



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ERILANE DE CASTRO LIMA MACHADO

OCORRÊNCIA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp.
EM ÁGUAS SUPERFICIAIS NA REGIÃO
METROPOLITANA DE RECIFE/PE

RECIFE-PE

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ERILANE DE CASTRO LIMA MACHADO

OCORRÊNCIA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp.
EM ÁGUAS SUPERFICIAIS NA REGIÃO
METROPOLITANA DE RECIFE/PE

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do Grau de Doutor em Nutrição.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

ORIENTADORA: Profa. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford
Professora Adjunto do Departamento de Nutrição da UFPE

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves
Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Recife-PE
2006

**OCORRÊNCIA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp.
EM ÁGUAS SUPERFICIAIS NA REGIÃO
METROPOLITANA DE RECIFE/PE**

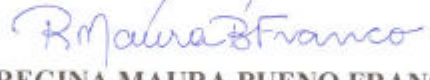
ERILANE DE CASTRO LIMA MACHADO

Tese aprovada em 23/02/2006

Membros da banca examinadora:


MARIA JOSÉ DE SENA


MARCOS ANTÔNIO DE MORAIS JÚNIOR


REGINA MAURA BUENO FRANCO


RINALDO APARECIDO MOTA


ZELYTA PINHEIRO DE FARO

**RECIFE - PE
2006**

DEDICATÓRIA

Ao meu querido esposo **Eduardo Machado**, com muito amor, pelo incentivo, apoio imensurável, paciência e compreensão.

A nossa querida filha **Laura Machado**, com muito amor, pela imensa felicidade e razão de vida.

Aos meus queridos Pais e fiéis amigos **Nelson Lima e M^a Olga Lima**, pelos ensinamentos e princípios morais.

Aos meus queridos sogros **Humberto Machado e M^a Lúcia Machado**, pela imensa compreensão e carinho sempre.

Agradecimento Especial

À **Deus** pela saúde e inspiração para mais uma conquista.

Teu livro

A existência na Terra é um livro que estás escrevendo....

Cada dia é uma página...

Cada hora é uma afirmação de tua personalidade, através das pessoas e das situações que te buscam.

Não menosprezes o ensejo de criar uma epopéia de amor, em torno de teu nome.

As boas obras são frases de luz que endereças à humanidade inteira.

Em cada resposta aos outros, em cada gesto para com os semelhantes, em cada manifestação dos teus pontos de vista e em cada demonstração de tua alma, grafas com tinta perene, a história de tua passagem.

Nas impressões que produzes, ergue-se o livro dos teus testemunhos.

A morte é a grande colecionadora que recolherá as folhas esparsas de tua biografia, gravada por ti mesmo, nas vidas que te rodeiam.

Não desprezes, assim, a companhia da indulgência, através da senda que o Senhor te deu a trilhar.

Faze uma área de amor ao redor do próprio coração, porque só o amor é suficientemente forte e sábio para orientar-te a escritura individual, convertendo-a em compêndio de auxílio e esperança quantos te seguem os passos.

Vive, pois com Jesus, na intimidade do coração, não te afastes d'Ele em tuas ações de cada dia e o livro de tua vida converte-se-á num poema de felicidade e num tesouro de bênçãos.

Emmanuel

Versos

Se procuras ver Jesus
Olhe todos os dias a face do teu irmão
Sem amor ao próximo não há religião

Perfeito só existe um que é Deus
Cada um de nós temos virtudes e defeitos
É só saber conviver com esses conceitos

Olga Lima

Religião

Ame o teu próximo como a te mesmo.
Palavras de Jesus.
Que quer dizer, tudo o que queres que faça a você,
faça aos outros.
E o perdão é a maior fonte de luz entre
Deus e a humanidade.
Devemos perdoar milhões de vezes,
pois, o perdão abre todos os caminhos.
E quando resolvermos perdoar, devemos começar pelas pessoas que nos
cercam, isto é, a família, para que lá fora possamos caminhar conscientes que
estamos cumprindo um grande ato de religiosidade,
portanto de amor ao próximo.

Poema escrito por ***minha mãe Olga***
para divulgação

Aos meus pais e sempre amigos ***Nelson e
Olga***, exemplos de luta e dignidade.

AGRADECIMENTOS

À Profª *Tânia Lúcia Montenegro Stamford*, a quem considero como membro da família e exemplo de profissionalismo, pela valiosa orientação e incentivo na vida pessoal, profissional e científica. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. e sempre amigo *Leucio Câmara Alves*, exemplo de competência, pela valiosa co-orientação, contribuindo para minha formação profissional e científica. Minha imensa gratidão.

Ao Prof. *Marcos Antônio de Moraes Júnior*, pela contribuição fundamental na realização da análise de PCR, paciência e confiança.

Aos Professores e grandes amigos *Rinaldo Aparecido Mota*, *Mª José de Sena* e *Maria Aparecida da Glória Faustino*, pelo incentivo à pesquisa e apoio profissional.

À Profª. *Regina Maura Bueno Franco*, pela imensa atenção e contribuição científica durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores da Área Ciência de Alimentos da Nutrição – UFPE, *Nonete Barbosa Guerra*, *Zelyta Pinheiro de Faro*, *Edleide Maria Freitas Pires*, *Silvana Magalhães Salgado* e *Alda Verônica de Souza Livera* pelos ensinamentos, contribuições diversas e excelente convivência no ambiente de trabalho.

À Odete Bezerra, pelo excelente cuidado com minha filha, garantindo a tranquilidade de todos os dias.

Aos meus irmãos *Elson*, *Enio*, *Nelson filho*, *Eriston*, *Elana*, *Erivelton*, *Erielson* e *Erlania*, pela união e carinho sempre.

À Companhia Pernambucana de Abastecimento (COMPESA), em nome do Diretor Técnico *Álvaro Menezes*, e dos funcionários *Keyla*, pela colaboração e planejamento dos locais de coletas; *Fabiana* e *Fernandina*, pela contribuição nas análises físico-químicas e aos biólogos *Ana Paula* e *Paulo* pela atenção dispensada. À *José Rubens dos Santos* pela cordialidade e à *Serafim Araújo de Lima* “*in memorian*” e *Geraldo* pelo grande ajuda nas coletas da Barragem de Tapacurá.

Aos Alunos do PIBIC e amigos *Daniela Soares*, *Flávio Veras* e *Mellina Albuquerque* pelo belo trabalho em equipe, sem os quais teria sido impossível a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

À Profª *Isabelle Meunier* pela ajuda fundamental na estatística do trabalho.

À *Élcia Cauas* e funcionários do Departamento de Parasitologia do Laboratório Central do Estado (LACEM) pela grande atenção e pelas amostras de *Cryptosporidium* spp. cedidas, fundamental para o desenvolvimento da tese.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial a Coordenação de Pós-graduação do curso de Nutrição pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos “Nonete Barbosa Guerra” (LEAAL) do Departamento de Nutrição da UFPE, em nome de seu chefe, a Prof^a *Nonete Barbosa Guerra*, pelo espaço e permissão de uso de equipamentos essenciais ao desenvolvimento da tese.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias da Área de Medicina Veterinária Preventiva da UFRPE em nome de seu chefe, o Prof. *Leucio Câmara Alves* e ao Laboratório de Genética Molecular, em nome de seu responsável *Tânia Rieger*, pelo auxílio fundamental na realização da técnica de imunofluorescência.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia de Keiso Asami (LIKA), em nome de seu responsável, o Prof. *Marcos Antônio de Moraes Júnior* pela oportunidade de realização da técnica de PCR.

À amiga *Samara Andrade*, exemplo de amizade e pelos conselhos sempre, além da ajuda na estatística e figuras do trabalho.

À amiga *Neide Shinohara*, pelo apoio pessoal e carinho sempre, e valiosas sugestões profissionais.

À amiga *Celiane Maia* pela valiosa amizade e harmonia nas atividades do Laboratório de Fermentação do LEAAL.

Às amigas do Laboratório de biologia molecular *Isabel, Fernanda, Rute, Helaine, Karina* pelo companherismo e cordialidade, e em especial à amiga *Sandra* pelas valiosas sugestões na análise de PCR.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRPE, *Aninha, João, Geovania, Antônio, Marilene, Márcia, Alessandra, Alessandra Alencar, Carlos, Rafael*, pelo carinho e atenção.

À grande amiga *Daniela Mossumez*, pelas pesquisas bibliográficas há tempo realizadas, mas sempre úteis.

À amiga *Tereza Sales* e mais recente companheira nos estudos sobre *Cryptosporidium* spp, pelo material bibliográfico cedido.

Aos amigos e funcionários do LEAAL, *Artur, Alexandre, Camilo, Laércio, Moisés e Vivaldo* pela amizade, apoio e sugestões diversas durante o curso. À *Solange, Marcos* pela cordialidade, e *Lourdes* pela valiosa atenção.

À secretária de Pós-Graduação *Necy* pelas contribuições diversas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, e para a minha formação profissional e científica.

