóxido (DMSO) também pode ser utilizada para corar oocistos de *C. parvum* em material fecal (BRONSDON, 1984).

III.2.1.11.3. Coloração ácido-resistente com tricromo

As fezes conservadas em solução contendo 15 g de acetato de sódio, 20 ml de ácido acético e 40 ml de formalina em 925 ml de água destilada (solução SAF), são concentradas pelo método da sedimentação pela formalina-etil acetato, com centrifugação a 650 g por 10 minutos. Uma alíquota de 0,01 ml do sedimento é finamente espalhada em lâminas, que após secagem, imediatamente fixadas em metanol, por 5 minutos.

As lâminas fixadas são coradas com carbolfucsina (25 g de fenol, 500 ml de água destilada, 25 ml de solução de fucsina alcoólica saturada, 2 g de fucsina básica em 25 ml de etanol a 96%), por 10 minutos sem aquecimento. Em seguida, as lâminas são lavadas em água corrente e descoradas com álcool-ácido (0,5% de ácido clorídrico em álcool).

Uma segunda coloração é feita a seguir com solução Trichrome Didier¹ s por 30 minutos a 37°C, previamente preparada com 6 g de Chromotrope 2R (Sigma), 0,5 g de anilina azul (Merck) e 0,7 g de ácido fosfotúngstico (Sigma) em 3 ml de ácido acético a temperatura ambiente por 30 minutos, adicionado, em seguida, 100 ml de água destilada e ajustando o pH para 2,5 pela adição de ácido clorídrico a 2 N. As lâminas são lavadas com etanol a 95% por 30 segundos. Após a secagem, as lâminas são examinadas com óleo de imersão em aumento de 1.000 vezes (IGNATIUS *et al.*, 1997).

III.2.1.11.4. Coloração pela Safranina (1)

Na concentração dos oocistos foram utilizados os métodos pela flutuação de açúcar-fenol e pela sedimentação utilizando formol-éter, juntamente com a flutuação pelo sulfato de zinco.

A técnica de coloração pela safranina-azul de metileno consiste em fazer um esfregaço do concentrado, de espessura delgada em lâminas de microscopia. É usada uma diluição do esfregaço com solução salina, quando necessário. Após a secagem das lâminas ao ar, são fixadas rapidamente, passando através de uma chama de bico de bunsen. A fixação é realizada em ácido clorídrico a 3% em metanol 100%, por 3 a 5 minutos. Em seguida, coradas com safranina a 1% e lavadas com água corrente em água destilada por 60 segundos. O aquecimento por toda a lâmina é feito, até emissão de vapores, tomando cuidado para não ocorrer à fervura do corante. Mais corante é adicionado, quando necessário e o aquecimento continuado. A safranina que estava sobre a lâmina é descartada e lavada em água corrente. As lâminas são contracoradas com azul de metileno 1% por 30 segundos, lavadas novamente em água corrente e deixadas secar para que possam ser examinadas em microscópio, usando objetiva 20 vezes de aumento (BAXBY *et al.*, 1984).

III.2.1.11.5. Coloração pela safranina (2)

As amostras de fezes são coletadas e conservadas em formol a 10%. As fezes são concentradas pelo método de RITCHIE. As lâminas são preparadas com o

concentrado obtido e fixadas em metanol por 5 minutos. Em seguida, as lâminas são cobertas com safranina 1% (1 g de safranina em 100 ml de água destilada), aquecendo-se até despreendimento de vapores por duas vezes, deixando-as em contato com a safranina durante 15 minutos. As lâminas são lavadas rapidamente em água corrente e descoradas com metanol-ácido (3 ml de ácido clorídrico em 97 ml de etanol) por 5 -10 segundos, lavadas novamente em água corrente e colocadas em estufa a 37°C durante 90 minutos, em recipiente contendo cromotrope (6 g de cromotrope 2 R, 0,15 g de Fast-green, 0,7 g de ácido fosfotúngstico, 3 ml de ácido acético em 100 ml de água destilada).

As lâminas são mergulhadas em álcool-ácido (0,45 ml de ácido acético em 99,55 ml de álcool etílico 90%) por 5 a 10 segundos. As lâminas são passadas rapidamente em álcool etílico 95%, e em seguida, deixada por 5 minutos álcool na mesma graduação. A seguir, a desidratação é feita por 5 minutos em álcool absoluto e o clareamento em xilol por 10 minutos. As lâminas são secas e examinadas em microscópio no aumento de 1.000 vezes (PONCE de LEÓN *et al.*, 1999).

III.2.1.11.6. Coloração fluorescente Auramina O-fenol

Esta técnica é utilizada fazendo os esfregaços em lâminas, usando um concentrado de oocistos, fixando-os pelo calor rapidamente. A coloração é feita pela imersão das lâminas em auramina O-fenol (auramina O 0,1%; fenol 3% e etanol 9,5%) por 15 minutos. A descoloração é feita em solução de ácido clorídrico 0,5% em etanol 70%, por 2 minutos. As lâminas são lavadas com água corrente. Contracorar com permanganato de potássio 0,5% em água destilada, por 3 minutos. Em seguida, lavar novamente as lâminas. Secar e examinar em microscópio de fluorescência em aumento de 100 vezes (STIBBS & ONGERTH, 1986).

III.2.2. Detecção de oocistos em água

Para a recuperação de oocistos em amostras de água o método envolve três etapas:

- Concentração das amostras de água, para recuperar o baixo número de parasitos tipicamente encontrados no ambiente;
- Purificação; para separar os oocistos dos resíduos que possam interferir na fase de detecção;
- Detecção dos oocistos pela utilização de anticorpos monoclonais.

III.2.2.1. Concentração por dissolução da membrana filtrante

A filtração pode ser feita em campo, utilizando-se um suporte de membrana de aço inoxidável, mangueiras e conexões previamente esterilizadas, ligadas a um hidrômetro. A vazão para a coleta deve ser controlada, quando possível, em aproximadamente, 4 l/min. A amostra é filtrada através de uma membrana de acetato de celulose de 293 mm de diâmetro e 1,2 µm de porosidade. Após a filtração, a membrana é transferida para um saco de polipropileno estéril e mantida sob refrigeração durante o transporte até o laboratório.

Adiciona-se a membrana 200 ml de acetona (Merck), Homogeneiza-se por 15 minutos e adiciona-se, então, mais 200 ml de acetona, homogeneizando por mais 15 minutos. Transfere-se o volume total para tubos de centrifuga de 250 ml.

Logo as amostras passam por centrifugação a 650 g durante 15 minutos a 10°C. Aspira-se o sobrenadante através de um sistema de sucção a vácuo descartando o sedimento, adicionando-se 200 ml de etanol 95% (Merck). Homogeneiza-se e depois se centrifuga a 650 g por 15 minutos a 10°C. Descarta-se o sobrenadante do mesmo modo descrito anteriormente e o sedimento deve ser ressuspendido em 200 ml de etanol 70%

(Merck). O volume é transferido para um único tubo de centrifuga. Centrifuga-se, novamente, sob as mesmas condições, descartando o sobrenadante e adicionando-se ao precipitado 200 ml de solução eluente. Esse volume logo é colocado em tubos de centrifuga cônicos de 50 ml. Segue, então, uma nova centrifugação obedecendo aos padrões anteriores, vertendo-se o sobrenadante, concentrando o volume em um único tubo após a lavagem dos mesmos com solução eluente. Centrifuga-se a 650 g por 15 minutos, descartando o sobrenadante e reservando um volume final de aproximadamente 10 ml, dependendo da densidade da amostra. Posteriormente, 10 μ l da amostra é transferido para lâmina, para logo detecção de oocistos por imunofluorescência (IFA). O restante das amostras após a realização da IFA pode ser mantido em tampão formalina 10% a 4°C.

III.2.2.2. Concentração por filtro de cartucho

Este sistema também pode ser realizado em campo pela filtração das amostras utilizando filtros de cartucho de fios de polipropileno de 1 μ m de porosidade. A água passa uma velocidade média de fluxo de 8-10 l/min, podendo filtrar-se até mais de 1.000 litros. A **figura 4** denota o processo por filtração em cartucho.

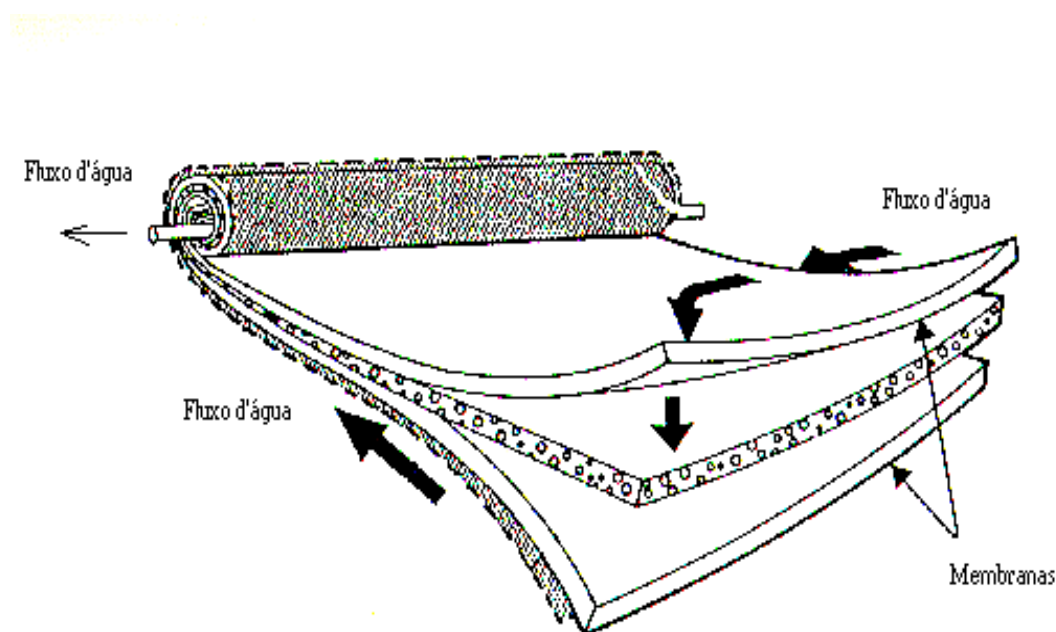


Figura 4. Concentração de oocistos de *C. parvum* por filtro de cartucho

Após a filtração o filtro é transferido sob refrigeração durante o transporte e devem ser processados dentro de um período de 24 horas no laboratório. O filtro é cortado até sua parte central deixando os fios com uma largura de 8 -10 cm. Para desprender os oocistos, os fios do filtro são lavados a mão com 2 l de solução eluente (PBS pH 7,4 com 0,1% de Tween 80 e 0,1% de dodecil sulfato de sódio SDC). Todo o volume de lavado é concentrado para obter um único sedimento por centrifugação a 1500 g durante 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e o sedimento pode ser purificado por flotação em gradiente de Percoll-sucrose ou pela IMS.

III.2.2.3. Concentração por precipitado de carbonato de cálcio

São utilizados 20 l de água (3 –20 l) na coleta, adiciona-se cloreto de cálcio 1M (a razão de 10 ml de cloreto de cálcio por cada litro de amostra) e bicarbonato de sódio

1M (10 ml de bicarbonato de sódio por cada litro de amostra). O pH é ajustado entre 9,9 a 10,1 com hidróxido de sódio 5M e mantido em repouso por 4 h, em temperatura ambiente. O sobrenadante é aspirado, gentilmente, através de um sistema de sucção a vácuo para não ressuspender as partículas sedimentadas. O precipitado é dissolvido em 400 ml de ácido sulfâmico 10% e o frasco é lavado com solução Tween 80 a 0,01%. O volume final é transferido para um tubo de centrifuga de 250 ml. Após a centrifugação a 3000 g por 10 minutos a 10°C, o sobrenadante é descartado e o sedimento é transferido para tubos de centrifuga de 50 ml, lavando-se sempre o tubo anterior com Tween 80 a 0,01%. As amostras são centrifugadas novamente a 3000 g por 10 minutos a 10°C, o sobrenadante descartado e o precipitado é ressuspensionado em solução eluente (Tween 80 1%, SDS 1%, PBS 10X). Centrifuga-se novamente e o sedimento é ressuspensionado, em aproximadamente, 10 ml de solução eluente, dependendo da densidade da amostra. Posteriormente, 10 µl das amostras são transferido para lâmina para sua posterior detecção por imunofluorescência. O restante pode ser guardado em formalina 10% a 4°C.

III.2.2.4. Purificação pela flotação em gradiente de Percoll-Sucrose

A purificação das amostras por flotação realiza-se através a adaptação do método proposto por *Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater* 19th ed. (APHA, 1998), quando o exame microscópico das mesmas apresentava-se comprometido devido a grande quantidade de partículas em suspensão.

Em um tubo cônico de centrifuga de 50 ml é diluído 1 ml da amostra previamente concentrado, em 19 ml de solução eluente, agitando-se por 10 minutos. Cuidadosamente sobre esses 20 ml adiciona-se 30 ml de solução de flotação de *Percoll-sucrose*. Centrifuga-se a 1500 g por 10 minutos. Para não destruir a interfase, inicia-se a centrifugação em baixa velocidade aumentando lentamente até alcançar a velocidade ideal.

Com uma pipeta Pasteur aspirar 20 ml da camada de água superior e mais 5 ml do meio de flotação, transfere-se essa suspensão para outro tubo de centrifuga, adiciona-

se 50 ml de solução eluente e depois se centrifuga novamente a 1500 g por 10 minutos. Descarta-se o sobrenadante e utiliza-se 10 µl para imunofluorescência.

III.2.2.5. Purificação pela separação imunomagnética (IMS)

Após a concentração da amostra, realiza-se a prova de acordo ao protocolo do fabricante (Dynabeads anti-*Cryptosporidium* – Dynal, Oslo, Norway).

O processo é realizado em três etapas:

- captura de oocistos e IMS;
- dissociação do complexo formado dynabeads/oocistos;
- detecção por IFA.

III.2.2.5.1. Captura de oocisto e IMS

Um volume de 100 µl de Dynabeads anti-*Cryptosporidium* é incubado com uma solução tampão e 10 ml de amostra concentrada ressuspensa em água e mantida sob agitação (Dynal Sample Mixer), 15-20 rpm, por 1 hora a temperatura ambiente. Logo após o tubo é transferido para o concentrador de partículas magnéticas (MPC – Dynal) e agitado levemente por 2 minutos até a formação de um precipitado aderido à parede do tubo. Descarta-se o sobrenadante e o sedimento é ressuspensa em 1 ml de solução tampão. O conteúdo é transferido para um tubo eppendorf de 1,5 ml e agitado levemente por 1 minuto quando o sobrenadante é aspirado.

III.2.2.5.2. Dissociação do complexo dynabead/oocisto

Remover o tubo eppendorf do MPC e adicionar 50 µl de HCl 0,1 N. Em seguida, agita-se e transfere-se novamente o tubo para o MPC. O sobrenadante contendo os

oocistos é transferido para uma lâmina contendo 5 μ l de NaOH 1N. Se Fixa, então, a amostra com 50 μ l de metanol para posterior análise por imunofluorescência.

III.2.3. Detecção de oocistos em esgoto

Para a recuperação de oocistos em amostras de esgoto o método envolve três etapas:

- Concentração das amostras de esgoto, para recuperar o baixo número de parasitos tipicamente encontrados no ambiente;
- Purificação para separar os oocistos dos resíduos que possam interferir na fase de detecção;
- Detecção de oocistos pela utilização de anticorpos monoclonais.

III.2.3.1. Concentração por precipitado do carbonato de cálcio

São utilizados 20 l de esgoto (3 – 20l) na coleta, adiciona-se cloreto de cálcio 1M (a razão de 10 ml de cloreto de cálcio por cada litro de amostra) e bicarbonato de sódio 1M (10 ml de bicarbonato de sódio por cada litro de amostra). O pH é ajustado entre 9,9 a 10,1 com hidróxido de sódio 5M e mantido em repouso por 4 h a temperatura ambiente. O sobrenadante é aspirado, com cuidado, através de um sistema de sucção a vácuo para não ressuspender as partículas sedimentadas. O precipitado é dissolvido em 400 ml de ácido sulfâmico 10% e o frasco é lavado com solução Tween 80 a 0,01%. O volume final é transferido para um tubo de centrífuga de 250 ml. Após a centrifugação a 3000 g por 10 minutos a 10°C, o sobrenadante é descartado e o sedimento é transferido para tubos de centrífuga de 50 ml, lavando-se sempre o tubo anterior com Tween 80 a 0,01%. As amostras são centrifugadas novamente a 3000 g por 10 minutos a 10°C, o sobrenadante descartado e o precipitado é ressuscitado em solução eluente (Tween 80 1%, SDS 1%, PBS 10X). Centrifuga-se novamente, e o sedimento é ressuscitado em aproximadamente 10 ml de solução eluente, dependendo da densidade da amostra. Posteriormente, 10 µl da amostras são transferido para lâmina para sua posterior detecção por imunofluorescência. O restante pode ser guardado em formalina 10% a 4°C.

III.2.3.2. Concentração por centrifugação em fluxo contínuo

Na concentração por centrifugação em fluxo contínuo emprega-se um volume de amostra de 2 -3 litros. A amostra é passada por uma peneira de malha igual a 0,7 mm para retirada dos resíduos maiores e, logo após, procede-se à centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos, reservando-se os sedimentos obtidos. Após homogeneização, os sedimentos devem ser novamente centrifugados por 10 minutos com adição de éter (5:1) para a clarificação da amostra com a retirada de gorduras. O novo sedimento, mantendo-o em volume final de 10 ml é armazenado em geladeira (4°C) até o momento da identificação dos protozoários.

III.2.3.3. Detecção pela imunofluorescência

A partir do volume final de 10 ml (item III.2.3.2.) as seguintes etapas realizam-se segundo o protocolo do fabricante.

No caso do Kit Merifluor C/G (Meridian Diagnosticcs, Inc.), são retiradas alíquotas de 10 µl, logo colocadas nos poços das lâminas, para ser observadas sob microscopia de epifluorescência (microscópio ZEISSTM HBO 50, com filtro de 450-490nm de excitação e 510nm de supressão), onde os oocistos de *Cryptosporidium* são identificados de acordo com seu formato esférico e tamanho de 4-6 µm de diâmetro, sendo ambos com um brilho de maçã verde, principalmente nas paredes.

Tais leituras são realizadas com aumentos de 200X e 400X, devendo-se percorrer todos os campos de cada poço das lâminas, conseguindo-se, assim, a enumeração total de cada amostra. Após duas contagens para cada amostra e utilizado a média aritmética entre elas, de forma que o número total de oocistos deve calculada, segundo PALMATEER *et al.* (1996), de acordo com a fórmula a seguir:

$$\frac{\text{Média da contagem de oocistos} \times 100 \times \text{Volume total do sedimento (ml)}}{\text{Volume total da amostras (L)}} = \text{N}^\circ \text{ oocistos/ L}$$

Procedimentos segundo o protocolo do fabricante (Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct immunofluorescent Detection). Antes da utilização, o kit com os reagentes para IFA foi mantido a temperatura ambiente. São aplicados 10 µl da amostras previamente concentrada, assim como 10 µl do controle positivo e controle negativo, nos respectivos poços das lâminas. Estes volumes são distribuídos com auxílio de alças descartáveis. Após a secagem das amostras a temperatura ambiente, estas são fixadas com 5 µl de metanol e adiciona-se uma gota de reagente de detecção contendo anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* marcados com FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) e uma gota de reagente contra-corante (solução negro de ericromo) a cada amostra.

As lâminas são mantidas em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, o excesso dos reagentes é retirado com solução de lavagem 1X concentrada.

Logo, adiciona-se 1 gota de meio de montagem (solução tampão contendo glicerol, formalina e antiquedante) em cada poço da lâmina e cobre-se com lamínula, vedando com esmalte.

As amostras são analisadas em um microscópio sob aumento de 200x e 400x para pesquisar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* através da técnica de IFA, confirmando-se a presença dos mesmos por microscopia de contraste de fase.

Capítulo IV

RESULTADOS

Considerável atenção e recursos têm sido direcionados para esclarecer a epidemiologia da criptosporidiose, a limitação da propagação de *C. parvum*, fundamentados pelo avanço dos métodos de detecção e controle da qualidade das águas de abastecimento, dos mananciais, dos diversos surtos diarréicos associados ao *C. parvum*.

Assim, esta dissertação tem como meta correlacionar a eficiência de detecção deste patógeno nos mais variados ambientes (água de abastecimento, água bruta, esgoto e fezes), evidenciar as técnicas mais objetivas e menos dispendiosas, discutir como evitar a disseminação de *C. parvum* e, fundamentalmente, diagnosticar o nível de exposição que a população está realmente exposta. Entretanto ainda são escassas, no país, as informações sobre a ocorrência deste microrganismo nas diversas rotas de transmissão possíveis e seu respectivo papel na prevalência de surtos diarréicos, como também são escassas as informações sobre a eficiência da remoção deste patógeno através de processos de tratamento de água (DILLINGHAM *et al.*, 2002).

IV.1. Indicadores de eficiência de tratamento em ETAs

As detecções de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fontes de água são consideradas um importante componente no manejo, prevenção, e controle do *Cryptosporidium* nas estações de tratamento de água (SIMMONS *et al.*, 1999, 2001a, 2001b). Reiteram que atenção especial deve ser dada as ETAs e que novos processos de tratamento de água devam ser investigados e implementados.

Na avaliação eficiência de tratamento em ETAs LeCHEVALLIER & NORTON (1992) encontraram correlação significativa entre remoção de turbidez e contagem de partículas ($> 5\mu\text{m}$) – oocistos de *Cryptosporidium*. Os dados indicaram uma leve inclinação na contagem de partículas e remoção de *Cryptosporidium*, indicando que por cada 1,0 log em remoção na contagem de partículas, 0,66 log de remoção foi levado a cabo para *Cryptosporidium*. Os dados de turbidez indicaram que por cada 1,0 log de remoção de turbidez, 0,89 log de remoção foi dado para o parasito.

Esta relação, por conseguinte, provavelmente, não é igual em todas as estações de tratamento (MORGAN *et al.*, 1995). Dados de estudos prévios mostraram que não tem correlação significativa entre remoção de turbidez e a remoção de parasitos para 66 estações de tratamento de água de superfície nos Estados Unidos. Isto é igualmente que a relação entre remoção de parasitos e remoção de turbidez e contagem de partículas são diferentes para diferentes tipos de água.

NIEMINSKY *et al.* (1995) manifestaram que mesmo tendo correlação nos resultados obtidos, encontraram baixo rendimento de eliminação de oocistos na estação de tratamento de água pesquisada. Os melhores resultados foram evidenciados com turbidez tão baixa como de 0,1-0,2 NTU, mas pequenas flutuações neste parâmetro produzem variabilidade na concentração de *Cryptosporidium*.

Outros estudos corroboram com os achados anteriores e ressaltam que equipes ou métodos medidores da turbidez como turbidímetro ou nefelômetros não são suficientemente sensíveis para detectar pequenas mudanças no processo de filtração. Entretanto, a recontagem de partículas, oferece uma confiabilidade maior de eficiência

na remoção e pode indicar quando a etapa de filtração não está funcionando apropriadamente (TEUNIS *et al.*, 1997, APHA, 1998).

IV.2. Indicadores de eficiência de recuperação por filtração em diferentes tipos de água (bruta e tratada)

Para estimar a relativa eficiência, das distintas técnicas dentro das etapas no processo de detecção, foram revisados trabalhos de diferentes localidades do mundo, em especial, aqueles com maior ocorrência de criptosporidiose.

HSU e colaboradores (2000) avaliaram dois métodos de concentração (filtro de cartucho e filtro de membrana) na recuperação de *Giardia* e *Cryptosporidium* em ensaio de laboratório como mostrado na **figura 5**.

- Evidencia a porcentagem de recuperação pelo método de filtro de cartucho usando 40 l de água bruta e 40 l de água bruta tratada (inoculadas com $10^3 - 10^4$ /l de cistos e oocistos):
 - Porcentagem de recuperação de $28,4 \pm 11,0$ % (n = 4) e $30,0 \pm 11,7$ % (n = 8) para cistos de *Giardia*;
 - Porcentagem de recuperação de $9,3 \pm 3,3$ % (n = 4) e $9,8 \pm 4,5$ % (n = 8) para oocistos de *Cryptosporidium*.
- A porcentagem de recuperação pelo método de filtro de membrana usando 20 l de água tratada, encontrou-se:
 - Porcentagem de recuperação de $40,4 \pm 9,7$ % (n = 5) para cistos e $17,5 \pm 3,2$ % (n = 5) para oocistos.
- A porcentagem de recuperação pelo método de filtro de membrana usando 20 l de água bruta, encontrou-se:
 - Porcentagem de recuperação de $38,3 \pm 18,5$ % (n = 4) para cistos e $16,0 \pm 1,7$ % (n = 3) para oocistos, respectivamente.

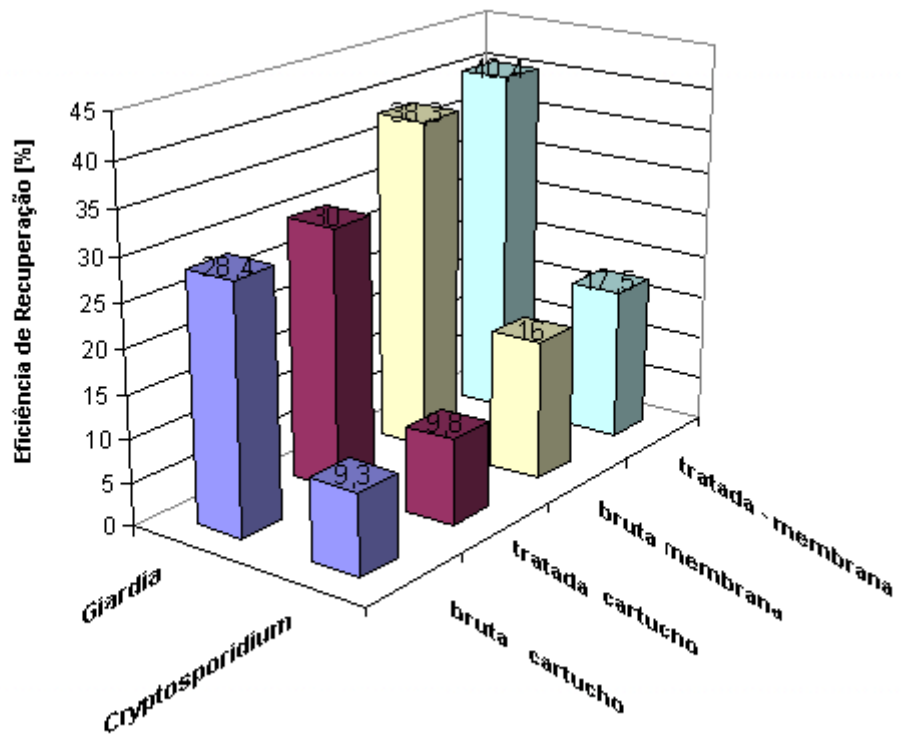


Figura 5. Percentual comparativo de recuperação de *Giardia* e *Cryptosporidium* usando métodos de concentração (filtro de cartucho e filtro de membrana)

O filtro de membrana possui maior eficiência de recuperação que o filtro de cartucho considerando diferentes tipos de amostras (NIEMINSKI *et al.*, 1995; SHEPHERD & WYN-JONES, 1995). Oocistos de *Cryptosporidium* são mais difíceis de ser recuperado que cistos de *Giardia*, devido ao menor tamanho dos primeiros ficam incrustados nas profundidades do filtro de cartucho e membrana, dificultando sua remoção no processo de lavado. Além disso, entre 5 e 30 % dos oocistos podem passar através do filtro (VESEY *et al.*, 1993).