RESUMO

A criptosporidiose tem se destacado como um problema de saúde pública e animal. A associação de casos da doença na população humana com a presença de *Cryptosporidium* spp. em águas de consumo ou de recreação tem motivado a pesquisa do parasito no ambiente aquático. Este estudo objetivou a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na Região Metropolitana de Recife. A técnica de centrífugo-flutuação com solução saturada de cloreto de sódio foi usada para recuperação experimental de oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Oocistos foram pesquisados em mananciais e no sistema de tratamento (água bruta e tratada) através da filtração das amostras em membrana, sendo identificados, sem prévia purificação, pelos métodos de coloração Kinyoun e imunofluorescência direta (IFD) associada ao 4'6'-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI), analisando-se amostras durante 12 meses, nos períodos seco (Setembro à Fevereiro) e chuvoso (Março à Agosto). A qualidade da água foi avaliada através dos parâmetros microbiológicos (coliformes totais e fecais) e físico-químicos (turbidez, pH). A técnica de PCR foi realizada para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. de origem fecal a partir dos iniciadores gênero e espécie-específicos, CPB-DIAGF/CPB-DIAGH e HB-1/HB-2, sendo o DNA extraído com proteinase K e solução de lise sob congelamento/descongelamento. Os resultados mostraram que a técnica de purificação garantiu um material mais limpo, porém o percentual de recuperação de oocistos variou de 39,0% a 98,4%. Na água tratada não se verificou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp., enquanto nas amostras de água bruta foram encontradas estruturas álcool-ácido resistentes similares aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 100% (05/05) dos locais e em 40% (24/60) das amostras analisadas pelo método Kinyoun, sendo a presença do parasito confirmada pela técnica IFD/DAPI em 40% (02/05) dos locais e em 5% (03/60) das amostras, com o número variando de 16 a 40 oocistos/l, e verificando sua ocorrência no período seco e chuvoso. Todas as amostras encontraram-se dentro dos limites microbiológicos e físico-químicos padrões, exceto no parâmetro turbidez. Os produtos de PCR foram obtidos apenas com o uso dos primers CPB-DIAGF/CPB-DIAGR, sendo o melhor perfil de amplificação observado quando 10^5 oocistos foram usados para a extração do DNA, e após o emprego dos protocolos de extração e de amplificação modificados. Conclui-se que a técnica de purificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. influencia os percentuais de recuperação. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. estão presentes em águas de rio na Região Metropolitana de Recife, sendo este o primeiro relato de *Cryptosporidium* spp. em mananciais de Pernambuco e do Nordeste. A técnica IFD/DAPI permite uma melhor identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, no entanto a coloração histoquímica demonstrou ser útil como uma técnica de triagem. As técnicas de extração e amplificação avaliadas neste estudo podem ser usadas para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em amostras com elevado número de oocistos.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp., água, Kinyoun, imunofluorescência direta, DAPI, PCR.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis has been considered a public and animal health problem. Its involvement in human disease and the presence of *Cryptosporidium* spp. in either recreational or consumption water has motivated the research of the parasite in the aquatic environment. This study aimed to detect *Cryptosporidium* spp. oocysts in superficial waters of the Metropolitan Region of Recife. The centrifugal-flotation technique with saturated sodium chloride solution for recovering *Cryptosporidium* spp. oocysts from feces was used. Water samples from both rivers and the water treatment system (treated and raw water) were used to research oocysts. The samples were filtered and were identified without further purification using the methods Kinyoun, direct immunofluorescence (IFA) and by 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Samples were collected and analyzed for 12 months, including drought (September to February) and rainy (March to August) periods. The water quality was evaluated through the microbiological (total and fecal coliform counts) and physicochemical (Turbidity and pH) parameters. Pluviometric precipitation data were obtained from the Laboratory of Meteorology of Pernambuco. The PCR technique was used to detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts from feces with starters genus (CPB-DIAGF/CPB-DIAGH) and species (HB-1/HB-2) - specific, the DNA was extracted using proteinase K and a lysis buffer and exposing the oocysts to a freezing/thawing process. The results showed that the purification technique ensures a cleaner material, with an oocyst recovery range from 39,0% to 98,4%. The oocysts were not found in treated water, but in raw water samples acid fast structures like *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in 100% (05/05) of the locations investigated and in 40% (24/60) of the analyzed samples when using the Kinyoun identification technique, and the presence of the parasite confirmed for technique IFA/DAPI in 40% (02/05) of the locations investigated and in 5% (03/60) when using the IFA/DAPI technique with the number range from 16 oocysts/l to 40 oocysts/l, in periods of dry and raining seasons. All the samples were found within the microbiological and physicochemical standards limits, except in the turbidity parameter. The PCR products were obtained using the CPB-DIAGF/CPB-DIAGH primers, having the best amplification result with 10⁵ oocysts used for DNA extraction, and after using the modified protocols. It is plausible to conclude that the *Cryptosporidium* spp. oocyst purification technique influences the expected recovery rate. *Cryptosporidium* spp. oocysts occur in river waters of the Metropolitan Region of Recife. This is the first report of *Cryptosporidium* spp. in surface water in the state of Pernambuco and in the Northeast of Brazil. The IFA/DAPI technique showed the best performance in the identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples. Therefore, histochemical staining technique demonstrated to be useful as a screening method. The extraction and amplification techniques evaluated in this study can be used for detecting *Cryptosporidium* spp. in samples with elevated number of oocysts.

Key word: *Cryptosporidium* spp., water, Kinyoun, direct immunofluorescence, DAPI, PCR.

LISTA DE TABELAS

TRABALHO CIENTÍFICO I

Tabela 1. Médias e desvio padrão do número inicial de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e recuperados no sobrenadante e sedimento, após a técnica de purificação	82
--	----

TRABALHO CIENTÍFICO II

Tabela 1. Resultados do número de estruturas álcool-ácido-resistentes coradas pelo método Kinyoun e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. identificados pela técnica IFD/DAPI, e das análises físico-químicas e microbiológicas das amostras de água bruta que apresentaram positividade na análise parasitológica no período seco e chuvoso	101
--	-----

LISTA DE FIGURAS

TRABALHO CIENTÍFICO I

Figura 1. Desenho esquemático das etapas da purificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. por flutuação com análise do sobrenadante e do sedimento	80
---	----

TRABALHO CIENTÍFICO IV

Figura 1 – Desenho esquemático das etapas de purificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. por flutuação	122
Figura 2 – Perfis da amplificação de amostras do DNA de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. a partir de 10^3 oocistos	125
Figura 3 - Perfis da amplificação de amostras do DNA de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. a partir de 10^5 oocistos	125

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE <i>Cryptosporidium</i> spp.	18
3.2 QUALIDADE DO AMBIENTE AQUÁTICO	20
3.3 <i>Cryptosporidium</i> NO AMBIENTE AQUÁTICO: ASPECTOS RELEVANTES NA DISSEMINAÇÃO E DIAGNÓSTICO	24
3.3.1 Resumo	24
3.3.2 Abstract	25
3.3.3 Introdução	26
3.3.4 Classificação de <i>Cryptosporidium</i> quanto à espécie e genótipo	28
3.3.5 Veiculação de <i>Cryptosporidium</i> spp. por água	30
3.3.6 Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. e parâmetros de previsibilidade	33
3.3.7 Métodos de análises para a detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp.	34
3.3.8 Métodos de concentração	36
3.3.9 Métodos de identificação	39
3.3.10 Fatores que influenciam na detecção e recuperação dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	41
3.3.11 Considerações finais	43
3.3.12 Referências Bibliográficas	44

3.4 MÉTODOS PADRÕES E ALTERNATIVOS PARA PESQUISA DE <i>Cryptosporidium</i> spp. NO AMBIENTE AQUÁTICO	53
3.5 PCR NA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> spp.	55
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
5 TRABALHOS CIENTÍFICOS	75
5.1 ARTIGO CIENTÍFICO I: EFEITO DA ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS NA RECUPERAÇÃO DOS OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM AMOSTRAS FECAIS PELA TÉCNICA DE FLUTUAÇÃO COM CLORETO DE SÓDIO SATURADO	75
5.1.1 Resumo	75
5.1.2 Abstract	76
5.1.3 Introdução	76
5.1.4 Material e Métodos	78
5.1.4.1 Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	78
5.1.4.2 Concentração e quantificação dos oocistos na amostra fecal	78
5.1.4.3 Purificação dos oocistos	79
5.1.4.4 Eficiência da purificação de oocistos	80
5.1.4.5 Análise de dados	80
5.1.5 Resultados e discussão	81
5.1.6 Conclusão	85
5.1.7 Referências Bibliográficas	85
5.2 ARTIGO CIENTÍFICO II: PESQUISA DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM ÁGUAS SUPERFICIAIS NA REGIÃO METROPOLITANA DE RECIFE	90
5.2.1 Resumo	90
5.2.2 Abstract	91

5.2.3 Introdução	92
5.2.4 Material e Métodos	97
5.2.5 Resultados e Discussão	99
5.2.6 Conclusão	107
5.2.7 Referências Bibliográficas	107
5.3 ARTIGO CIENTÍFICO III: AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM AMOSTRAS FECAIS	116
5.3.1 Resumo	116
5.3.2 Abstract	117
5.3.3 Introdução	118
5.3.4. Material e Métodos	120
5.3.4.1 Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	120
5.3.4.2 Concentração e quantificação dos oocistos na amostra fecal	121
5.3.4.3 Purificação dos oocistos nas amostras fecais	121
5.3.4.4 Extração do DNA	122
5.3.4.5 Extração do DNA modificada	123
5.3.4.6 Amplificação por PCR e eletroforese de DNA	123
5.3.4.7 Modificação da amplificação	124
5.3.5 Resultados e Discussão	125
5.3.6 Conclusão	130
5.3.7 Referências bibliográficas	130
6. CONCLUSÕES GERAIS	137
7. APÊNDICES	138

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Cryptosporidium* spp. constituem agentes parasitários e oportunistas de caráter zoonótico com amplo espectro de hospedeiros, incluindo o homem, sendo potencialmente patogênico em indivíduos imunodeprimidos e em crianças, de forma que pode levar ao óbito (MORGAN, 2000; MORGAN et al., 2000). No Brasil, 2842 casos de criptosporidiose foram detectados no período de 1980 a 1997 entre os pacientes imunodeprimidos, particularmente nos pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida, sendo as regiões Nordeste e Sudeste do país as áreas com maior frequência (CRT, 1997). Na cidade de Recife, de acordo com Arcoverde (2001), a frequência de infecção pelo *Cryptosporidium* spp. nesses pacientes foi de 21,8%, sendo superior à frequência de outros patógenos veiculados por água e/ou alimentos na mesma cidade.