Em termos de análise de amostras de água em ETAs destacamos dois resultados, com diferenças significativas na detecção de *C. parvum*. Comparativamente os testes utilizaram *Giardia* como parâmetro de detecção.

ROSE *et al.* (2002) analisaram concentrações de *C. parvum* na água bruta, tratada e filtrada de quatro ETAs. A **figura 6** exibe resultados de indicando que o filtro de membrana exibe maior eficiência na recuperação de parasitos que o filtro de cartucho. Na comparação de remoção dos parasitos detectados, obtiveram-se recuperação pelo filtro de cartucho de 90,3 % para *Giardia* e 76,8 % para *Cryptosporidium*. Para o filtro de membrana foi de 96,5 % para *Giardia* e 96,4 % para *Cryptosporidium*. O resultado da concentração de parasito foi correlacionado para ambos métodos de concentração e o resultado para amostras de água bruta foi Spermans $R= 0,683$ e $p < 0,001$, e Spermans $R= 0,882$ e $p < 0,001$ para água tratada.

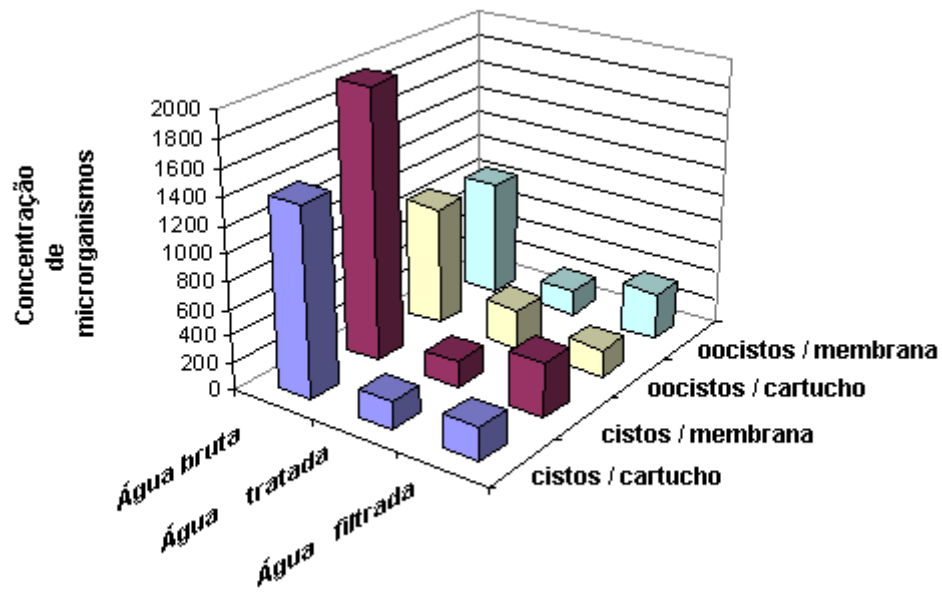


Figura 6. Análises comparativas de concentrações de *C. parvum* na água bruta, tratada e filtrada de quatro ETAs

Para o cálculo de limite de detecção de ambos métodos para os três tipos de água, a água tratada mostrou a menor média do limite de detecção ($5,2 \pm 2,6$ organismos/100 l no caso de filtro de cartucho e de $20,5 \pm 16,0$ organismos/100 l para o filtro de membrana), entretanto para água bruta mostrou ser maior com valores de $14,4 \pm 4,7$ organismos/100 l para filtro de cartucho e $295,3 \pm 9,6$ organismos/100 l para filtro de membrana, demonstrando este último maior variação no limite de detecção que o filtro de cartucho.

O filtro de membrana mostra menor quantidade de volume processado em relação ao filtro de cartucho quando os níveis de turbidez aumentaram, isto resulta numa média de limite de detecção muito alto e tais pequenos volumes processados causam erros no cálculo de cistos e oocistos quando se converte a número de parasitos por 100 l. Isso ocorre devido ao fator que parasitos não estão uniformemente distribuídos nas amostras de água (ATHERHOLT & KORN, 1999).

Conclui-se, que a variação da eficiência de recuperação de *C. parvum* disponibilizados na literatura podem variar, em média, num fator logarítmico de 0,62.

Por outro lado, LeCHEVALLIER *et al.* (1995) sugerem que cuidados no processo de concentração e clarificação podem melhorar a eficiência de recuperação. DILLINGHAM *et al.* (2002) reportam perdas consideráveis podem ocorrer durante a centrifugação devido à destruição dos oocistos e também quando os microrganismos são resuspensores durante a remoção do sobrenadante. O abrasivo natural do método causa estrago nos oocistos e perdas de epítomos indispensáveis para a detecção com anticorpo monoclonal. Além disso, o método tende a compactar outras partículas ao redor dos oocistos causando futuros problemas na etapa de detecção.

A floculação com Carbonato de Cálcio proposta por VESEY *et al.* (1993) como método de concentração tem sido avaliado no laboratório (**tabela 1**) para a simultânea detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* mostrando porcentagem de recuperação de 73,6 % para oocistos de *Cryptosporidium* em água de torneira e de 71,3 % em amostra de água de rio com baixa turbidez.

Tabela 1. Método de concentração de *C. parvum* por carbonato de cálcio

Tipo de água	Microrganismo	% Recuperação	
		Faixa	Média
Torneira (n = 8)	<i>Cryptosporidium</i>	66,0 - 80,7	73,6
	<i>Giardia</i>	64,7 - 77,1	77,1
Rio (n = 6)	<i>Cryptosporidium</i>	65,3 - 76,0	71,3
	<i>Giardia</i>	68,2 - 77,6	72,5

VESEY *et al.* (1993) ressaltam que o método de floculação com carbonato de cálcio é eficiente para a concentração de *Cryptosporidium* na água. É um fator importante no incremento da fluorescência nos oocistos quando é exposto a ácido sulfâmico, que tem a particularidade de remover partículas da superfície facilitando a ligação dos antígenos. Isto foi comprovado quando se observou aumento de ligação de anticorpos de oocistos com 18 meses de idades que com oocistos frescos.

O método de floculação se descreveu como mais sutil que a filtração e causa menos compactação e agregação. As possíveis dificuldades com a técnica de floculação é a concentração de partículas de maior tamanho resultando num resíduo qual pode ter maior quantidade de partículas que quando o método de filtração é usado. Além disso, tem sido demonstrada uma significativa redução na viabilidade dos oocistos quando foram expostos a pH 10 por mais de 4 horas, não sendo recomendado seu uso em água de consumo quando se requer informação da viabilidade dos oocistos (CAMPBELL *et al.*, 1994). Esta técnica demonstra ser simples, econômica e é menos laboriosa que outras.

No método 1622 e 1623 (USEPA, 1999a, 1999b) são utilizados vários tipos de filtros (cápsula e ultrafiltro). A **tabela 2** demonstra avaliações e resultados que são da ordem de 11 a 86 % (média 42 %) para o sistema de ultrafiltro e de 21 a 78 % (média 46 %) para filtro em cápsula, não se encontrando diferença estatisticamente significativa na recuperação de ambos filtros. Entretanto, quando testes foram feitos com água de superfície a eficiência de recuperação de filtro em cápsula caiu para 15 %, e no caso de ultrafiltro a eficiência de recuperação se manteve relativamente alta em 42 %.

Tabela 2. Métodos de concentração pela Metodologia 1622 e 1623 - USEPA

Amostras	% Recuperação*	
	Ultrafiltro	Filtro em cápsulas
1	40	42
2	45	33
3	47	ND
4	ND	46
5	ND	53
6	ND	45
7	27	37
8	13	35
9	24	21
10	54	42
11	42	70
12	86	70
13	76	78
14	11	22
Média	42	46
SD	24	18

* - Ensaios elaborados com 10 litros de água deionizada

Estudos da USEPA (1999a) com água de superfície reportaram para filtro em cápsula porcentagem que variam entre 4 a 75.8 % com meia de 43,4 % a níveis de turbidez de 0,7 a 11,7 NTU. Resultados destas análises indicam que o método 1622 demonstra dificuldade quando os níveis de turbidez são excessivos. De igual forma, em outros estudos de validação interlaboratorial, o filtro em cápsula mostrou porcentagem de recuperação de 35,2 % (UPTON, 1999).

Apesar da pouca quantidade de publicações na avaliação do método alguns investigadores concordam de que o método 1622 tem menos falsos positivos que o método ICR, mas que certas características físico-químicas podem influir negativamente, tal é o caso da presença de ferro dissolvido na água, que pode ocasionar efeito inibitório na fase seguinte de IMS-IFA e produzir falsos negativos (QUINTERO-BETANCOURT *et al.*, 2002).

A detecção com imunofluorescência (IFA) tem demonstrado diferenças nos anticorpos comercialmente disponível em propriedades tais como avidéz, reação cruzada com algas e especificidade na detecção de oocistos de *C. parvum* (GRACZYK *et al.*, 1996, GARCIA *et al.*, 2000). FERRARI *et al.* (1999) avaliaram diferentes tipos de anticorpos monoclonais (IgG1, IgG3, e IgM) para monitoramento de *Cryptosporidium* em amostras ambientais e revelaram que o corado com anticorpo IgG1 geralmente produz poucas partículas fluorescente não desejadas diferentemente dos anticorpos IgM e IgG3.

IV.3. Indicadores de eficiência de recuperação em ETEs

As metodologias para concentração de amostras de águas de esgoto (precipitação por carbonato de cálcio, centrifugação de fluxo contínuo e imunofluorescência), não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* (MULLER, 2000). Entretanto, devido à elevada carga orgânica destes tipos de amostras e a expectativa de nestas haverem maiores densidades de oocistos, os volumes devem ser observados uma vez que a alta turbidez destas amostras tornam-se, rotineiramente, um obstáculo de execução técnica.

STADTERMAN *et al.* (1995) apontam que uma estação de tratamento de esgoto operando com lodo ativado remove 98,6% de oocistos de *Cryptosporidium*. Porém, em comparações por associações de diferentes regimes de tratamento (lodo ativado e digestão anaeróbica) concluíram ser este modelo de tratamento mais seguro e eficiente, com 99,9% de remoção de oocistos de *Cryptosporidium*.

RIDER *et al.* (1996) descrevem um sistema filtrante de tratamento de esgoto consistindo de um duplo estágio após o tratamento terciário com a inserção de um filtro de areia tipo “cama profunda”, que remove 99,9% de oocistos de *Cryptosporidium*.

HIRATA & HASHIMOTO (1997) direcionaram suas pesquisas para esgoto bruto e efluente dos tratamentos primário, secundário e final para *Cryptosporidium*. Concluíram que tratamento por lodo ativado reduz 98,7% da presença de oocistos de *Cryptosporidium* sugerindo, ainda, o uso de *Clostridium perfringens* como indicador biológico relacionado à presença de *Cryptosporidium*.

Os corpos d'água (rios, lagos, lagoas, etc.), têm características físicas e químicas que influenciam enormemente o ambiente aquático, afetando os tipos e número de organismos que aí se desenvolvem. Quantidades adicionais de material orgânico, nitrogênio e fósforo oriundos das águas de drenagem e de despejos, resultam num maior crescimento de fitoplâncton e acúmulo de biomassa, com trocas em organismos presentes. Se a quantidade de material orgânico for bastante elevada, o oxigênio dissolvido pode ser reduzido e causar impacto adicional no balanço da comunidade aquática.

A Lei Federal nº 6938 (1981), que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, discorre sobre poluição como a "degradação da qualidade ambiental" resultante de atividades que direta ou indiretamente:

- prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população;
- criem condições adversas às atividades sociais e econômicas;
- afetem desfavoravelmente a biota;
- afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente;
- lancem matérias ou energias em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos.

Tais considerações redundam em sistemas de saneamento que se desenvolvem em função do estabelecimento de prioridades relativas às fontes de energia mais usadas, dentre as quais, o sistema de tratamento de esgoto. A Organização Mundial de Saúde – OMS (1987), define saneamento como o "controle de todos os fatores do meio físico do homem que exercem ou podem exercer efeito deletério sobre seu bem-estar físico, mental ou social".