Vários surtos da doença vêm sendo atribuídos ao consumo de água contaminada submetida ou não a tratamento (CETESB, 2000). Entretanto um dos problemas para controlar a infecção é a escassez de dados sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais destinadas ao consumo público, levando a uma subestimação de casos de criptosporidiose. No Brasil, dados obtidos por Gamba et al. (2000) e Franco et al. (2001) mostraram a presença de oocistos em poços localizados na cidade de Itaquaquecetuba/SP e nas águas superficiais do rio Atibaia em Campinas/SP, respectivamente.

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais tem sido associada ao grau de turbidez e à presença de coliformes fecais, parâmetros avaliados rotineiramente para a mensuração da qualidade da água, no entanto há contradições quanto às correlações positivas entre esses parâmetros e a presença de *Cryptosporidium* spp. (LeCHEVALLIER et al., 1991).

Desta forma acredita-se que os coliformes fecais, que têm sido referência mundial como indicadores de contaminação fecal, não são bons indicadores para protozoários (HACHICH et al., 1999).

Sendo assim torna-se necessário a pesquisa deste parasito para a observação da potabilidade da água (BRASIL, 2004), conforme recomenda a portaria 518/2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004). A escolha de um método a ser empregado em análise de rotina depende de alguns fatores, dentre eles o custo-benefício associado às recomendações previstas em normas oficiais para o padrão de ausência de *Cryptosporidium* spp..

Diferentes métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos para a detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, cada qual com suas vantagens e desvantagens, porém ainda não há um método universalmente aceito (SMITH, 1998). Na identificação do agente pelos métodos histoquímicos, imunológicos e moleculares, alguns dos seguintes fatores podem exercer influência: natureza da amostra, número de oocisto na amostra, método e substância para concentração dos oocistos na amostra, integridade do oocisto durante a análise e/ou presença de fatores inibidores de reação no que se refere às técnicas moleculares (LIMA, 2001; KAUCNER & STINEAR, 1998).

Desta forma, tendo em vista a escassez de dados, é relevante a verificação da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na Região Metropolitana de Recife, além da avaliação de métodos de detecção.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na Região Metropolitana de Recife.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) avaliar o efeito da eliminação de resíduos na recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. pela técnica de flutuação com cloreto de sódio saturado;
- b) avaliar águas não tratadas e tratadas quanto à ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp.;
- c) avaliar a qualidade microbiológica de águas não tratadas e tratadas quanto às análises de coliformes totais e fecais, e físico-química quanto a turbidez e o potencial hidrogênio-iônico (pH);
- d) avaliar as técnicas de Kinyoun e imunofluorescência direta (IFD) associada ao 4'6-Diamidino - 2 - Phenylindole (DAPI) na detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água não tratadas e tratadas;
- e) avaliar a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificar os isolados de *Cryptosporidium* spp. através de iniciadores gênero e espécie-específicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium spp. pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e Família Cryptosporidiidae (LEVINE, 1984). Este protozoário foi primeiramente encontrado no estômago de ratos em 1907 por Tyzzer, sendo denominado de *Cryptosporidium muris*. Pouco tempo após, uma segunda espécie nomeada de *Cryptosporidium parvum* foi identificada no intestino de camundongos (TYZZER, 1912). Inicialmente foi considerado um parasito comensal e poucas pesquisas eram desenvolvidas, até que ocorreu o primeiro surto de criptosporidiose em 1950, com mortalidade em aves domésticas (SALVIN, 1955). O primeiro caso relatado em humanos foi descrito por Nime et al (1976), sendo diagnosticado em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos desde o início da década de 80 (LABERGE et al., 1996a).

Cryptosporidium spp. possui ciclo monoxeno, tendo seis estágios de desenvolvimento no organismo, todos os quais parecem crescer infectando a célula do hospedeiro, e assim localizam-se em vacúolo parasitóforo extracitoplasmático e intracelular que se encontra na borda dos microvilos das células epiteliais (SMITH, 1993). Os seis maiores eventos do ciclo de vida do *Cryptosporidium* spp. incluem: (1) excitação, o desencistamento ou liberação de esporozoítos infectantes após ação de enzimas proteolíticas e sais biliares no intestino delgado; (2) merogonia, diferenciação do esporozoíto em trofozoíto para a multiplicação assexuada dentro das células do hospedeiro, resultando em dois tipos de merontes, o tipo I com oito merozoítas, que reiniciam o ciclo produzindo novos merontes do tipo I e o tipo II com quatro merozoítas, o qual parece originar a fase seguinte; (3) gametogonia, a fase sexual

onde há formação de micro (masculino) e macrogametócitos (feminino); (4) fertilização, após o qual o macrogameta se desenvolve em oocisto; (5) formação da parede do oocisto e (6) esporogonia, a esporulação *in situ* com formação de quatro esporozoítos (GRIMASON et al., 1990; GELLIN & SOAVE, 1992; LALLO, et al., 1996; DONNELLY & STENTIFORD, 1997).

Dentre as particularidades do *Cryptosporidium* spp., o oocisto não possui esporocisto, sendo a sua parede a única barreira entre os esporozoítos e o meio externo, e apresenta uma sutura linear disposta no terço ou na metade distal da parede (REDUKER et al., 1985). Smith (1993) cita que há dois tipos de oocistos, aqueles de parede espessa, eliminados nas fezes e resistentes às condições ambientais, sendo responsáveis pela transmissão do parasito entre hospedeiros; e aqueles de parede delgada que se rompem no hospedeiro e liberam esporozoítos que invadem células epiteliais não infectadas, responsáveis por autoinfecções. A esporulação, fase em que o oocisto se torna infectante, ocorre ainda dentro do hospedeiro, o que reflete na eliminação de oocistos completamente infectantes nas fezes (SMITH, 1993; LABERGE et al, 1996a). Laberge et al (1996a) citam que 80% dos oocistos têm parede espessa, o que influencia na sua resistência às condições ambientais e infectividade fora do hospedeiro além de favorecer severas infecções em hospedeiros, mesmo que haja contato com um mínimo de oocistos.

Harris & Petry (1999) comentam que a parede dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. é composta por três camadas, duas glicoprotéicas intermediada por um complexo lipídico (glicolipídica/lipoproteica), tornando-o extremamente resistente à ruptura mecânica ou química, no entanto, não se conhece qual das camadas de parede é responsável pela rigidez e resistência exibida pelo oocisto intacto, acredita-se que isso seja favorecido pelas camadas, central e interna. Em consequência à

resistência mecânica do oocisto, há dificuldade de liberação do seu conteúdo interno, e após a excitação muitas vezes os esporozoítos são liberados e o corpo residual com o vacúolo lipídico e grânulos amilopectínicos não ultrapassam a sutura da parede (REDUKER et al., 1985).

3.2 QUALIDADE DO AMBIENTE AQUÁTICO

A água é o mais precioso recurso natural que propicia saúde, conforto e riqueza ao homem, por meio de seus incontáveis usos, dos quais se destacam o abastecimento das populações, a irrigação, a produção de energia, o lazer, a navegação (CETESB, 2005a). É de domínio público e de vital importância para a existência da própria vida na terra, pois o homem apresenta cerca de 70% de água na sua estrutura, funcionando como solvente e via de transporte de substâncias orgânicas essenciais, além de regular a temperatura corpórea através da respiração e transpiração (AMBIENTE BRASIL, 2005).

O volume de água no planeta corresponde a $1,4 \times 10^{21}$ litros, e na forma de água líquida e de gelo recobre cerca de 75% da superfície terrestre. No entanto a água salgada representa 97,5%, enquanto a quantidade de água doce corresponde a 2,5%, dos quais as calotas polares e geleiras representam 68,9%, os rios e lagos 0,3%, a água subterrânea 29,9% e outros reservatórios 0,9%, sendo a quantidade de água potável muito pequena, nas águas de rios, lagos e subsolo até 750 metros de profundidade (MEDEIROS, 2004). A disponibilidade de água doce se torna ainda mais limitada pelo comprometimento de sua qualidade. Assim sendo, o rápido crescimento da população mundial, a industrialização e a crescente poluição, tornam a água o recurso natural mais estratégico de qualquer país do mundo.

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), para cada 1.000 litros de água utilizados, outros 10 mil são poluídos, e parece estar cada vez mais difícil se conseguir água para todos, principalmente nos países em desenvolvimento (AMBIENTE BRASIL, 2005).

A poluição das águas é gerada por efluentes domésticos; efluentes industriais e carga difusa urbana e agrícola (poluentes advindos da drenagem destas áreas: fertilizantes, defensivos agrícolas, fezes de animais e material em suspensão). Segundo a ONU, 50% da taxa de doenças e morte nos países em desenvolvimento são decorrentes da falta de água ou pela sua contaminação (SBPC/BRASIL, 2000).

No Brasil, apesar de possuir a maior disponibilidade hídrica do planeta, ou seja, 13,8% do deflúvio médio mundial, a situação é alarmante, uma vez que 63% dos depósitos de lixo no país estão em rios, lagos e restingas e 90% do esgoto produzido no país, é despejado em rios, lagos e mares sem nenhum tratamento, resultando assim em graves problemas de abastecimento no país (CANEDO, 2005, AMBIENTE BRASIL, 2005). Dados da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - FIBGE (2002) mostram que 47,8% dos municípios brasileiros não têm coleta de esgoto, de forma que o Norte é a região com a maior proporção de municípios sem coleta (92,9%), seguido do Centro-Oeste (82,1%), do Sul (61,1%), do Nordeste (57,1%) e do Sudeste (7,1%). Nesses casos, os principais receptores do esgoto “*in natura*” não coletado são os rios e mares, comprometendo a qualidade da água utilizada para abastecimento, irrigação e recreação (FIBGE, 2002).

As principais doenças relacionadas com a água podem ocorrer através da ingestão ou contato com a água contaminada, e por meio de insetos vetores que se desenvolvem na água (UNIAGUA, 2005).

A detecção dos agentes patogênicos, principalmente vírus, bactérias, e protozoários, em uma amostra de água é extremamente difícil, em razão de suas baixas concentrações. Sendo assim, a determinação da contaminação da água pode ser feita de forma indireta, através dos organismos indicadores. Os coliformes totais e coliformes fecais estão presentes em grandes quantidades nas fezes do ser humano e dos animais de sangue quente, e sua presença na água não representa, por si só, um perigo à saúde, mas indica a possível contaminação de outros patógenos causadores de doenças e, desta forma são considerados os principais indicadores de contaminação fecal (HARWOOD, 2001). Porém alguns estudos têm demonstrado que os coliformes não são bons indicadores para protozoários (HACHICH et al., 1999; MULLER, 1999; GAMBA et al., 2000; CARDOSO et al., 2003).

No Brasil, os padrões de potabilidade são regidos pela portarias nº 518/2004- Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) e resoluções legais, que dão subsídios aos laboratórios na expedição de seus laudos. Para o padrão de potabilidade da água, além das análises de coliformes, são exigidas no Brasil, como complementação, a pesquisa de enterovírus, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., e semelhantemente a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) determinam a ausência desses parasitos na água (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002).

Desta forma os serviços públicos de abastecimento devem fornecer água sempre saudável e de boa qualidade. E para verificar a eficiência do processo de tratamento para remoção de patógenos, o monitoramento é de fundamental importância, devendo ser realizado com base em inspeções sanitárias e nos resultados de análises representativas tanto do manancial a ser utilizado como fonte de abastecimento como da água tratada (CETESB, 2005b). Particularmente no que se refere ao *Cryptosporidium*

spp., que além de ocorrer amplamente em águas superficiais bruta, é também bastante freqüente na água de consumo, possivelmente devido ao pequeno tamanho do oocisto, ou a possibilidade de falhas no tratamento como a utilização de quantidades inadequadas de coagulantes usados para reduzir a alta turbidez, reciclagem do filtro de água, ou devido a problemas de contaminação pós-tratamento (LeCHEVALLIER et al., 1991; SMITH, 1998; FAYER, 2004).

A transmissão de oocistos e de doenças causadas por *Cryptosporidium* spp. de origem aquática, seja através de água de consumo ou práticas de recreação foram bem documentadas por vários autores (SOLO-GABRIELE & NEUMEISTER, 1996; CAREY et al., 2004; FAYER et al., 2004). No período de 1984 e 1999 dos 75 casos de criptosporidioses transmitidos pela água nos Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Nova Zelândia e Japão, 56% foram associadas à água de consumo, e 44% foram relacionados ao uso de água de recreação incluindo piscinas, rios e lagos (FAYER et al., 2000). LeChevallier & Norton (1995) relataram a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em 60% das amostras de água bruta, e em 13% das amostras de água de consumo no Canadá.

No Brasil, o monitoramento da qualidade das águas doce vem sendo realizado pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo e dados sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático foram obtidos neste Estado (HARICH et al., 1999, FARIAS et al. 2002, FRANCO et al., 2001; FRANCO & CANTUSIO NETO, 2002; MULLER, 1999; GAMBA et al., 2000) e no Estado de Minas Gerais (FERREIRA et al., 2004).

3.3 *Cryptosporidium* spp. NO AMBIENTE AQUÁTICO: ASPECTOS RELEVANTES NA DISSEMINAÇÃO E DIAGNÓSTICO¹

3.3.1 Resumo

A criptosporidiose é uma doença de distribuição mundial importante para a saúde pública tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. A via de transmissão do *Cryptosporidium parvum* freqüentemente tem sido associada à contaminação de água, porém estudos epidemiológicos sobre esse protozoário têm revelado que a sua incidência no ambiente aquático é subestimada. A falta de um método de detecção apropriado para a pesquisa dos oocistos em amostras de água pode ter contribuído para isso, no entanto na tentativa de compreender e monitorar o significado desse patógeno em amostras ambientais, vários métodos tem sido propostos para o isolamento e identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Este artigo científico discute vários aspectos sobre o *Cryptosporidium* spp., dentre eles a ocorrência desse patógeno no ambiente aquático e os avanços nos métodos de detecção. Apesar da existência de técnicas de biologia molecular para a identificação do agente, os métodos parasitológicos ainda vêm apresentando resultados satisfatórios, porém é limitado quando existe baixo número de oocistos na amostra analisada. A reação em cadeia de polimerase (PCR) é um método de detecção promissor e a sua aplicação na análise das amostras de água para a pesquisa de *C. parvum* tem sido descrita. A identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. na amostra de água é influenciada pelo número de oocistos presentes, pela sensibilidade e especificidade do método e

¹ Artigo publicado na Revista Ciência & Saúde Coletiva, v. 8, n. 3, p. 791-800, 2003.

principalmente pelo método de concentração dos oocistos na amostra, cujo aperfeiçoamento é fundamental para a precisão da análise e pesquisa do parasito.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp. spp., transmissão hídrica, métodos de diagnósticos, concentração de oocistos

3.3.2 Abstract

Cryptosporidiosis is an important problem of public health not only in developed countries but also in undevelopment areas. The role of *Cryptosporidium* spp. *parvum* as a waterborne pathogen has been documented. But epidemiological features of this parasitic protozoon lead to the assumption that the incidence of *Cryptosporidium* spp. in aquatic environmental is under-estimated. The lack of sensitive detection methods adapted for oocysts detection in water contributed to this under-reporting, but to monitor and understand the public health significance of this pathogen in environmental samples, several methods have been developed to isolate and detect *Cryptosporidium* spp. oocysts. This review paper discusses various aspects of *Cryptosporidium* spp. spp., including the occurrence of these pathogens in aquatic environmental and the available detection methods. The diagnostic's methods including the parasitological identification of the agent and molecular biology, but the first continue to show satisfactory results. Although the numbers of oocysts in these samples could be a problem. Polimerase chain reaction (PCR) is a promising detection method and the potential use in the detection of *C. parvum* in water has been described. The *Cryptosporidium* spp. oocysts identification in water samples depends on the number of oocysts, sensibility of methods, and the concentration technique and this step is fundamentally to precision of test.

Key words: *Cryptosporidium* spp. spp., waterborne transmission, diagnostic methods, concentration of oocysts

3.3.3 Introdução

A criptosporidiose é conhecida por sua ocorrência na população humana e animal, notadamente naqueles pacientes imunocomprometidos (CRAWFORD & VERMUND, 1988), pois uma vez estabelecida a infecção, a severidade do quadro clínico resulta quase sempre em óbito. No Brasil, 2842 casos da doença foram detectados no período de 1980 a 1997 entre os pacientes imunodeprimidos, particularmente nos indivíduos portadores da SIDA, sendo as regiões Nordeste e Sudeste do País as áreas mais afetadas (CRT, 1997). Na cidade de Recife, a frequência de infecção pelo *Cryptosporidium* spp. nesses pacientes chegou a um percentual de 21,8%, sendo superior a frequência de outros patógenos veiculados por água e/ou alimentos (ARCOVERDE, 2001). No entanto, o estado imunológico não está relacionado com a presença da doença, uma vez que a infecção pode ocorrer em indivíduos saudáveis, os quais apresentam um quadro clínico autolimitante. Isto torna preocupante a ocorrência de portadores assintomáticos para a saúde pública. Outro ponto importante é a ausência de uma conduta terapêutica eficaz contra a criptosporidiose.

Dentre as diversas formas de transmissão da criptosporidiose, destaca-se a veiculação por água e alimentos (SMITH, 1993), sendo o mecanismo de transmissão influenciado pelo nível de contaminação ambiental, sobrevivência do oocisto às condições do meio (Robertson et al., 1992), e resistência do oocisto aos mais variados métodos usados em tratamentos da água (KORICH et al., 1990), seja a cloração, a

ozonização ou a incompleta remoção dos oocistos pelos métodos de filtração.

Vários surtos da doença foram atribuídos ao consumo de água contaminada, sejam elas submetidas ou não ao tratamento por cloro ou outros processos tais como coagulação, sedimentação e filtração em areia (CETESB, 2000).

Um dos problemas para controlar a infecção é a escassez de dados sobre a real ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em mananciais aquáticos potáveis, levando a uma subestimação de casos de criptosporidiose e muitas vezes a associação de surtos seguidos de óbito com outros patógenos, particularmente o agente etiológico da cólera.

No Brasil, dados obtidos por Gamba et al. (2000) e Franco et al. (2001) mostraram a presença de oocistos em poços localizados na cidade de Itaquaquecetuba/SP e nas águas superficiais do rio Atibaia em Campinas/SP, respectivamente.

A importância do estudo sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático foi reforçada pelas citações da portaria atual 1469 do Ministério da Saúde (2000), que recomenda a inclusão da pesquisa de *Cryptosporidium* spp. para se atingir o padrão de potabilidade da água. Aliado a isso os coliformes fecais, considerados referência mundial como indicador microbiológico para água e alimentos, não são bons indicadores para protozoários (HACHICH et al., 1999). A escolha de um método de pesquisa a ser empregado em análise de rotina depende de alguns fatores, dentre eles o custo-benefício associado às recomendações previstas em normas oficiais para o padrão de ausência de *Cryptosporidium* spp. spp..

É de extrema relevância a padronização de um eficiente método de pesquisa para *Cryptosporidium* spp. spp. e a obtenção de dados de ocorrência e distribuição do parasito por região para o planejamento de medidas de controle e vigilância da água para consumo humano. Além de que se faz necessário o esclarecimento sobre a espécie

existente em mananciais aquáticos, sobre os parâmetros de previsibilidade e ocorrência sazonal do parasito para uma avaliação do risco de infecção pelo *Cryptosporidium* spp. na população humana.