Os crescentes usos requerem a construção de sistemas de esgotamento maiores e em maior número, observando, principalmente, oriundos do âmbito hospitalar, o tratamento preliminar, devido a uma grande quantidade de microrganismos nesses despejos, evitando que esses possam servir como veículos que facilite a transmissão de doenças aos usuários a jusante do corpo receptor. Assim, de uma forma global, saúde, saneamento e controle da poluição se relacionam diretamente. O estabelecimento de um sistema de esgotos adequado exige um trabalho cuidadoso de engenharia. A determinação de dimensões necessárias das tubulações está relacionada com a estimativa da quantidade de águas servidas, estabelecendo dimensões e declividades convenientes para as canalizações. É essencial que a aplicação ótima de tais tecnologias seja incorporada dentro de uma infra-estrutura contemporânea de tratamento de esgoto, para maximizar os benefícios de controle ambiental.

IV.4. Indicadores de eficiência de recuperação em fezes

O diagnóstico clínico da infecção por *Cryptosporidium* se baseia na detecção de oocistos em fezes. Uma variedade de métodos de concentração surgiram como necessidade para uma melhor visualização através das técnicas qualitativas e quantitativas. Dentre os métodos analisados em fezes estão os métodos de concentração, coloração, imunofluorescência direta e indireta, ELISA, microscopia eletrônica, citometria de fluxo e PCR, bem como os métodos indiretos, envolvendo as características epidemiológicas, sintomatologia e sorologia (MOITINHO, 1997, PONCE DE LEÓN *et al*, 1999, MOSS & ARROWOOD, 2001).

O método de sedimentação pelo formol-éter foi considerado por diversos autores, como a técnica mais efetiva para a recuperação e a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (BAXBY *et al.*, 1984, CASEMORE *et al.*, 1990). Um dos grandes inconvenientes da técnica é o uso de éter que forma aerossóis e é altamente inflamável. Para evitar estes inconvenientes a sedimentação pela formalina-éter-acetato foi desenvolvida para substituir o uso do éter pelo acetato de etila no processo de separação de oocistos, no ano de 1979. A partir desta data, trabalhos vêm sendo realizados no sentido de aprimorar a técnica nos procedimentos de concentração de oocistos de *Cryptosporidium* em fezes (WEBER *et al.*, 1992). As mudanças no método consistiam em tempos variáveis de centrifugação, uso de outros filtros que não a gaze, uso de um surfactante e variação na força-centrífuga. O resultado deste trabalho foi à melhora na recuperação de oocistos, que foi comparado com as diversas técnicas de concentração.

O princípio do método de concentração pela flutuação do açúcar de Sheather baseia-se na flutuação dos oocistos por meio de uma solução saturada de açúcar de densidade igual a 1.27, sendo esta densidade maior que a dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. (NAVIN & JURANEK, 1984). As melhores vantagens desta técnica se relacionam com a conservação da morfologia dos parasitas, pois em outras técnicas de concentração, estes podem apresentar-se contraídos e/ou distorcidos, dependendo dos processos físico-químico utilizados (CURRENT & GARCIA, 1991). A outra vantagem é a obtenção de uma maior quantidade de oocistos, por campo microscópico, facilitando o diagnóstico clínico e infecções sub-clínicas (GARCIA *et al.*,

2000). Variações deste método, utilizando a flutuação pela sacarose-fenol foram feitas por outros autores (PONCE DE LEÓN *et al.*, 1999).

A técnica de separação imunomagnética, para oocistos de *C. parvum* usando micro-pérolas MACS é prejudicada, quando há presença de gordura fecal humana, reduzindo a recuperação de oocistos. Porém, se a amostra for tratada com procedimentos para remoção da gordura, a recuperação de oocistos melhora sensivelmente (DENG *et al.*, 2000).

A coloração ácido-resistente ou método de Ziehl-Neelsen foi inicialmente utilizada para corar bactérias, como os bacilos da tuberculose e da lepra (micobactérias), baseado em suas características tintoriais. A ácido-resistência está relacionada à presença de lipídios, ligados fortemente a parede celular, que resistem a extração sucessiva com álcool-éter e clorofórmio. A integridade física da parede celular é essencial a ácido-resistência. O método de coloração pelo ziehl-neelsen modificado ou ácido-resistência usando carbolfucsina apresentou resultados fidedignos para detecção de *Cryptosporidium* spp. Em esfregaços de fezes, bem como em tecido de biópsia intestinal, não permitindo que fossem confundidos com leveduras (GARCIA *et al.*, 2000).

Os oocistos nas colorações ácido-resistentes são observados como estruturas esféricas, medindo de 3 a 6 µm de diâmetro, em diferentes graus de intensidade de vermelho-brilhante, contendo granulações escuras em seu interior, correspondentes às formas esporuladas. Algumas vezes, a dupla parede do oocisto aparece altamente refringente, em contraste ao fundo azul ou verde (DIAS JÚNIOR, 1999).

A técnica usando o DMSO foi descrita como mais vantajosa em relação às outras colorações ácido-resistentes, por ser de mais rápida execução, de fácil interpretação e por preservar melhor a estrutura interna dos oocistos. De 133 amostras de fezes de primatas jovens analisadas, 34 casos (25,4%) mostraram positividade pelo DMSO (BRONSDON, 1984).

Na coloração tricrômica ácido-resistente utilizada para detecção simultânea de *C. parvum* e espécies de microsporídios em amostras fecais, os oocistos de *C. parvum*

aparecem em rosa claro ou violeta e os esporozoítos podem, às vezes, serem vistos. Os microsporídios apresentam-se em rosa, na sua maioria com vacúolo ou com faixa, horizontal ou diagonal, pálida. Ambos organismos podem ser facilmente distintos de fungos, bactérias ou elementos fecais. IGNATIUS *et al.* (1997) utilizando fezes de pacientes com AIDS pela coloração tricrômica ácido-resistente modificada, em 44 amostras analisadas, 12 (23,7%) continham *C. parvum* e 7 (15,9%) apresentaram microsporídios. Nesta coloração o *C. parvum* apresenta-se em rosa claro ou violeta e os esporozoítos podem ser vistos esporadicamente, sendo os oocistos facilmente distintos de fungos, bactérias ou elementos fecais. Além da visualização de dois microrganismos em uma mesma coloração, o tempo necessário para execução da técnica é de aproximadamente 45 minutos, sendo de fácil manuseio. É um método de baixo custo e de coloração confiável.

Um estudo comparativo entre a coloração de safranina-azul de metileno e os métodos de Ziehl-Neelsen foi realizado, onde dos 26 casos diagnosticado para *C. parvum* pela safranina-azul de metileno, 19 (63,3%) casos foram detectados pelo método ácido-resistente e, somente 11 (36,7%) foram confirmados pelo método álcool-ácido-resistente, mostrando deste modo uma maior sensibilidade da coloração pela safranina-azul de metileno. Os oocistos podem ser corados pela safranina-azul de metileno, após concentração pôr vários métodos, o material fecal pode ser estocado por muitos meses, em diversas temperaturas. Nesta técnica, os oocistos corados apresentam-se rosa-alaranjado, que foram facilmente reconhecidos. O método é rápido e simples, com pequena margem de erro (ROLDÃO, 2001).

Recentemente, um novo método de coloração pela safranina, adicionando-se tricromo foi desenvolvido para detecção de *C. parvum*. O método detecta ao mesmo tempo vários parasitos, como o *C. parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, espécies de microsporídios e *Isospora belli* em matéria fecal de pacientes com Aids. Oocistos de *C. parvum* foram facilmente identificados por apresentarem a morfologia característica, pois se coloriu de rosa brilhante e no seu interior a cor típica escura devido a presença de esporozoítos. A coloração de fundo verde permite a fácil identificação de todos agentes parasitários e sua distinção de fungos e elementos fecais (PONCE de LEÓN *et al.*, 1999).

A coloração fluorescente foi descrita como alternativa para oocistos de *Cryptosporidium* spp. não corados pelos métodos ácido-resistentes. A coloração pela auramina é um bom método na detecção de pequenas quantidades de parasitos e sua utilização é indicada, quando há dificuldade na identificação dos oocistos de *C. parvum* ou na triagem de grande número de amostras. O inconveniente da técnica deve-se ao fato de ser relativamente lenta e necessitar de um microscópio de fluorescência. Além disso, os autores recomendam que as amostras positivas por este método, sejam confirmadas por outro método de coloração (ROLDÃO, 2001). De 133 amostras de fezes de primatas jovens analisadas, 38 (28,6%) casos mostraram positividade pela auramina (BRONSDON, 1984). O método Auramina foi descrito como sendo 13 vezes mais sensível que o método DMSO em fezes humanas (STIBBS & ONGERTH, 1986).

O teste de imunofluorescência direta foi empregado na pesquisa de oocistos de *C. parvum* em 297 amostras fecais humanas, utilizando anticorpo monoclonal preparado segundo a técnica descrita por STERLING & ARROWOOD (1986), onde 99 (33,3%) amostras apresentaram-se positivas para o parasito, sendo neste estudo obtido 100% de sensibilidade. Da mesma forma, utilizando anticorpo monoclonal obtido comercialmente, de 19 amostras fecais contendo *C. parvum* 14 (73,7%) foram positivas pela imunofluorescência direta (ROSENBLATT & SLOAN, 1993).

A imunofluorescência direta é descrita como pelo menos 10 vezes mais sensível que os métodos de colorações em fezes. Além disso, o tempo gasto para o exame microscópio para a imunofluorescência é aproximadamente de 20 a 30 segundos, enquanto as técnicas de colorações são necessárias um tempo aproximado de 15 minutos. Isto está diretamente relacionado com a qualidade da amostra e a experiência do examinador. Em relação a despesa pessoal treinado, o laboratório economiza o tempo gasto com as análises, reduzindo despesas totais pela diminuição do tempo gasto para a leitura das análises. Na imunofluorescência direta, os oocistos de *C. parvum* apresentaram-se arredondados, medindo, aproximadamente, 4 a 6 μm , sendo inconfundíveis com os cistos de *Giardia* spp. que se apresentaram ovais, medindo aproximadamente 11 a 14 μm . Ambos organismos mostraram fluorescência vermelho-esverdeado, contra um fundo livre de fluorescência não específica. Alguns autores descrevem os resultados como: infecção leve, quando o número observado foi de 1 a 5 oocistos por campo; infecção forte, com mais de 50 oocistos por campo em aumento de

100 vezes (GARCIA *et al.*, 1987). VALDEZ *et al.* (1997) analisaram 16 amostras de fezes humanas e observaram somente 3 (18,8%) amostras positivas pela imunofluorescência direta, mostrando ser necessários $5,8 \times 10^4$ oocistos por grama de fezes para serem detectados.

A imunofluorescência indireta usada na pesquisa de antígenos ou anticorpos, tem sensibilidade limitada ao nível de fluorescência detectável pelo olho humano. Amostras fecais humanas, de primatas e de bovinos foram utilizadas para detectar oocistos de *Cryptosporidium*, comparando quantitativamente a sensibilidade deste método em relação as técnicas de coloração de auramina e DMSO-carbolfucsina. A fluorescência obtida pelo soro imune provém das paredes dos oocistos, que apresentaram estruturas uniformes, medindo aproximadamente 3 a 5 μm de diâmetro. Não foram detectadas reações cruzadas, revelando a não ligação do soro imune anti-oocisto com outros parasitos. O método de IFI mostrou ser superior a coloração pelo DMSO-carbolfucsina, sendo mais sensível e específico para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de fezes humanas. Em fezes de macacos, o método IFI foi 5 vezes mais sensível que o método DMSO-carbolfucsina e 2 vezes mais sensível que pela auramina (UNGAR, 1995).

O método de detecção pela imunofluorescência indireta foi também utilizado para testar amostras de fezes bovinas e de pacientes com Aids, fazendo uso de um Kit obtido comercialmente. Foram analisados um total de 30 isolados de *Cryptosporidium*, confirmados pela colocação ácido-resistente. Assim, somente 5 amostras positivas foram usadas para os testes de imunofluorescência direta e indireta. Os oocistos de *C. parvum* isolados de humanos e de bovinos mostraram positividade para IFD e IFI em todas as amostras. A sensibilidade foi de 100% para todos os isolados positivos e de 24% para os isolados que não continham *C. parvum*, em ambos os métodos (GRACZYK *et al.*, 1996).

O método ELISA foi utilizado para detectar oocistos de *C. parvum* em 296 amostras de fezes de crianças com 5 anos de idade ou jovens, comparando-se com o método pela imunofluorescência direta. 100 das amostras (33,8%) foram positivas, sendo 187 (63,2%) negativas por ambos métodos. 8 (2,7%) amostras foram consideradas falso-negativas pelo ELISA, pois foram positivas pela imunofluorescência

indireta e somente 1 (0,3%) amostras foi considerada falso-positiva pelo ELISA, quando comparado com o método da imunofluorescência indireta. A sensibilidade e a especificidade do método ELISA foram de 93% e 99%, respectivamente, em amostras testadas imediatamente após a coleta, conservadas em formalina a 10 % ou em baixas temperaturas (-65°C) por períodos de até 18 meses. Os resultados foram similares àqueles obtidos pelo método imunofluorescência direta (SLIFCO *et al.*, 1997).