3.3.4 Classificação de *Cryptosporidium* quanto à espécie e genótipo

O estudo filogenético vem sendo realizado por vários grupos de pesquisadores (TZIPORI E GRIFFITHS, 1998; MORGAN E THOMPSON, 1998; XIAO et al., 1998; XIAO et al., 1999), porém ainda há divergências quanto à taxonomia do *Cryptosporidium* spp.. Desde a descoberta do *Cryptosporidium* spp. *muris* e *C. parvum* em roedores, em torno de 20 espécies de *Cryptosporidium* spp. tem sido mencionadas em várias espécies de hospedeiros animais (O'DONOGHUE, 1995). Tzipori et al. (1980) comentam sobre uma peculiaridade que distingue o *Cryptosporidium* spp. da grande maioria dos outros coccídios, a falta de especificidade para hospedeiros. Arcay et al. (1995) reforçam essa idéia ao infectar todas as classes de vertebrados (mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes), com o *C. parvum* isolado do homem, sugerindo a existência de uma única espécie.

Baseado nessas observações, Levine (1984) e Levine (1986) classificaram o parasito, e atualmente acredita-se que as seguintes espécies são consideradas válidas: *Cryptosporidium parvum* responsável por doenças clínicas em humanos e outros mamíferos; o *Cryptosporidium muris* encontrado em roedores e em outros mamíferos; *Cryptosporidium meleagridis* e *Cryptosporidium baileyi* que infectam aves; *Cryptosporidium nasorum* encontrada em peixes e *Cryptosporidium serpentis* em répteis (O'DONOGHUE, 1995). Estudos subsequentes adicionaram à lista de espécies válidas, *Cryptosporidium wrairi* de cobaias e *C. felis* de gatos (XIAO et al., 1999).

Tzipori & Griffiths (1998) baseando-se em análises filogenéticas citam que as variações inter e intra-espécie existentes não permitem ainda designar espécies diferentes de *Cryptosporidium* spp., e todos os oocistos do parasito, incluindo aquelas de hospedeiros vertebrados inferiores, podem ser perigosos para o homem. Recentes avanços nesse assunto indicam que há multi-espécies complexas contida em pelo menos 4 espécies de *Cryptosporidium* spp.: *C. parvum*, *C. muris*, *C. baileyi* e *C. serpentis*, enquanto as referidas espécies como *C. wrairi*, *C. felis*, *C. meleagridis* e *C. saurophilum* estariam agrupadas no *C. parvum* (as demais espécies não foram estudadas). Assim, há vários genótipos diferentes de *C. parvum* (genótipo 1, genótipo 2, genótipo guinea pig, genótipo “Monkey” e “Koala”) de grande importância epidemiológica, uma vez que o genótipo 1 é a cepa responsável pela maioria das infecções humanas, enquanto o genótipo 2 provavelmente é o que mais ocorre no ambiente, podendo infectar animais e homens (XIAO et al., 1998; XIAO et al., 1999).

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Koch et al. (1985) comentam que a existência de dois grandes genótipos estariam associados com os dois diferentes ciclos de transmissão, um dos quais sendo por transmissão antroponótica e o outro por transmissão zoonótica e significativamente do bovino ao homem. Gibbons et al. (1998), através de estudos de tipificação molecular identificaram genótipos humano e animal, designados de genótipo H (Human) e genótipo C (Calf), respectivamente (MORGAN & THOMPSON, 1998).

A frequência de infecção pelo *Cryptosporidium* spp. na população humana tem sido bem estudada e divulgada documentando-se a infecção pelo *C. parvum*, no entanto Katsumata et al. (2000) revelou a suspeita de infecção no homem pelo *C. muris*. Este fato é bastante relevante para alertar sobre a importância da precisão no diagnóstico da infecção quanto à diferenciação entre as espécies, seja morfológica

(UPTON & CURRENT, 1985) ou geneticamente, uma vez que a caracterização do *Cryptosporidium* spp. pela biologia molecular tem evoluído bastante.

3.3.5 Veiculação de *Cryptosporidium* spp. por água

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos mananciais aumenta a preocupação com a transmissão do parasito, porque enquanto ocorre por contato com fômites contaminados, de pessoa a pessoa, animal a pessoa, restringe-se o número de pessoas infectadas, no entanto quando ocorre por veiculação hídrica pode atingir facilmente um grande contingente da população. Smith (1998) descreve sobre as diversas razões para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. tornarem-se significantes patógenos de transmissão hídrica: provocam infecções endógenas com baixa dose infectante, as densidades de contaminação ambiental com cistos e oocistos infectantes são suficientes para poluir o ambiente aquático, e os oocistos são bastante pequenos para atravessar o processo de tratamento da água além de serem resistentes aos desinfetantes comumente empregados no tratamento da água.

O primeiro surto de criptosporidiose, que vitimou 79 pessoas, ocorreu em 1984 no Texas/EUA, sendo diagnosticado por um estudo epidemiológico, portanto sem a confirmação do parasito na água de poço suspeita. A partir deste outros casos foram descritos, e dentre aqueles de maior impacto estão os casos que ocorreram na Geórgia/EUA em 1987, onde 13000 pessoas foram afetadas, e em Saitama/Japão, quando 8705 indivíduos foram acometidos, sendo o *Cryptosporidium* spp. detectado na água tratada e não tratada. Em Oregon/ EUA houve 15000 casos de criptosporidiose, e o parasito foi detectado na água em processo de tratamento, enquanto em Milwaukee/Wisconsin - EUA o *Cryptosporidium* spp. encontrado na água de gelo infectou 403000 pessoas.

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

A frequência de ocorrência de *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático tem sido verificada em vários países. Amostras de água não tratada e tratada foram avaliadas quanto à ocorrência do *Cryptosporidium* spp. em 66 estações de tratamento de água de 14 Estados e uma Província do Canadá. Quanto à positividade das amostras da água tratada pode-se observar que diante de 85 amostras coletadas de diversos pontos nas 66 estações, 97% foram positivas para o parasito, contendo um número médio de oocistos de 2,7 por litro, porém com uma variação de 0,07 a 484 oocistos por litro. Este resultado revelou um percentual de positividade de 87% do total das estações avaliadas. Na água tratada, diante de 82 amostras analisadas, em 22% foi detectado o *Cryptosporidium* spp. com um número médio de 1,52 oocistos por litro (LeChevallier et al., 1991). Uma ampla variação no número de oocistos nas amostras de água também foi verificada por Ongerth & Stibbs (1987) quando pesquisaram o *Cryptosporidium* spp. nas águas de rio em Washington e na Califórnia, pois o parasito foi encontrado em todas as amostras variando de 02 a 112 oocistos por litro. Em Costa Rica 14 amostras de águas superficiais foram analisadas, sendo sete de água bruta e sete de água tratada sem cloração, e verificou-se que o parasito estava presente em 85,7% das amostras de água não tratada e em 57% das amostras de água tratada (LUNA et al., 2002).

Quanto à pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água no Brasil os estudos são recentes, mas alguns trabalhos já foram realizados no Estado de São Paulo, de forma que o parasito já foi detectado em águas superficiais e profundas. A positividade para a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. nas águas do rio Atibaia em

Campinas/SP juntamente com a alta turbidez das amostras foi justificada pelas intensas chuvas no período (FRANCO et al., 2001). Em águas de poço da cidade de Itaquaquecetuba/SP a presença de oocistos pode ter sido resultante de influências da superfície externa, pois havia possibilidade de infiltrações, pelo grande número de animais nas redondezas, além da possibilidade de contaminação cruzada com águas oriundas de fossas sépticas, as quais também apresentavam o parasito (GAMBA et al., 2000). Na cidade de São Paulo analisando 24 amostras de esgotos, Farias et al. (2002) verificaram que o *Cryptosporidium* spp. estava presente em todas as amostras variando de 80 a 912 oocistos por litro no esgoto doméstico e de 65 a 760 oocistos quando a pesquisa foi feita no córrego.

No que se refere ao tratamento, comparando-se a filtração em que se utiliza o filtro de areia, a filtração dupla ou a filtração mista, LeChevallier et al. (1991) observaram que o número de amostras positivas para os oocistos de *Cryptosporidium* spp. é maior quando se emprega o tratamento com o filtro de areia, e que o problema com a filtração está associado ao tamanho dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., que varia de 3 a 6 μm , de forma que atravessa facilmente as barreiras no processo de filtração, principalmente quando se encontra em grande número na água não tratada. As plantas de filtração com carvão ativado são freqüentemente usadas quando a qualidade da água é muito precária, e LeChevallier et al. (1991) demonstraram que mais de 60% dos efluentes filtrados por esta planta apresentaram oocistos de *Cryptosporidium* spp., superior às plantas de tratamento que usa o filtro de areia, nas quais as amostras positivas dos efluentes filtrados superaram o valor de 36%. Assim verifica-se que pode haver redução do número de oocistos nas águas superficiais com o tratamento pelo processo de filtração, porém há influência quanto ao tipo de tratamento simples, duplo ou misto, e quanto ao tipo de filtro utilizado.

3.3.6 Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e parâmetros de previsibilidade

A comparação entre os parâmetros de qualidade da água com a presença do *Cryptosporidium* spp. é um subsídio para prever a sua ocorrência no ambiente aquático e com isso orientar quanto à performance dos tratamentos empregados e aos procedimentos preventivos. Dentre os fatores envolvidos na mensuração da qualidade da água, a turbidez é um importante parâmetro, pois devido à facilidade de aderência dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. a compostos orgânicos e inorgânicos (MEDEMA et al., 1998) a sua presença tem sido associada ao grau de turbidez da amostra, de forma que quanto maior o grau de turbidez na amostra de água, maior a possibilidade de se encontrar o parasito, tanto na água não tratada como na água tratada. De acordo com a portaria 1469-MS (BRASIL, 2000), para garantir a qualidade microbiológica da água deve-se ter turbidez máxima de 1,0 UNT em 95% das amostras analisadas após o processo de filtração rápida, mas no que se refere à remoção de *Cryptosporidium* spp. é recomendado um valor máximo de 0,5 UNT para o grau de turbidez. No entanto tem-se observado que os oocistos ainda ocorrem quando a turbidez encontra-se com o valor de 0,19 UNT, de forma que a garantia de efetiva segurança seria obtida com a turbidez de 0,1 UNT (LeCHEVALLIER et al., 1991).

Outro parâmetro relevante que tem sido associado com a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. é a determinação dos coliformes. LeChevallier et al. (1991) demonstrou uma correlação positiva entre a ocorrência de coliformes e de *Cryptosporidium* spp., porém este fato não está bem elucidado na literatura, e autores têm demonstrado o contrário (GAMBA et al., 2000; SHEPHERD & JONES, 1996; SILVA, 2002).

Tem-se observado que a pesquisa do parasito em animais marinhos é uma forma indireta de se verificar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de estuários, de forma que a presença do oocisto em ostras tem demonstrado o seu potencial como monitor biológico para a contaminação da água pelo parasito, além de servir como um filtro natural (XIAO et al., 1998). Outras espécies de moluscos bivalves como mexilhões e mariscos tem apresentado positividade e grande acúmulo de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em seu organismo (FREIRE-SANTOS et al., 2000). Recentemente, o parasito foi diagnosticado em peixe-boi marinho (MARCONDES et al., 2002).

3.3.7 Métodos de análises para a detecção de *Cryptosporidium* spp.

Diferentes métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos para a detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, cada qual com suas vantagens e desvantagens, porém ainda não há um método universalmente aceito (SMITH, 1998). Os métodos utilizados para identificação de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água têm sido os mesmos empregados em análises clínicas, mas a maior preocupação com o procedimento de análise é que, previamente ao método de identificação do parasito, é necessário se empregar um método de concentração satisfatório, porque apesar da existência de métodos de identificação sofisticados para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. como a biologia molecular, todos são precedidos de métodos para a concentração dos oocistos na amostra.

Os métodos empregados para a análise de amostras de água subdividem-se em filtração, eluição, concentração com ou sem purificação, e identificação (SMITH, 1998). A filtração pode ser considerada uma etapa para extração do oocisto (Nieminski

et al., 1995) ou para concentração (BARER & WRIGHT, 1990). Segundo Laberge et al. (1996), ao se analisar um grande volume de água torna-se necessário à utilização das etapas de filtração e eluição utilizando membranas (ALDOM & CHAGLA, 1995) ou filtros (KAUCNER & STINEAR, 1998), porém quando se analisa um pequeno volume estas etapas podem ser omitidas partindo direto para a etapa de concentração por centrifugação (ONGERTH & STIBBS, 1987) ou por floculação (VESEY et al., 1993a).

Para a extração do oocisto de *Cryptosporidium* spp. de amostras de água, previamente à concentração por centrifugação das amostras, diferentes métodos tem sido desenvolvidos e dentre eles a filtração em membrana e a floculação com carbonato de cálcio, sendo ainda subestimada a sua eficiência (VESEY et al., 1993). A técnica de filtração em membrana foi originalmente desenvolvida para ser aplicada em água tratada (ALDOM & CHAGLA, 1995), no entanto tem sido particularmente útil para uma rápida determinação do número de oocistos em água não tratada (DAWSON et al., 1993). O método de floculação tem sido empregado por ser simples e econômico e por analisar um pequeno volume de água (VESEY et al., 1993), porém a elevada concentração dos resíduos junto aos oocistos pode afetar a interpretação dos resultados.

Segundo Farias et al. (2002), a compactação das partículas com a filtração em membrana é de difícil desagregação, e oocistos podem ser perdidos quando se utiliza procedimentos de centrifugação com gradientes de densidades para clarificar a amostra, enquanto no método de floculação embora haja formação de partículas maiores, estas são menos compactadas do que as partículas obtidas por filtração, no entanto comentam que outros estudos são necessários para aprimorar o método e determinar sua performance, antes de ser rotineiramente usado.

3.3.8 Métodos de concentração

Em alimentos e em amostras de água tratada ou ambiental os oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem ser encontrados em baixo número, tornando-se importante a seleção dos métodos de concentração da amostra, pois ainda é inexistente a técnica que possibilita um enriquecimento para este organismo semelhante às bactérias alertando para a utilização de métodos altamente sensíveis (LABERGE et al., 1996).

A concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por centrifugação tem sido realizada em amostras água (LeCHEVALLIER et al., 1995; NIEMINSKI et al., 1995) associando etapas de sedimentação com uma etapa de flutuação, sendo a pesquisa do oocisto feita em sua maioria no sedimento obtido de uma centrifugação em que foi usado o volume sobrenadante resultante da etapa anterior de flutuação, que por sua vez é realizada a partir do sedimento concentrado.

É importante salientar que as substâncias utilizadas para concentração de oocistos com densidades entre 1,050 e 1,300, através de gradientes de densidades contínuos ou descontínuos, são empregadas com a finalidade de flutuação e clarificação das amostras (DENG & CLIVER, 1999; DENG & CLIVER, 2000; KUCZYNSKA & SHELTON, 1999; LeCHEVALLIER et al., 1995).

Smith (1998) comenta que as soluções normalmente usadas para flutuação de oocistos são soluções saturadas de sacarose com densidade entre 1,100 e 1,200, porém tem sido empregada a solução Sheather com densidade de 1,200 (Deng & Cliver, 1999), $MgSO_4$ (densidade específica de 1,270), $ZnSO_4$ (densidade específica de 1,300), sacarose (densidade específica de 1,180) e NaCl (densidade específica de 1,210) conforme Kuczynska & Shelton (1999) para gradientes contínuos e a solução Percoll-sacarose com densidade entre 1,050 a 1,100 (Nieminski et al., 1995), Percoll (1,130,

1,090, 1,050 e 1,010), CsCl (1,400, 1,100 e 1,050) de acordo com Kuczynska & Shelton (1999) para gradientes descontínuos.

A centrífugo-flutuação tem a finalidade de separar cistos ou oocistos de protozoários de resíduos na amostra, e quando realizada a amostra deve ser previamente concentrada por sedimentação através de várias lavagens na ausência do líquido flutuante para se obter um sedimento (SMITH, 1998). LeChevallier et al. (1995) comentam que a gravidade específica do gradiente é escolhida para que os microrganismos flutuem em sua superfície e para que os resíduos mais pesados sedimentem.

Nieminski et al. (1995) pesquisando influências na recuperação dos oocistos em amostras de água (água de abastecimento, água pré-tratada por floculação e água filtrada) observaram que os melhores resultados foram provenientes da análise do sedimento obtido previamente à etapa de flutuação, ao pesquisar os oocistos direto da membrana filtrante após a sua eluição e concentração, detectando um valor de recuperação de 78%. Quando a etapa de flutuação foi empregada pelos autores houve redução de mais de 50% do número de oocistos recuperados, e verificaram que quanto menor o número de etapas no procedimento, menor a probabilidade de perdas de oocistos.

Vesey et al. (1993a) realizaram a concentração de oocistos em amostras de água apenas por sedimentação, e objetivando avaliar a eficiência na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. spp. em água desenvolveram um método de floculação por decantação de cristais de carbonato de cálcio (CaCO_3) após a mistura de cloreto de cálcio (CaCl_2), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e hidróxido de sódio (NaOH) em 1l de amostra inoculada com 608 oocistos, a qual foi submetida a um repouso de quatro horas. Os cristais de CaCO_3 sedimentados foram dissolvidos em ácido sulfâmico,

resultando em percentual de recuperação de 73,7%, 75,6 e 76% para água de abastecimento, água de rio e água deionizada, respectivamente.

Lechevallier et al. (1991) relataram que vários fatores interferem na eficiência de recuperação de oocistos em água por processos de concentração por sedimentação ou flutuação, dentre eles a variação da densidade do oocisto, pois oocistos de baixa densidade provavelmente serão menos recuperados por técnicas de sedimentação e os oocistos de maior densidade serão menos eficientemente recuperados por técnica de flutuação.

Segundo Medema et al. (1998) desde que o meio de flutuação tenha densidade entre 1,090 e 1,100 provavelmente resultará em perdas insignificantes porque 95% dos oocistos têm densidade menor que 1,090, sendo a densidade média de 1,045.4 verificada para os oocistos de *Cryptosporidium* spp. spp..

Lima (2001) comparando diversas substâncias (sacarose-densidade de 1,065, NaCl-densidade de 1,155, MgSO₄-densidade de 1,300, ZnSO₄-densidade de 1,200, AlSO₄-densidade de 1,115, NH₄SO₄ 40%-densidade de 1,115 e NH₄SO₄ 80%-densidade de 1,200) para a concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de água e leite verificou que a eficácia de métodos de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. depende da natureza da amostra e da substância para a sua concentração, e observou que nas amostras de água o cloreto de sódio proporcionou uma melhor concentração e recuperação de oocistos, porém com a sedimentação de todos os oocistos.

A densidade do oocisto pode ser alterada devido a sua facilidade de aderência a outras partículas. Medema et al. (1998) comentam que é mais alta a proporção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais aderido às partículas como lodo, areia, plâncton, algas e cristais biológicos.

Nieminski et al. (1995) relatam que a variação na eficiência de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água por centrífugo-flutuação deve-se a presença de algas e cristais químicos. Kuczynska & Shelton (1999) descrevem sobre a aderência dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em sólidos fecais, e comentam que a análise de amostras fecais estocadas pode subestimar os níveis do percentual de recuperação dependendo do grau de oocistos aderidos aos sólidos fecais e que experimentalmente a análise da amostra deve ser realizada logo após a sua inoculação com a suspensão de oocistos previamente purificada.

Segundo Smith & Rose (1990) a interação não-covalente entre a superfície negativamente carregada do oocisto e outras partículas na matriz são reduzidas pela adição de soluções detergentes como Tween 20, tween 80 e Dodecil Sulfato de Sódio que reduzem agregações e mantém os oocistos como organismos individuais. LeChevallier et al. (1995) verificaram que a ausência de soluções detergentes para a concentração por flutuação por Percoll-sacarose das amostras de água de abastecimento não interferiu nos resultados, alcançando 100% de recuperação quando se utilizou Percoll-sacarose com densidade igual a 1,150, e apesar de utilizarem um inóculo sem prévia purificação para contaminação das amostras, este foi preparado com amostra fecal recente e imediatamente anterior às análises. A probabilidade de adesão particularmente depende da característica superficial do oocisto, uma vez que pode ser resultante da sua alteração devido aos procedimentos de purificação e estocagem (MEDEMA et al., 1998).