Através da microscopia eletrônica pode-se visualizar componentes da parede de oocistos de *C. parvum*. A imunodeteção ultraestrutural em íleo de rato infectado demonstrou que o anticorpo monoclonal OW-IGO reagiu com macrogametas e contra a parede de oocistos, mas não com estágios assexuados. Estes dados podem ser importantes, quando alguns parasitos não reagem dentro da mesma amostra, mostrando assim a necessidade de diferenciar a reatividade estágio específico dos anticorpos utilizados (TZIPORI & WARD, 2002). A microscopia eletrônica pode, também, ser utilizada para distinguir a localização de alguns antígenos parasitários. Assim, os antígenos podem estar localizados na superfície externa do oocisto, exibindo um modelo irregular com diferentes ordens de ligação, bem como também podem apresentar-se internamente, em vacúolos associados com material fibrilar e entre a parede interna do oocisto e os esporozoítos e, esporadicamente, podem estar entre os esporozoítos e o corpo residual. Estas vesículas apresentam-se em forma esféricas ou elipsóides, com aglomerações difusas. A microscopia eletrônica mostrou áreas sensíveis na parede do oocisto (interna e externamente), sugerindo que estas vesículas são capazes de liberar o antígeno para a parede externa do oocisto, após esta parede ter sido completamente desenvolvida. Esta hipótese foi baseada no fato de que o antígeno foi detectado em sobrenadante obtidos pela centrifugação na purificação dos oocistos. Outros trabalhos mostraram a presença de vacúolos abrigando antígenos, detectados dentro e fora da parede do oocisto, com natureza e função desconhecida. Os antígenos de superfície estão relacionados com as formas sexuadas do parasito (ENTRALA *et al.*, 2001).

A citometria de fluxo é um método utilizado para quantificar oocistos de *C. parvum* sensíveis à fluorescência e tem sido empregado em amostras de fezes e água do meio ambiente (VESEY *et al.*, 1993). Em citometria de fluxo é importante a eliminação de partículas fecais grosseiras que possam obstruir a análise, sendo a centrifugação um meio de diminuir estas partículas. A recuperação de oocistos influencia diretamente

nesta técnica, bem como uma concentração abaixo de $1,4 \times 10^4$ oocistos por ml pode dificultar a diferenciação entre oocistos e eventos falso-positivos. Este fator pode ser minimizado pela aquisição de um poro mais apropriado e/ou pelo uso de um segundo anticorpo monoclonal. A remoção da formalina usada na preservação das amostras de fezes é, também, um passo necessário para citometria de fluxo. Neste método, a detecção de partículas sensíveis determina a intensidade da fluorescência, que discrimina partículas fluorescentes não específicas. Outro fator a ser considerado é a concentração ótima para anticorpo.

Retirando-se estes inconvenientes, a citometria de fluxo é um método sensível para detecção de oocistos de *C. parvum* em fezes humanas podendo ser 4 até 34 vezes mais sensível que o método de imunofluorescência direta. Em uma análise comparativa, a detecção de oocistos pela citometria de fluxo e imunofluorescência direta, realizada em concentrações conhecidas de oocistos de *C. parvum*, a citometria de detectou uma amostra contendo $1,4 \times 10^4$ oocistos por ml de fezes, enquanto a imunofluorescência direta detectou $5,8 \times 10^4$ oocisto por ml de fezes. Devemos lembrar que embora a citometria de fluxo requeira equipamento caro e técnicos especializados, o aumento da sensibilidade pode ser útil em indivíduos com criptosporidiose e que excretam poucos oocistos, abaixo do nível de detecção pelas técnicas de imunofluorescência direta e ELISA (VALDEZ *et al.*, 1997).

O teste do PCR teve grandes avanços na área de biologia molecular e tem sanado uma série de problemas que são apontados pela microscopia, quando usado no diagnóstico de muitas doenças, incluindo as parasitárias (BEJ & MAHBUBANI, 1994). Durante os últimos anos, progressos consideráveis tem sido alcançados objetivando uma detecção sensível de *C. parvum* baseada em PCR (AWAD-EL-KARIEM *et al.*, 1994, DENG *et al.*, 1997, KAUCNER & STINEAR, 1998).

Capítulo V

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A criptosporidiose é causada pelo protozoário *C. parvum* e tem sido responsável por diversos surtos de doenças gastrintestinais associadas à ingestão de água contaminada. Oocisto é a forma infectante transportado no ambiente, possuem uma estrutura que aumenta o período de vida e confere resistência a cloração quando os outros processos de tratamento de água são poucos eficientes (CURRENT & GARCIA, 1991).

LeCHEVALLIER *et al.* (1991) examinaram amostras de água potável de 66 estações de tratamento nos Estados Unidos e encontraram uma associação positiva entre os parâmetros da qualidade da água, tais como turbidez, número de coliformes totais e fecais, e a presença de *Cryptosporidium*. Informes contrários foram dados nos surtos de criptosporidiose em Swindon, Oxfordshire (Inglaterra) onde se registraram níveis de turbidez de 0,2 a 0,4 unidades nefelométricas de turbidez (NTU), sugerindo que a razão da discrepância ser as diferenças no tipos de água analisada. Para alguns autores ao momento de associar parâmetros microbiológicos, há de se fazer distinção entre água tratada e água bruta. Considerando que uma água bacteriologicamente apta pode conter parasitos pela resistência deste último ao processo de tratamento. No caso de água bruta, dados da literatura estabelecem correlações dos indicadores normais com parasitos na água, uma vez que é influenciada pela natureza química, fonte, níveis de poluição, etc. (ABRAMOVICH, 1999).

Os métodos para detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* foram, subseqüentemente, aplicados a estudo de ocorrência e distribuição e a determinação de efetivo tratamento da água de abastecimento. Uma vez que os oocistos de *Cryptosporidium* normalmente ocorrem em baixa concentração, métodos de detecção envolvem algum tipo de processo de concentração do organismo de grandes volumes de água. Os volumes de amostras geralmente recomendados para água bruta são de 100 litros e para água filtrada de mais de 1000 litros (FRANCO *et al.*, 2001).

HSU *et al.* (2001) analisaram o efeito de vários parâmetros físico-químicos sobre a sobrevivência de oocistos e relataram que oocistos em contato com fezes

toraram-se mais resistentes às pressões ambientais. O material fecal, possivelmente, protege oocistos da dessecação prolongando a viabilidade no ambiente. Observaram, também, que a sobrevivência de oocistos na água sob condições naturais foi menor que sob condições laboratoriais e sugeriram que a atividade microbiana no ambiente natural contribui para destruição eventual de oocistos através, por exemplo, da predação, concluindo, portanto, que a sobrevivência *in situ* pode não ser tão extensa como ocorre sob condições controladas.

A importância da transmissão deste parasito pela água foi reconhecida há mais de 12 anos, contudo, os surtos continuam ocorrendo, vários tem sido documentados como das cidades: Ogose Town (Japão) em 1996, Wales e Swindon (Inglaterra), Oregon, Texas e o de maior transcendência em Milwaukee (USA), onde mais de 403000 pessoas reportaram doenças gastrintestinais, e 4400 pessoas foram hospitalizadas (CURRENT & GARCIA, 1991, MOORE *et al.*, 1994, SOLO & NEUMEISTER, 1996, YAMAMOTO *et al.*, 1996, FRANCO *et al.*, 2001).

No Brasil, os dados acerca da ocorrência deste parasito em água de abastecimento são limitados. A portaria 1469/2000, que em seu padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano recomenda inclusão de pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência, dentre outros, oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Atualmente, recomenda-se, mundialmente, o monitoramento de *Cryptosporidium* em sistema de água potável que abastecem cidades com população entre 10000 e 100000 pessoas (FRANCO *et al.*, 2001). Entretanto, os métodos normalmente usados na determinação de oocistos na água são ineficientes e extremamente variáveis, citando como exemplos a identificação de falsos-positivos por interferências com algas e outras espécies de protozoários (JAKUBOWSKI *et al.*, 1996).

Segundo a OPS (1998), mais de 2 bilhões de pessoas hoje estão infectadas com algum tipo de verme ou parasita. Estima-se que 60% dessas infecções têm associação a deficiências nutricionais, principalmente carência de ferro e vitaminas. Além disso, 2/3 da mortalidade mundial têm relação com doenças de veiculação hídrica, como as parasitoses. As verminoses são um dos problemas mais graves de saúde pública do País, afetando principalmente, crianças de baixa renda e que habitam regiões carentes e com

condições precárias de infra-estrutura sanitária. Estimativas do IBGE - Instituto Brasileiro de Pesquisas Geográficas e Estatísticas - apontam que mais 70% dos esgotos gerados nas cidades não dispõem de um sistema de coleta e tratamento. Dados do Ministério da Saúde demonstram que 80 a 90% das internações hospitalares no Brasil são decorrentes de doenças de veiculação hídrica (água contaminada). Cada R\$ 1,00 aplicado em saneamento básico representa R\$ 4,00 ou R\$ 5,00 economizados em saúde (MULLER, 2000).

Nos últimos anos, diversas novas doenças têm sido descobertas, algumas muito graves e de difícil controle. Somente para ilustrar, desde a descoberta do vírus da imunodeficiência humana (HIV), no início dos anos 80, mais de duas dezenas de patógenos foram descritos e envolvidos em diversas doenças. Estas novas doenças vão se somar a outras já existentes cuja incidência tem aumentado e entre os novos agentes microbianos encontram-se o *Cryptosporidium* spp. para o qual o arsenal terapêutico disponível é muito precário.

Como a criptosporidiose é considerada uma doença emergente, vale ressaltar que a definição de doença emergente proposta pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) engloba tanto as doenças infecciosas de descoberta recente quanto aquelas cuja incidência tende a aumentar no futuro: "doenças causadas por micróbios que já se sabia serem patogênicos, mas, com padrão diferente de doença (aumento de incidência, processo patogênico inusitado) ou que foram reconhecidos como patógenos novos para o ser humano".

Do ponto de vista biológico, é possível afirmar que a emergência de novos patógenos não é novidade para o homem, que tem convivido com esta situação desde o início de seu processo evolutivo e, certamente, é possível antever que isto ocorrerá pelos anos que virão. Evidentemente, a situação atual tem características peculiares e preocupantes, entre elas:

- ✓ Aumento da população (mais de 6 bilhões de pessoas);
- ✓ Grandes movimentações destas populações, espontaneamente (viagens de lazer ou negócios) ou induzidas (guerras, secas e outros desastres ambientais);

- ✓ Aumento das doenças pela maior exposição de grupos específicos a situações de risco, como institucionalizados (prisões, asilos para idosos, orfanatos, migrantes, escolas), populações de rua, condições precárias de moradia;
- ✓ Mudanças ecológicas intensas e rápidas, relacionadas ao desenvolvimento econômico e industrial;
- ✓ Diminuição do suporte social, aumento do desemprego, urbanização desorganizada;
- ✓ Utilização intensa de antimicrobianos, facilitando, por um lado, o aparecimento de cepas resistentes e, paradoxalmente, por outro, também contribuindo para o desenvolvimento de resistência quando da falta de aderência a estes tratamentos.

É fato conhecido que os agentes das doenças infecciosas e parasitárias são parte do nosso *habitat* (nossa ecologia), sendo certamente pouco provável (e pouco desejável) sua completa eliminação. As complexas relações ecológicas (hospedeiro-meio ambiente-parasitas) ainda não estão completamente elucidadas e é desnecessário enfatizar a importância da manutenção deste equilíbrio para o próprio equilíbrio da vida. Por outro lado, o conhecimento técnico acumulado neste século já demonstrou de maneira insofismável a estreita relação entre a melhoria das condições sanitárias básicas e a diminuição da incidência das doenças infecciosas e parasitárias. Aquelas incluem, mas não estão limitadas a:

- ✓ Disponibilidade de água tratada;
- ✓ Esgotamento sanitário;
- ✓ Alimentação sadia, educação e emprego.

O Brasil chega ao final do século XX com diversos problemas sociais sérios, com reflexos diretos sobre a saúde pública. Entre estes, o êxodo rural, o desemprego e a desequilibrada concentração de renda. Segundo o IBGE, apenas 1% da população detém riqueza superior a dos 50% dos brasileiros mais pobres, ou seja, menos de 2 milhões de pessoas possuem mais que a soma dos bens de 83 milhões de brasileiros _ acresça-se a isto o descaso com a saúde pública. Evidentemente, estes fatores contribuem para o aumento da incidência de doenças infecciosas e parasitárias, incluindo o reaparecimento de outras já praticamente eliminadas, e a expansão de novas patologias.

Desta maneira, assiste-se à expansão dos casos de doenças de veiculação hídrica, ressaltando-se a criptosporidiose, principalmente, em associação com a AIDS. Fica evidente a necessidade de melhoria das condições de saneamento e seu avesso (piora das condições de vida, desemprego, ausência de saneamento básico) é comum às outras doenças endêmicas, epidêmicas, emergentes e reemergentes deste final de século. Assim, não é desejável e muito menos possível fazer qualquer exercício de *futurologia* relacionado às doenças emergentes no século XXI. Entretanto, com base nos dados ora disponíveis, é possível analisar as tendências para os próximos anos.

A globalização ou a hegemonia da cultura do mercado e sua influência sobre as doenças emergentes no Brasil, fruto do pensamento único capitalista central sobre os países periféricos tem trazido sérios problemas para estas populações. A eficiência a todo custo, a concentração da riqueza, o enfraquecimento das políticas públicas sociais, tudo tem contribuído para transformar a noção de nação em um grande mercado global, no qual as políticas e as ações são decididas pelos países centrais. Esta nova cultura neoliberal pode e deve ser combatida mediante a luta por um novo paradigma, centrado na capacidade do ser humano e não na sua capacidade monetário-financeira. Portanto, para que se possam controlar as doenças existentes e as emergentes atuais, fazem-se necessária a eliminação da pobreza e a acentuação da ética. A ética da correta utilização dos recursos públicos, a priorização de aplicação dos mesmos em atividades que beneficiem a maioria da população, principalmente nas áreas da educação, saúde pública e saneamento. A ética, aqui aplicada no seu senso mais amplo, pressupõe a aplicação dos princípios de autonomia individual para o bem coletivo e a justiça distributiva (ou equidade).

A proteção contra futuros surtos de criptosporidiose precisa de novas pesquisas nos processos de desinfecção, rotineiro monitoramento das fontes de água, e desenvolvimento de novas tecnologias para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e outros parasitos na água (ROCHELLE *et al.*, 1999). Assim, é impossível realizar o controle destas doenças sem se discutir equidade, justiça, vulnerabilidade e valorização do que é próprio, sem exacerbação de nacionalismo, mas com a perspectiva da utilização do conhecimento sobre as necessidades locais, e não com a importação de soluções.

Os procedimentos de concentração de oocistos em água mais comuns têm utilizado técnicas de filtração por micrósporos, com diâmetros de 1 a 3 μm . Existe uma diversidade de materiais para sua confecção, tais como filtro de polipropileno, filtro de membrana, e filtro em cápsula. Cada material tem sido aplicado a fontes de água com diferentes níveis e tipo de turbidez. Embora, exista uma variedade de métodos para determinar oocistos (imunofluorescência, citometria de fluxo, *laser scanning*, separação imunomagnética, PCR), a maioria deles possui limitações geradas pela especificidade, viabilidade, precisão e despesas (MULLER, 2000).

Dentro da atualidade em que vivemos, fundamentalmente, uma administração municipal se destaca por investimentos maciços nos setores de saúde, educação e saneamento básico. Uma boa administração pública é baseada na qualidade de vida proporcionada aos seus habitantes. Este objetivo remete à execução de programas, ações, serviços e obras voltados para estas áreas. Numa interface que coloca, juntos, saneamento, saúde e educação, como prioridade de extrema importância, encontra-se a de se ter um sistema de esgotamento sanitário completo, devidamente planejado, de forma a atender a 100% da população urbana com coleta, transporte e tratamento para as águas residuárias domésticas.

A grande maioria das cidades conta atualmente com rede coletora de esgoto já implantada em quase toda a extensão de sua área urbana, necessitando, no entanto de obras para o transporte e tratamento do esgoto doméstico. Este fato aponta para situações de grave agressão ao meio ambiente, pois cursos d'água que cruzam estas cidades são atingidos diretamente por lançamentos "*in natura*" de esgoto bruto, causando além dos danos diretos ao corpo d'água, sérios focos de proliferação de doenças de veiculação hídrica. O planejamento, bem como a construção de um sistema

de esgotamento sanitário eficiente, numa cidade seja ela de pequeno, médio ou grande porte é um desafio para os administradores, porém, necessário e urgente que aponta para estatísticas de elevado impacto social, uma vez que, em curto espaço de tempo, se alcança índices extremamente favoráveis dentro da área da saúde pública e a conseqüente melhoria da qualidade de vida da população.

A crise da água no Brasil é causada, sobretudo, pela ineficiência dos serviços de saneamento básico. A má qualidade da água que chega aos usuários e o lançamento de esgotos não tratados nos rios e açudes têm graves conseqüências para a saúde da população brasileira. Com água e saneamento de qualidade, as internações hospitalares diminuiriam em dois terços. Também a taxa de mortalidade infantil (causada principalmente por diarreias ligadas à qualidade da água) cairia vertiginosamente. Vale notar que, segundo um estudo do BNDES publicado em 1996, para cada R\$ 4,00 investidos em saneamento, seriam economizados R\$ 10,00 na rede hospitalar (ROLDÃO, 2001).

Dados do Ministério da Saúde indicam que cerca de 70% das internações hospitalares da rede pública estão relacionadas com doenças de veiculação hídrica que por sua vez estão diretamente ligadas à ausência de tratamento de esgotos domésticos. Estes mesmos estudos mostram que cada dólar investido em saneamento proporciona a economia de cinco na área da saúde. Sistemas de esgotamento sanitário para atendimento de áreas urbanas, devem ter planejamento e monitoramento efetivos, tendo sua sustentabilidade na forma eficiente e econômica como são realizados, uma vez que as obras a serem implantadas devem possibilitar uma expansão urbana ordenada, não impedindo, desta forma, o desenvolvimento local (MOITINHO *et al.*, 1997).

Conclui-se, que a inexistência ou inadequação do tratamento de dejetos e da proteção aos mananciais de água podem veicular e disseminar *C. parvum*. Em face disso, torna-se fundamental o desenvolvimento e aprimoramento de métodos diagnósticos de detecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOVICH, B., LURA, M.C., GILL, M.I. & HAYE, M.A., 1999. *Cryptosporidium* y agua. *Arq. Microbiol.*, 31: 97105.
- ADAM, K.M.G., PAUL, J. & ZAMAN, V., 1971. *Med. Vet. Parasit.*, 14(3):54-66.
- ALDOM, J.E. & CHAGIA, A.H., 1995. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. *Letters Appl. Microbiol.*, 20:186-187.
- APHA (American Public Health Association), 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19. Ed. Washington: APHA.
- ATHERHOLT, T.B. & KORN, L.R., 1999. ICR protocol: alternative treatment of parasite sample data. *J. Am. Water. Work. Assoc.*, 91(3):95-102.
- AWAD-EL-KARIEM, F.M., WASHURST, D.C. & McDONALD, V., 1994. Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based PCR and endonuclease restriction. *Parasitology*, 109:19-22.
- BATIK, O., CRAUN, G.F. & PIPES, W.O., 1983. Routine coliform and waterborne disease outbreaks. *H. Environ. Health*, 45:227-230.
- BAXBY, D., BLUNDELL, N. & HART, C.A., 1984. The development and performance of a simple sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *J. Hyg.*, 93:317-323.
- BEJ, A.K. & MAHBUBANI, M.H., 1994. Applications of the polymerase chain reaction (PCR) in vitro DNA-amplification method in environmental microbiology in: PCR technology: current innovations. Berlin: CRC Press, 1994. pp 327-339.
- BLOCH, A.B., STRAMER, S.L., SMITH, J.D., MARGOITS, H.S., FIELDS, T.W., MCKINLEY, C.P., GERBA, J.E., MAYNARD, J.E. & SIKES, R.K., 1990. Recovery of

hepatitis A virus from a water supply responsible for a common source outbreak of hepatitis A. *Am. J. Public. Health*, 80: 428-430.

BRONSDON, M.A., 1984. Rapid dimethyl sulfoxide-modified acid-fast stain for *Cryptosporidium* oocyst in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 19(6): 952-953.

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

CAMPBELL, A.T., ROBERTO, H.V., SMITH. & GIRDWOOD, R.W.A., 1994. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts concentrated by calcium carbonate flocculation. *J. Appl. Bacteriol.*, 76:638-639.

CASEMORE, D.P., 1990. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiol. Infect.*, 104.

CIFUENTES, E., JUAREZ, L., ESPINOZA, M., PALOMO, A.M., RANGEL, E., ENRIQUEZ, J., SUAREZ, L., BASTIDA, G., RAMIREZ, F. & LEMUS, V., 1998. Indicadores de calidad de agua en la Cuenca Sur (Xochinilco-Tlahuac) riesgos para la salud y perspectiva de control. 28 de febrero 2002 <http://www.mx/publicaciones/otros/conserva-pública/agua04>

CHEN, Y.G., YAO, F.B., LI, H.S., SHI, W.S., DAÍ, M.X. & LU, M., 1992. *Cryptosporidium* infection and diarrhea in rural and urban areas of Jiangsu, Republic of China. *J. Clin. Microbiol.*, 30:492-494.

CLANCY, J.L., GOLLNITZ, W.D., TABIB, Z., 1994. Commercial laboratories: how accurate are they? *J. Am. Water Works. Assoc.*, 86:89-97.

CLANCY, J.L. & HANSEN, J., 1999. Uses of protozoan monitoring data. *J. Am. Water Works Assoc.*, 91(5):51-65.

- CRAUN, G.F., 1990. Causes of waterborne outbreaks in the United States. *Water Sci. Technol.*, 22:89-98.
- CRAUN, G.F., CALDERON, R.L. & FROST, F.J., 1996. An introduction to epidemiology. *Am. Water. Work. Assoc.*, 54-65.
- CRAWFORD, F.G. & VERMUND, S.H., 1988. Human cryptosporidiosis. *CRC Crit. Ver. Microbiol*, 16:113.
- CRAWFORD, F.G., VERMUND, S.H., MA, J.Y. & DECKELBAUM, R.J., 1988. Asymptomatic cryptosporidiosis in a New York city day care center. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 7:806.
- CURRENT, W.L., 1986. *Cryptosporidium*: its biology and potential for environmental transmission. *CRC. Crit. Rev. Environ. Contr.*, 17-21.
- CURRENT, W.L. & GARCIA, L.S., 1991. Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4:325-258.
- CURRENT, W.L., 1994. *Cryptosporidium parvum*: household transmission. *Ann. Intern Med.*, 120:518.
- D'ANTONIO, R.G., WINN, R.E., TAYLOR, J.P., GUSTAFSON, T.L., CURRENT, W.L., RHODES, M.M., GARY, G.W. & ZAJAC, R.A., 1985. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann. Intern. Med.*, 103:886-888.
- DAWSON, A., GRIFFIN, R., FIEETWOOD, A. & BARRET, N.T., 1995. Farm visits and zoonoses. Public Health Laboratory Service. *Communic. Dis, Rep. (rev.)*, 5 (R81).
- DE LEON, R., NARANJO, J.E., ROSE, J.B. & GERBA, C.P., 1988. Enterovirus, *Cryptosporidium* and *Giardia* monitoring of wastewater reuse effluent in Arizona in: Implementing Water Reuse, Symposium IV. *Am. Water Works. Assoc.*, pp 846. Denver, CO.

DENG, M.Q., CLIVER, D.O. & MARIAN, T.W., 1997. Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:3114-3138.

DENG, M.Q., LAM, K.M. & CLIVER, D.O., 2000. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using MACS Microbeads and high gradient separation columns. *J. Microbiol. Methods*, 40(1):11-17.

DIAS JÚNIOR, O., 1999. *Ocorrência de cistos de Giardia spp. e oocistos de Cryptosporidium spp. em águas superficiais e esgoto no município de Araras-SP*. Dissertação de Mestrado, São Paulo: Universidade Presbiteriana Mackenzie.

DILLINGHAM, R.A., LIMA, A.A. & GUERRANT, R.L., 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 4:1059-1066.

DUFOUR, A.P., FEIGE, M., LINQUIST, A.H.D., MESSNER, M., REGLI, S., RODGERS, C., SCHAEFER, F.W., SCHAUB, S., SINCLAIR, J. & WYMER, L.J., 1999. Criteria for evaluation of proposed protozoan detection methods. EPA 815-K-99-02. *United States Environmental Protection Agency*, Office of Research and Development, Cincinnati, P. 45268.

DUPONT, H.L., CHAPPEL, C.L., STERLING, C.R., OKHUYSEN, P.C., ROSE, J.B. & JAKUBOWSKI, W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.*, 332:855-859.

ENTRALA, E., SBIHI, Y., SANCHEZ-MORENO, M. & MASCARO, C., 2001. Antigen incorporation on *Cryptosporidium parvum* oocyst wall. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96(2): 233-235.

EPA (Environmental Protection Agency), 1999. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/F.A.EPA: 821-R-99-006.

FAYER, R. & UNGAR, B.L.P., 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.*, 50:458-484.

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

FAYER, R., MORGAN, U. & UPTON, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Internat. J. Parasitol.*, 30:1305-1322.

FERRARI, B.C., VESEY, G., WEIR, C., WILLIAMS, K.L. & VEAL, D.A., 1999. Comparison of *Cryptosporidium*- specific and *Giardia*-specific monoclonal antibodies for monitoring water samples. *Water Res.*, 7:1611-1617.

FORD, T.E. & COLWELL., 1995. Disminución global de la calidad microbiológica del agua. 21 septiembre 2001 <http://www.asmus.org/>

FORD, T.E. & COLWELL., 1996. A global decline in microbiological safety of water: A call for action. American Academy of Microbiology.

FRANCO, R.M.B & CORDEIRO, N.S., 1996. Giardose e criptosporidiose em creches no Município de Campinas, S.P. *Rev., Soc. Bras. Med. Trop.*, 29:531-661.

FRANCO, R.M.B., ROCHA-EBERHRD, R. & CANTUSIO, N.R., 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 43(2):109-111.

FURTADO, C., ADAK, G.K., STUART, J.M., WALL, P.G., EVANS, H.S. & CASEMORE, D.P., 1998. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales. *Epidemiol. Infect.*, 121(1):109-119.