3.3.9 Métodos de identificação

Para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em água e alimentos, a

metodologia de identificação dos oocistos foi inicialmente sugerida com base nos métodos empregados para análises clínicas. Smith et al. (1989) analisaram amostras de água "in natura", filtrada e tratada utilizando um inóculo contendo 10^3 oocistos de *Cryptosporidium* spp. por mililitro (ml) previamente purificado e armazenado a 4°C por dois meses. As amostras contaminadas foram armazenadas a 4°C por duas semanas para posterior concentração por solução descontínua de sacarose. Para a identificação dos oocistos foram comparados os métodos de coloração histoquímica (Ziehl-Nielsen, auramina-fenol, Giemsa e safranina-azul de metileno) e imunofluorescência direta com anticorpo monoclonal (FITC-Mab). Verificaram que os métodos de Ziehl-Nielsen e FITC-Mab foram os melhores na identificação dos oocistos, proporcionando recuperação de números elevados e semelhantes (86% e 87%, respectivamente), considerando os valores teste da amostra controle entre 71 e 89% de recuperação.

Outras técnicas tem sido descritas para a detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água incluindo o método de Koster modificado (LUNA et al., 2002), a citometria de fluxo (VESEY et al., 1993b) e a reação em cadeia de polimerase - PCR (KAUCNER & STINEAR, 1998).

Kaucner & Stinear (1998) comentam que a vantagem do PCR é devido à rapidez, sensibilidade e especificidade, tornando um método de diagnóstico seguro, uma vez que se baseia na amplificação e subsequente detecção de seqüências específicas do DNA do parasito. Segundo Taylor & Webster (1998) os métodos empregados para a identificação do agente diferem quanto à sensibilidade, sendo o limite de detecção maior que 50 oocistos por litro para o método de imunofluorescência, maior que 100 para o método histoquímico e menor que 100 para o PCR.

3.3.10 Fatores que influenciam na detecção e recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp..

A recuperação experimental de oocistos de *Cryptosporidium* spp. depende da natureza e tipo de amostra, tipo de substâncias de concentração e ainda da metodologia para concentração e identificação do oocisto (VESEY et al., 1993a; NIEMINSKI et al., 1995; LeCHEVALLIER et al., 1995). Isto reflete e ao mesmo tempo esclarece a possibilidade de variação nos dados a serem obtidos e vem auxiliar na seleção adequada do método de análise para a pesquisa do *Cryptosporidium* spp.

Nas amostras de água deve-se considerar a turbidez, principalmente no que se refere ao grau de impureza inorgânica conforme Nieminski et al. (1995) ou orgânica segundo Medema et al. (1998). Nas amostras de alimentos a influência pode ser observada pela composição da amostra (SMITH & ROSE, 1990; DENG & CLIVER, 1999; DENG & CLIVER, 2000). Quanto às amostras fecais deve-se observar se estas são recentes ou conservadas, seja à temperatura ambiente ou sob refrigeração (KUCZYNKA & SHELTON, 1999; SMITH et al., 1989). Estas considerações são justificadas pela facilidade de aderência dos oocistos e por isso a importância de atentar-se para o tempo que os oocistos ficam em contato com as partículas na amostra (LeCHEVALLIER et al., 1995).

Quanto às substâncias de concentração a influência é verificada pela sua densidade e característica físico-química geral, pois, de acordo com a densidade e composição das amostras analisadas, podem influenciar apenas na densidade do meio, mas também provocar aglomeração ou dispersão das partículas resultando na dualidade entre a flutuação ou sedimentação das partículas presentes (KUCZYNKA & SHELTON, 1999; VESEY et al., 1993a).

Kuczynska & Shelton (1999) avaliando substâncias de concentração sugerem que a alta recuperação com o NaCl para flutuação pode ter sido devido à habilidade de cátions monovalentes em dispersar partículas permitindo a separação dos oocistos com os resíduos. Enquanto o baixo número obtido com a solução de flutuação de ZnSO₄ pode ter sido resultante da ação dos cátions divalentes em precipitar as partículas e agregar os oocistos levando a sedimentação de todos presentes. Em relação à solução de sacarose a baixa recuperação observada foi provavelmente devido ao seu baixo peso específico e a alta viscosidade da solução.

Bukhari & Smith (1995) acrescentam que o grau de recuperação de oocistos através de substâncias de concentração depende de sua influência na “viabilidade” dos oocistos, pois avaliando três técnicas de concentração para recuperação de oocistos de *Cryptosporidium parvum* de fezes bovina observaram que a concentração por sedimentação com água-éter não exerceu significativo efeito na “viabilidade” dos oocistos recuperados, porém o gradiente de flutuação com sacarose ou sulfato de zinco seletivamente concentraram oocistos viáveis, de forma que a superfície dos oocistos não viáveis é mais susceptível a adesão aos sólidos fecais, e conseqüentemente sedimentam juntos. No entanto LeChevallier et al. (1995) observaram que após o armazenamento de oocistos em água de rio na temperatura ambiente por 30 dias para o seu envelhecimento, muitos organismos morreram e tornaram-se células vazias favorecendo uma maior eficiência de recuperação comparado aos organismos recentes, sugerindo que oocistos vazios são preferivelmente concentrados por flutuação em gradiente de Percoll-sacarose.

De um modo geral a recuperação ou detecção de oocistos por determinados métodos ou substâncias de concentração através da pesquisa destes oocistos nos sedimentos pode resultar em uma subestimação dos resultados se os oocistos flutuam ou

contrariamente quando a pesquisa é feita apenas no sobrenadante e os oocistos sedimentam (LeCHEVALLIER et al., 1991). Os resultados ainda podem ser dúbios devido à associação de um determinado procedimento de análise com um dos métodos de identificação, quando a especificidade do método depende da integridade do oocisto (VESEY et al., 1993a).

Segundo Ongerth & Stibbs (1987) e LeChevallier et al. (1991) a natureza abrasiva dos métodos pode causar danos ao oocisto e levar a perda de epítomos que são necessários para a sua detecção pelos anticorpos monoclonais ou tendem a compactar outras partículas ao oocisto ou ao seu redor que causam futuros problemas no estágio de detecção.

Segundo Bukhari et al. (1998), o procedimento de concentração provoca um acúmulo de resíduos na amostra de água sendo necessário o procedimento de clarificação para separá-los dos oocistos e permitir a sua detecção, porém o grau de purificação pode ser variável e o material flutuante pode conter, além de oocistos, inúmeras partículas e células de algas que interferem na identificação dos oocistos por imunofluorescência.

Conforme Vesey et al. (1993a), um agregado de partículas pode causar um bloqueio quando se utiliza a citometria de fluxo para o diagnóstico do *Cryptosporidium* spp. salientando-se que é difícil a desagregação dessas partículas compactadas.

3.3.11 Considerações finais

Os estudos com a metodologia para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água vêm sugerindo mecanismos alternativos para a otimização dos métodos, e isto é imprescindível uma vez que a legislação atual, referente às normas de

qualidade da água para consumo humano, recomenda o padrão de ausência para o *Cryptosporidium* spp., de forma que há a necessidade de uma técnica com limite de detecção de 1 oocisto por litro. A técnica biomolecular tem sido avaliada e o seu desempenho na identificação de espécies de *Cryptosporidium* spp. e na diferenciação entre os genótipos do *C. parvum* pode auxiliar na investigação dos casos clínicos da criptosporidiose, enquanto a performance dessa técnica na análise de amostras ambientais, lentamente demonstrada, poderá ser útil no monitoramento da ocorrência do *Cryptosporidium* spp. em baixo número.

3.3.12 Referências Bibliográficas

ALDOM, J.E.; CHAGLA, A.H. Recovery of *Cryptosporidium* spp. oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 186-187, 1995.

ARCAY, L.; DEBORGES, E.B.; BRUZUAL. Criptosporidiosis experimental en la escala de vertebrados, I. Infecciones experimentales, II. Estudio histopatológico. **Parasilogia al día**, v.19, n. 20-29, 1995.

ARCOVERDE, C.A.C. Enteroparasitoses em pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE. **Dissertação**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, 2001. 82 p.

BARER, M.R.; WRIGHT, A.E. *Cryptosporidium* spp. and water: a review. **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, p. 271-277, 1990.

BRASIL. Portaria nº 1469 de 29 de Dezembro de 2000. **Regulamenta os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.** Brasília, DF: MS/ ANVISA, 2000.

BUKHARI, Z.; SMITH, H.V. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n.10, p. 2592-2595, 1995.

BUKHARI, Z.; McCUIN, R.M.; FRICKER, C.R.; CLANCY, J.L. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4495-4499, 1998.

CRAWFORD, F.G.; VERMUND, S.H. Human Cryptosporidiosis. **Critical Review of Microbiology**, v. 16, p. 113-159, 1988.

Centro de Referência e Treinamento – **Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS** (CRT-DST/AIDS), 1997.

CETESB. **Microbiologia Ambiental** (Norma Técnica L5.), São Paulo, 2000.

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

DENG, M.Q.; CLIVER, D.O. *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 113-121, 1999.

DENG, M.Q.; CLIVER, D.O. Comparative detection of *Cryptosporidium parvum* from apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 155-162, 2000.

FARIAS, E.W.C.; GAMBA, R.C.; PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 41-43, 2002.

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO-NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 109-111, 2001.

FREIRE-SANTOS, F.; LOPEZ, A.M.O.; CASTIBLANCO, C.A.V.; MAZÁS, E.A.; Suárez, E.A.; MARTIN, O.G. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve mollusks destined for human consumption. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 4, p. 853-854, 2000.