GAMBA, R.C., CIAPINA, E.M.P., BATELLO, E.R., ESPINDOLA, R.S., SILVA, A.L.B., PACHECO, A. & PELLIZARI, V.H., 1997. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em água de poços utilizados para consumo em Itaquaquecetuba, SP. *Rev., Soc. Bras. Med. Trop.*, 32:222-241.

GARCIA, L.S., BREWER, T.C. & BRUCKNER, D.A., 1987. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 25(11):119-121.

GARCIA, L.S., SHIMIZU, R.Y. & BERNARD, C.N., 2000. Detection of *Giardia Lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.*, 38(9):3337-3340.

GOMEZ-MORALES, M.A. ATZORI, C., LUDOVISI, A., ROSSI, P., SCAGLIA, M. & POZIO, E., 1995. Opportunistic and non-opportunistic parasites in HIV-positive and negative patients with diarrhea in Tanzania. *Trop. Med. Parasitol.*, 46:109-114.

GRACZYK, T.K., CRANFIELD, M.R. & FAVER, R., 1996. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test Kits for detection of *Cryptosporidium* oocyst of species other than *Cryptosporidium parvum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 54(3):274-279.

GRACZYK, T.K., CRANFIELD, M.R. & FAYER, R., 1997a. Recovery of waterborne oocyst of *Cryptosporidium* from water samples by the membrane filter dissolutin method. *Parasitol. Res.*, 83:121-125.

GRACZYK, T.K., FAYER, R., CRANFIELD, M.R. & OWENS, R., 1997b. *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from water by the membrane filter dissolutin method retain their infectivity. *J. Parasitol.*, 83:111-114.

GUIZELINE, E. & AMATO, N.V., Isolation of oocysts of *Cryptosporidium sp.* In loose stools of patients with AIDS and of immunocompetent children and adults in São Paulo, Brasil. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 47:150-152.

HANSEN, J.S. & ONGERTH, J.E., 1991. Effect of time and watershed characteristic on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:2790-2795.

HARRIS, J.R. & PETRY, F., 1999. *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. *J. Parasitol.*, 85(5):839-849.

HASS, C.N. & ROSE, J.B., 1995. Developing an action level for *Cryptosporidium*. *J. Am. Water Works Assoc.*, 81-84.

HAYES, E.B., MATTE, T.D., O BRIEN, T.R., MCKINLEY, T.W., LOGOSON, G.S., ROSE, J.B., UNGAR, B.L.P., WORD, D.M., PINSKY, P.F., CUMMINGS, M.L., WILSON, M.A., LONG, E.G., HURWITZ, E.S. & JURANEK, D.D., 1989. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *N. Engl. J. Med.*, 320:1372-1376.

HENRICKSEN, S.A. & POHIENZ, J.F.L., 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta. Vet. Scand.*, 22:594-596.

HERWALDT, B.L., CRAUN, G.F., STOKES, S.L. & JURANEK, D.D., 1991. Waterborne-disease outbreaks, 1989-1990. *Mor Motal Wkly Rep CDC Surveill Summ.*, 40:1-21.

HIRATA, T. & HASHIMOTO, A., 1997. A field survey on occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in sewage treatment plants. *International Symposium on Waterborne Cryptosporidium Proceedings*, 183-194.

HSU, B., HUANG, C., HSU Y., JIANG, G. & HSU, C.L., 2001. Evaluation of two concentration methods for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Wat. Res.*, 35(2):419-424.

IGNATIUS, R., LEHMANN, M., MIKSITS, K., REGNATH, T., ARVAND, M., ENGELMANN, E., FUTH, U., HAHN, H. & WAGNER, J., 1987. A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 35(2):446-449.

JAKUBOWSKI, W.S., 1984. Detection of *Giardia* cysts in drinking water: state of the art. In Erlandsen, S.L & Meyer, E.A. *Giardia* and Giardiasis New York: Plenum, p 263-286.

JAKUBOWSKI, W.S., BOUTROS, S., FABER, F., FAYER, F., GHIORSE, W., LeCHEVALLIER, M., ROSE, J.B., SHAUB, S., SINGH, A., STERWART, M., 1996. Environmental methods for *Cryptosporidium*. *J. Am. Water. Works Assoc.*, 88:107-121.

JANOFF, E.N. & RELLER, L.B., 1987. *Cryptosporidium* species, a protean protozoan. *J. Clin. Microbiol.*, 25:967.

JOHNSON, D.W., PIENIAZER, N. & ROSE, J.B., 1993. DNA probe hybridization and PCR detection of *Cryptosporidium* compared to immunofluorescence assay. *Water. Sci. Technol.*, 27:77-84.

JOHNSON, D.W., PIENIAZER, N.J., GRIFFIN, D.W., MISENER, L. & ROSE, J.B., 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:3849-3855.

JURANEK, D.D., ADDIS, D.G., BARLETT, M.E., ARROWOOD, M.J., COLEY, D.G., KAPLAN, J.E., PERCIASEPE, R., ELDER, J.R., REGLI, S.E. & BERGER, P., 1995. Cryptosporidiosis and public health: work-shop report. *J. Am. Water. Works. Assoc.*, 87:69-80.

KAUCNER, C. & STINEAR, T., 1998. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription- PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:1743-1749.

KELLY, P., BABOO, K.S., NDUBANI, P., NCHITO, M., OKEOWO, N.P., LUO, N.P., FELMAN, R.A. & FARTHING, M.J.G., 1997. Cryptosporidiosis in adults in Lusaka, Zambia, and its relationship to oocysts contamination of drinking water. *J. Infect. Dis.*, 176:969-975.

KOOPMANS, M.P., GOOSEN, E.S., LIMA, A.A., MCAUIFFE, I.T., NATARO, J.P., BARRET, L.J., GLASS, R.I. & GUERRANT, R.L., 1997. Association of torovirus with acute and persistent diarrhea in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 504-507.

KRAMER, M.H., HERWALDT, B.L., CRAUN, G.F., CALDERON, R.L. & JURANEK, D.D., 1996. Surveillance for waterborne-disease outbreaks- United States, 1993-1994. *MMWR Surveill Summ.*, 45:1-33.

KRAMER, M.H., HERWALDT, B.L., CRAUN, G.F., CALDERON, R.L. & JURANEK, D.D., 1996. Surveillance for waterborne disease outbreak-United States, 1993-1994. *J. Am. Water. Works. Assoc.*, 88:66-80.

KRAMER, M.H., HERWALDT, B.L., CRAUN, G.F., CALDERON, R.L. & JURANEK, D.D., 1996a. Surveillance for waterborne-disease outbreak-United States, 1993-1994. *MMWR Surveill Summ.*, 45:1-33.

LAXER, M.A., TIMBLIN, B.K. & PATEL, R.J., 1991. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 45:688-694.

LeCHEVALLIER, M.W., NORTON, W.D. & LEE, R.G., 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:2610-2616.

LeCHEVALLIER, M.W. & NORTON, W., 1992. Examining relationships between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium* and turbidity. *J. Am. Water. Work. Assoc.*, 84:(12):54-60.

LeCHEVALLIER, M.W., NORTON, W.D., SIEGEL, J.E. & ABBASZA DEGAN, M., 1995. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2):690-697.

LEE, Y.M., JOHNSON, P.W., CALL, J.L., ARROWOOD, M.J. & TSANG, V.C.W., 1999b. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water and human fecal samples by electrochemiluminescence assay in: INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON WATERBORNE PATHOGENS EXTENO ABSTRACTS. Milwaukee-Wisconsin.

LEVINE, W.C., STEPHENSON, W.T., CRAUN, G.F., 1990. Waterborne disease outbreaks, 1986-1988. *MMWR Surveill Summ.*, 39:1-3.

LEVY, D.A., BENS, M.S., CRAUN, G.F., CALDERON, R.L. & HERWALT, B.L., 1998. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1995-1996. *MMWR Surveill Summ.*, 47:1-34.

LOURERO, E.C., LINHARES, A.C. & MATA, L., 1990. Cryptosporidiosis in children from 1 to 2 years of age, with acute diarrhea in Belém, Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84:117-122.

MACKENSIE, W.R., HOXIE, N.J., PROCTOR, M.E., GRADUS, M.S., BLAIR, K.A., PETERSON, D.E., KAZMIERCZAK, D.G., ADDISS, K.R., FOX, J.B. & DAVIS, J.D., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, 331:161-167.

MADI, K., TRAJMAN, A., SILVA, C.F., BARROSO, P.F., BELO, M.T., CUNHA, J.M. & ELIA, C.C., 1991. Jejunal biopsy in HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 930-937.

MADORE, M.S., ROSE, J.B., GERBA, C.P., ARROWOOD, M.J. & STERLING, C.R., 1987. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. *J. Parasitol.*, 73 (4):702-705.

MANGINI, A.C., DIAS, R.M., GRISI, S.J., ESCOBAR, A.M., TORRES, D.M., ZUBA, I.P., QUADROS, C.M. & CHIEFFI, P.P., 1992. *Cryptosporidium* parasitism in children with acute diarrhea. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 34:341-345.

MARTINS, C.H.G., CASTRO, F.A., SANTOS, V.R.S. & MARTINEZ, R., 1998. Frequência de *Cryptosporidium* spp. associados a pacientes com diarreia em Ribeirão Preto- SP. *Rev., Bras. Anal. Clin.*, 30:31-32.

MATURANA, V.M., ARES-MAZÁS, M.E., DURAN-OREIRO, D. & LORENZO-LORENZO, M.J., 1992. Efficacy of activated sludge in removing *Cryptosporidium parvum* oocysts from sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:3514-3516.

MAYER, C.L. & PALMER, C., 1996. Evaluation of PCR and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* specie in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2081-2085.

MEISEL, J.L., PERERA, D.R., MELIGRO, C. & RUBIN, C.E., 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in a immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70:1156.

MILLARD, P.S., GENSHEIMER, K.F., ADDISS, D.G., SOSIN, D.M., BECKETT, G.A., HOUCK-JANKOSKI, A. & HUDSON, A., 1994. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *J. Am. Med. Assoc.*, 272:1592.

MMWR, 1995. Assessing the public health threat associated with waterborne cryptosporidiosis report a workshop. *MMWR*, 44:1-15.

MOITINHO, M.L.R., ROBERTO, A.C.B.S. & MARTINS, M.R., 1997. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em fezes diarreicas de crianças do município de Maringá-PR. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 29:168:170.

MOORE, A.C., HERWALDT, B.L., CRAUN, G.F., CALDERON, R.L., HIGHSMITH, A.K. & JURANEK, D.D., 1993. Surveillance for waterborne disease outbreaks – United States, 1991-1992. *MMWR Surveill Summ.*, 42:1-22.

MOORE, A.C., HERWALDT, B.L., CRAUN, G.F., CALDERON, R.L., HIGHSMITH, A.K. & JURANEK, D.D., 1994. Waterborne disease in the United States 1991 and 1992. *J. Am. Water. Work. Assoc.*, 86(2): 87-89.

- MOSS, D.M. & ARROWOOD, M.J., 2001. Quantification of *Cryptosporidium parvum* oocysts in mouse fecal specimen using immunomagnetic particles and two-color flow cytometry. *J. Parasitol.*, 87(2):406-412.
- MORGAN, M., MOGAVERO, J. & CHARLES, G., 1995. Optimization of particulate removal under enhanced coagulation conditions. *Proc. AWWA Water Qual. Technol. Conf.*, pp. 741-755.
- MOURA, H., FERNANDES, °, VIOLA, J.P., SILVA, S.P., PASSOS R.H. & LIMA, D.B., 1989. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patients in Rio de Janeiro, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 84:527-533.
- MULLER, A.P.B., 2000. *Detecção de oocistos de Cryptosporidium spp. Em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana do estado de São Paulo*: Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- MUSIAL, C.E., ARROWOOD, M.J., STERLING, C.R. & GERBA, C.P., 1987. Detection of *Cryptosporidium* in water polypropylene cartridge filter. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:687-692.
- NAVIN, T.R. & JURANEK, D.D., 1984. Cryptosporidiosis: clinical epidemiologic and parasitologic review. *Rev. Infect. Dis.*, 6:313-327.
- NEWMAN, R.D., SEARS, C.L., MOORE, S.R., NATARO, J.P., WUHIB, T., AGNEW, D.A., GUERRANT, R.L. & LIMA, A.A., 1999. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.*, 180:167-175.
- NEWMAN, R.D., ZU, S.X., WUHIB, T., LIMA, A.A., GUERRANT, R.L. & SEARS, C.L., 1994. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in urban community in northeast Brazil. *Ann. Intern. Med.*, 120:500-505.
- NIEMINSKI, E.C., SCHAFFER, F.W. & ONGERTH, J.E., 1995. Comparison of two methods for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1714-1719.

NIME, F.A., BUREK, J.D., PAGE, D.L., HOLSCHER, M.A. & YARDIEY, J.H., 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70:592.

ONGERTH, J.E. & PECORARO, J., 1995. Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by conventional treatment and direct filtration. *J. Am. Water Assoc.*, 87:96-106.

ONGERTH, J.E. & STIBBS, H.H., 1987. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 672-676.

OPS (Organização Pan-Americana de Saúde), 1998. La Salud en las Américas. Conferência Sanitária Pan-Americana, publicação N° 569, 2.v.

PAIMER, S.R. & BIFFIN, A.H., 1990. Cryptosporidiosis in England and Wales: prevalence and clinical and epidemiological features. *Br. Med. J.*, 300:774.

PANCLERA, R.J., THOMASSEN, R.W. & GARNER, F.M., 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.*, 8:479.

PAYMENT, P., SIEMIATYCKI, J., RICHARDSON, L., RENAUD, G., FRANCO, E. & PRÉVOST, M., 1997. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *Int. J. Environ. Health. Res.*, 7:5-31.

PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V., 1977. *Parasitologia médica noções sobre as principais técnicas usadas em parasitologia*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

PONCE DE LEÓN, P., FLAHERTY, P. & ZDERO, M., 1999. A new trichromic safranin stain for the detection of *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, species of *Microsporidia* and *Isospora belli*. In fecal material. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 41(4):211-214.

POZIO, E., REZZA, G., BOSCHINNI, A., PEZZOTI, P., TAMBURRINI, A., GATTEI, E., ROSSI, P., DIFINE, M., SMCCHIA, C., SCHIESARI, A., ZUCCONI, R. & BALLARINI, P., 1997. Clinical cryptosporidiosis and human immunodeficiency virus (HIV)-induced immunosuppression: finding from a longitudinal study of HIV-positive and HIV-negative former injection drug users. *J. Infect. Dis.*, 176:969-975.

QUINTERO-BETANCOURT, W., PEELE, E.R. & ROSE, J.B., 2002. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *J. Microbiolol. Meth.*, 49:209-224.

RE, A.L., 1999. *Qualidade microbiológica e parasitológica de águas de consumo humano do município de Araras-SP, com ênfases na pesquisa de oocistos de Cryptosporidium spp. e cistos de Giardia lamblia*. Dissertação de Mestrado, São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

REINTHALER, F.F., 1989. Epidemiology of cryptosporidiosis in children in tropical countries. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 33:505.

RIDER, D., SUOZZO, J. & COLLINS, C., 1996. Dual-stage filter removes protozoan cysts from effluent. *Water Environ. Technol.*, 8(6):15-16.

RIDLEY, D.S. & HAWGOOD, B.C., 1956. The value of formol-ether concentration of faecal cysts and ova. *J. Clin. Pathol.*, 9(1):74-76.

RIVERA, I.N.G. & MARTINS, M.T., 1996. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. *Revista. Ciência Farm.*, 17:115-136.

ROCHELLE, P.A, DE LEON, R., STEWART, M.H. & WOLFE, R.L., 1999. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:106-114.

ROCHELLE, P.A., FERGUSON, D.M., HANDOJO, T.J., DE LEÓN, R., STEWART, M.H. & WOLFE, R.L., 1997. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:2029-2037.

ROLDÃO, S. 2001. *Comparação dos métodos diagnósticos para a detecção de oocistos de Cryptosporidium parvum: levantamento bibliográfico*. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

ROSE, J.B., 1988. Occurrence and significance of *Cryptosporidium* in water. *J. Am. Water Works Assoc.*, 80:53-58.

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

ROSE, J.B., 1991. New technology for protozoology immunofluorescence and gene probe technology for detection of parasites. In: *Monitoring Water in the 1990; S: Meeting New Challenges* (J.R. Hall, G.D. Glysson, org) pp. 422-435, Philadelphia. ASTM.

ROSE, J.B., GERBA, C.P. & JAKUBOWSKI, W., 1991. Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Envir. Sci. Technol.*, 25:1393.

ROSE, J.B., LANDEEEN, L.K., RILEY, K.R. & GERBA, C.P., 1989. Evaluation of immunofluorescence techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:3189-3196.

ROSE, J.B., HUFFMAN, D.E. & GENNACCARO, A., 2002. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26:113-123.

ROSENBLATT, J.E. & SLOAN, L.M., 1993. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. In stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 31(6):1468-1471.

SANCHEZ, N., 1997. Enfermedades emergentes: factores causales y situación epidemiológica por regiones. 21 de septiembre 2001. <http://www.bvs.sld.cu/>

SAUDA, F.C., ZAMARIOLI, L.A., EBNER FILHO, W. & MELLO, L.B., 1993. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos reference center for AIDS, São Paulo, Brasil. *J. Parasitol.*, 79:454-456.

SCHAEFER III, F.W., 1997. Detection of protozoan parasites in source and finished drinking waters. In: *Manual of environmental Microbiology* (C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach & M.V. Walter., org), pp. 153-157, ASM Press, Washington D.C.

SHEPHERD, K.M. & WYN-JONES, A.P., 1995. Evaluation of different filtration techniques for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *Water Sci. Technol.*, 31(5):425-429.

SHEPHERD, K.M. & WY-JONES, A.P., 1996. An evaluation of methods for simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(4):1317-1322.

SHIELD, J., BAUMER, J.H., DAWSON, J.A. & WILKINSON, P.J., 1990. Cryptosporidiosis: educational experience. *J. infect.*, 21:297.

SHUXIANZU, LI., JIN-FEN, J., BARRET, L.J., FAYER, R., SHU-YU, S., McAVILFFE, J.F., (Mandell, G.L cols., 1995), ROCHE, J.K. & GUERRANT, R.L., 1994. Seroepidemiologic study of *Cryptosporidium* infection in children from rural communities of Anhui, China and Fortaleza, Brasil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 51:1-10.

SIMMONS, O.D., JULIANO, J.J., HEANEY, C.D., FRANCY, D.S., SCHAEFER, F.W. & SOBSEY, M.D., 1999. Comparison of filtration methods for primary recovery of *Cryptosporidium* from water in: International Symposium on waterborne pathogens extended abstract. Milwaukee, Wisconsin.

SIMMONS, O.D., SOBEY, M.D., HEANEY, C.D., SCHAEFER, F.W. & FRANCY, D.S., 2001a. Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by method 1622 using ultra-filtration and capsule filtration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(3):1123-1127.

SIMMONS, O.D., SOBSEY, M.D., SCHAEFER, F.W., FRANCY, D.S. & HEANEY, C.D., 2001b. Evaluation of USEPA method 1622 for detection of *Cryptosporidium* oocysts in stream waters. *J. Am. Water. Works. Assoc.*, 93(1):78-87.

SLAVIN, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis*. (sp. nov). *J. Comp. Pathol.*, 65:262.

SLIFCO, T.R., FRIEDMAN, D.E., ROSE, J.B., UPTON, S.J. & JAKUBOWSKI, W., 1997. Unique cultural methods to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental samples. *Wat. Sci. Technol.*, 62(4):1317-1322.

SMITH, H.V. & ROSE, J.B., 1998. Waterborne Cryptosporidiosis: Current Status. *Parasitol. Today*, 14:14-22.

SMITH, H.V. & SMITH, P.G., 1990. Parasitic protozoan in drinking water. *Endeavour*, 14: 74-79.

SMITH, H.V., PATTERSON, W.J., HARDIE, R., GREENE, L.A., BENTON, C., TULLOCH, W., GILMOUR, R.A., GIRDWOOD, R.W.A., SHARP, J.C.M. & FORBES, G.I., 1989. Outbreak of waterborne cryptosporidiosis caused by post-treatment contamination. *Epidemiol. Infect.*, 103:703-715.

SOLO, G.H. & NEUMEISTER, S., 1996. U.S outbreaks of Cryptosporidiosis. *J. Am. Water. Work. Assoc.*, 88(9): 76-86.

STADTERMAN, K.L., SNINSKY, A.M., SYKORA, J.L. & JAKUBOWSKI, W., 1995. Removal and inactivation of *Cryptosporidium* oocysts by activated sludge treatment and anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.*, 31(5/6):97-104.

STERLING, C.R. & ARROWOOD, M. J., 1986. Detection of *Cryptosporidium* spp. Infections using a direct immunofluorescence assay. *Pediatr. Infect. Dis.*, 5(1): 139-142.

STIBBS, H.H. & ONGERTH, J.E., 1986. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *J. Clin. Microbiol.*, 24(4):517-521.

STINEAR, T., MATUSON, A., HINES, K. & SANDERY, M., 1996. Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water concentrates by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 3385-3390.

SZEWZYK, U., SZEWZYK, R., MANZ, W. & SCHLEIFER, K.H., 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annual Rev. Microbiol.*, 54:81-127.

TABS, G., 1995. Epidemiology faces its limits. *Science*, 269:164.

TANGERMANN, R.H., GORDON, S., WIESNER, P. & KRECKMAN, L., 1991. An outbreak of cryptosporidiosis in a day care center in Georgia. *Am. J. Epidemiol.*, 133:471.

TEUNIS, P.F.M., MEDEMA, G.J., KRUIDENIER, L. & HAVELAAR, A.H., 1997. Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in drinking water from a surface water source. *Water Research*, 31:1333-1346.

TEUNIS, P.F.M. & HAVELAAR, A.H., 2002. Risk assessment for protozoan parasites. *Internt. Biodet. & Biodegr.*, 9:122-146.

THURMAN, R., FAULKNER, B., VEAL, D., CRAMER, G. & MEIKLEJOHN, M., 1998. Water quality in rural Australia. *J. Appl. Microbiol.*, 84:627-632.

TOMPS, S.R., 1998. *Estudo epidemiológico da cryptosporidiosis e sua associação com as condições de saneamento ambiental no distrito de São Paulo-SP*. Dissertação de mestrado, São Paulo. Universidade Mackenzie de São Paulo.

TZIPORI, S., 1988. Cryptosporidiosis in perspective. *Adv. Parasitol.*, 27:63.

TZIPORI, S. & WARD, H., 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4:1047-1058.

UNGAR, B.L.P., 1995. *Cryptosporidium* in: *Principles and practice of infectious diseases* (G.L. Mandell, J.E. Bennett & R. Dolin.), pp 2500-2510, Churchill Livingstone, London.

UPTON, S.J., 1999. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. April, 1999.

<http://www.edu/parasitology/topics>

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1995. ICR protozoan Method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* in water by a Fluorescent Antibody Procedure. EPA/814-B-95/003. Usepa, Ofce. Of Ground Water and Drinking Water, Washington, D.C.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1999a. Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. Office of water. EPA-821-R-99-061.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1999b. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Office of water. EPA-821-R-99-006.

VALDEZ, L.M., DANG, H., OKHUYSEN, P.C. & CHAPPELL, C.L., 1997. Flow cytometric of *Cryptosporidium* oocysts in human stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 35(8):2013-2017.

VESEY, G. & SLADE, J.S., 1990. Isolation and identification of *Cryptosporidium* from water. *Water.Sci. Technol.*, 24:165-167.

VESEY, G., HUTTON, P., CHAMPION, A., ASHBOLT, N., WILLIAMS, K.C., WARTON, A.E. & VEAL, D., 1993. Routine monitoring of *cryptosporidium* oocysts in water using flow cytometry. *J. Appl Bacteriol.*, 75:87-90.

VESEY, G., SLADE, J.P., BYRNE, M., SHEPERD, K. & FRICKER, C.R., 1993. A method for concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *J. Appl. Bacteriol.*, 75:82-86.

WALLIS, P.M., ERLANDSEN, S.L., ISAAC-RENTON, J.L., OLSON, M.E., ROBERTSON, W.J., VANKEULEN, H., 1996. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. Isolated from drinking water in Canada. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2789-2797.

WEBER, R., BRYAN, R.T. & JURANEK, D.D., 1992. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 30(11):2869-2873.

WHO (World Health Organization), 1984. *Guidelines for drinking water quality*, Vol.1. Recommendations. Geneva: WHO.

WILSON, R., ANDERSON, L.J., HOLMAN, R.P., GARY, C.W. & GREENBERG, H.B., 1982. Waterborne gastroenteritis due to the Norwalk agent: clinical and epidemiological investigation. *Am. J. Public Health*, 72:72-78.

WORLD DEVELOPMENT REPORT. Development and the environment. Oxford University Press, 1992.

WUHIB, T., SILVA, T.M., NEWMAN, R.D., GARCIA, L.S., PEREIRA, M.L., CHAVES, C.S., WAHLQUIST, S.P., BRIAN, R.T., GUERRANT, R.L. & SOUSA, A.Q., 1994. Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.*, 170:494-497.

YAMAMOTO, N., URABE, K., TAKAOKA, M., NAKAZAWA, K., GOTOH, A., HAGA, M., FUCHIGAMI, H., KIMATA, I. & ISEKI, M., 1996. Outbreak of Cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan in 1996. *Kansenshogaku Zasshi.*, 74(6): 518-526.

ZERBINI, A. M. & CHERNICHARO, C. A. L., 2001. Metodologias para quantificação, identificação e análise de viabilidade de ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados. In: *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: aspectos metodológicos (C.A.L. Chernicharo.,)* pp. 71-107, Minas Gerais: Editora Segrac Editora e Gráfica, Belo Horizonte, MG.

ZHU, G., MARCHEWKA, M.J., ENNIS, J.G. & KEITHLY, J.S., 1998. Direct isolation of DNA from patient stools for polymerase chain reaction detection of *Cryptosporidium parvum*. *J. Infect. Dis.*, 177(5):1443-1446.

ZUCKERMAN, U., ARMON, R., TZIPORI, S. & GOLD, D., 1999. Evaluating of a portable differential continuous flow centrifuge for concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. *J. Appl. Microbiol.*, 86:955-961.