GAMBA, R.C.; CIAPINA, E.M.; ESPINDOLA, R.S.; PACHECO, A.; PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* spp. sp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 151–153, 2000.

GIBBONS, C.L.; et al. Correlation between markers of strain variation in *Cryptosporidium parvum*: evidence of clonaty. **International Parasitology**, v. 47, 139-147, 1998.

HACHICH, E.M.; GALVANI, A.T.; PADULA, J.A.; SANTOS, A.I.P.; MENEGON, N.; SATO, M.I.Z. Detecção de oocistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais captadas para consumo humano. **Anais. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Salvador/BA, p. 17, 1999.

KATSUMATA, T.; HOSEA, D.; RANUH, I.G.; UGA, S.; YANAGI, T.; KOHNO, S. Short report: *Cryptosporidium* spp. *muris* infection in human. **The American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 62, n. 1, p. 70-72, 2000.

KAUCNER, C.; STINEAR, T. Sensitive and rapid detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large – volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription – PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1743-1749, 1998.

KOCH, K.L.; PHILLIPS, D.J.; ABER, R.C.; CURRENT, W.L. Cryptosporidiosis in hospital personnel: evidence for person-to-person transmission. **Annals Internal Medicine**, v. 102, p. 593-596, 1985.

KORICH, D.G.; MEAD, J.R.; MADORE, M.S.; SINCLAIR, N.A.; STERLING, C.R. Effect of ozone, chlorine dioxide, chlorine and monochloroamine on *Cryptosporidium*

spp. oocysts viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1423-1428, 1990.

KUCZYNSKA, E.; SHELTON, D.R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2820-2826, 1999.

LABERGE, I.; GRIFFITHS, M.W.; GRIFFITHS, M.W. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 1-26, 1996.

LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; LEE, R.G. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 2610-2616, 1991.

LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; SIEGEL, J.E.; ABBASZADEGAN, M. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 690-697, 1995.

LEVINE, N.D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* spp. (Protozoa, Apicomplexa). **Journal of Protozoology**, v. 31, p. 94-98, 1984.

LEVINE, N.D. Taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species. **Journal of Parasitology**, v. 72, p. 372-382, 1986.

LIMA, E.C. Métodos de detecção e enumeração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água e leite. **Dissertação**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2001, 62 p.

LIMA, E.C.; STAMFORD, T.M.L.; ALVES, L.C.; MOTA, R.A.; GLÓRIA FAUSTINO, M.A.; SHINOHARA, N.K.S. Importância da criptosporidiose para a saúde pública. **Revista Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 4, n. 1, p. 229-239, 2001.

LUNA, S.; LILIANA-REYES, L.; Chinchilla, M.; Catarinella, G. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. spp en aguas superficiales en Costa Rica. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 57, p. 63-65, 2002.

MARCONDES, M.C.C.; BRITO, F.L.; BORGES, J.C.G.; Lima, E.C.; Alves, L.C.; LIMA, R.P. *Cryptosporidium* spp. sp. in Antillian Manatees (*Trichechus manatus manatus*) in natural captivity, Paraíba State, Brazil. **Annals**. Florida Marine Mammal Health Conference, Gainesville, Florida, 2002.

MEDEMA, G.J.; SCHETS, F.M.; TEUNIS, P.F.M.; HAVELAAR, H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4460-4466, 1998.

MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. PCR detection of *Cryptosporidium*, the way forward? **Parasitology Today**, v. 14, p. 241-245, 1998.

NIEMINSKI, E.C.; SCHAEFER, F.W.I.I.I.; ONGERTH, J.E. Comparison of two methods of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1714-1719, 1995.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* spp. and criptosporidiosis in man and animals. **International Journal of Parasitology**, v. 25, p. 139-195, 1995.

ONGERTH, J.E.; STIBBS, H.H. Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in river water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 672-676, 1987.

ORTEGA, Y.R.; ROXAS, C.R.; GILMAN, R.H.; MILLER, N.J.; CABRERA, L.; TAQUIRI, C.; STERLING, C.R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. **The American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 57, n. 6, p. 683-686, 1997.

ROBERTSON, L.J.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, H.V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3494-3500, 1992.

SHEPHERD, K.M.; WIN-JONES, A.P. An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts from water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1317-1322, 1996.

SILVA, C.G.M. Pesquisa de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na cidade de Recife/PE. **Dissertação**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, 2002, 50p.

SMITH, H.V.; McDIARMID, A.; SMITH, A.L.; HINSON, A.R.; GILMOUR, R.A. An analysis of staining methods for the detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in water-related samples. **Parasitology**, v. 99, p. 323-327, 1989.

SMITH, J.L. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* as Agents of Foodborne Disease. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 5, p. 451-461, 1993.

SMITH, H.V. Detection of parasites in the environmental. **Parasitology**, v. 117: p.S113-141, 1998.

SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Waterborne Cryptosporidiosis, **Parasitology Today**, v. 6, p. 8-12, 1990.

TAYLOR, M.A.; WEBSTER, K.A.X. Recent advances in the diagnosis in livestock of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Giardia* and other protozoa of veterinary importance. **Research in Veterinarian Science**, v. 65, p. 183-193, 1990.

TZIPORI, S.; ANGUS, K.W.; CAMPBELL, I., GRAY, E.W. *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus. **Infectology and Immunity**, v. 30, p. 884-886, 1980.

TZIPORI, S.; GRIFFITHS, J.K. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. **Advances Parasitology**, v. 40, p. 5-36, 1998.

UPTON, S.J.; CURRENT, W.L. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. **Journal of Parasitology**, v. 71, p. 625-629, 1985.

VESEY, G.; SLADE, J.S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; FRICKER, C.R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts from water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 82-86, 1993a.

VESEY, G.; SLADE, J.S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; DENNIS, P.J.; FRICKER, C.R. Routine monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in water using flow cytometry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 87-90, 1993b.

WIDMER, G.; TCHACK, L.; SPANO, F.; TZIPORI, S. A study of *Cryptosporidium parvum* genotypes and population structure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 5, p. 685-686, 1998.

XIAO, L.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; LAL, A.A. Species and strain- specific typing of *Cryptosporidium* spp. parasites in clinical and environmental samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 5, p. 687-692, 1998.

XIAO, L.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.M.; ARROWOOD, M.J.; LAL, A.A. Differentiation of *Cryptosporidium* spp. species, strains and isolates. **Society of Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 3, p. 181, 1999.

3.4 MÉTODOS PADRÕES E ALTERNATIVOS PARA PESQUISA DE *Cryptosporidium* spp. NO AMBIENTE AQUÁTICO

De acordo com a técnica utilizada para a filtração, eluição, concentração, purificação e identificação de oocistos vários métodos foram propostos, desenvolvidos e testados para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água. Estes métodos, segundo Quintero-Betancourt et al. (2002), podem ser agrupados em métodos padrões ou alternativos.

Dentre os métodos padrões, na década de 1990 a Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM) propôs um método para detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água de baixa turbidez baseados na utilização de filtros tipo cartucho, Percoll-sacarose para separação seletiva de oocistos dos resíduos, e a imunofluorescência para identificação e enumeração de oocistos (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002). Porém a partir do método ASTM diferentes índices de eficiência foram encontrados por LeChevallier et al. (1991a), que obtiveram em média uma recuperação de oocistos de 25,3%, e por Smith & Hayes (1997) de 3 a 29%. Contudo, em virtude do custo e o tempo requerido da análise, Quintero-Betancourt et al. (2002) comentam sobre a necessidade de mudanças na metodologia para a pesquisa do parasito.

Durante os anos 90, a USEPA aprovou o método conhecido como Regras de Coleta de Informações (ICR) para detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água para o seu monitoramento de forma regulamentar, através do uso de anticorpos fluorescentes (USEPA, 1996). Dufour et al. (1999) relataram que o método ICR geralmente subestima a ocorrência e a quantidade de *Cryptosporidium* spp. e possui elevado custo, além de sua complexidade e difícil realização, gerando variações dos resultados. As limitações da utilização do método

ICR incluem baixa recuperação (menor 3% para oocistos de *Cryptosporidium* spp.), ligação anticorpo não-específica, interferência de resíduos, e incapacidade para determinar viabilidade/infectividade, e recuperação de oocistos isolados (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002).

Na tentativa de identificar novas e inovadoras tecnologias para monitoramento de protozoários e análises, a USEPA desenvolveu o método 1622 para detecção de *Cryptosporidium* spp. a partir de 1996. Este método de detecção foi validado através de estudo interlaboratorial em agosto de 1998, e foi revisado, aprovado e validado em janeiro de 1999. Em abril de 1999, um método foi validado para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., sendo reconhecido por método 1623, e assim como o 1622 para a detecção de oocistos, emprega modificações para a detecção de *Cryptosporidium* spp. por imunofluorescência a partir do uso adicional do corante fluorescente não específico 4'6'-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI), de forma que em abril de 2001 ambos os métodos foram revisados (USEPA, 2001a, 2001b). Segundo Grimason et al. (1994), a combinação do DAPI com imunofluorescência se constitui em um método confirmatório de forma a detectar oocistos esporulados nas amostras de água e minimizar a necessidade de microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) ou contraste de fase ótica.

Assim os métodos oficiais existentes incluem o método 1623 nos EUA e o protocolo de operação padrão (SOP) de 1999 no Reino Unido. Em contraste a estes métodos, que usam o procedimento de separação imunomagnética (IMS) e anticorpos anti-*Cryptosporidium* spp. para capturar organismos alvo da amostra, no método ICR se usa a técnica de flutuação, baseada na gravidade específica dos oocistos. De acordo com o método usado, os percentuais de recuperação variam de 1 a 100% (ICR), de 12 – 93% (1622 e 1623) e de 30 – 50% (SOP) (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002).

A ineficiência na recuperação de oocistos pela técnica de flutuação para a purificação dos oocistos nas amostras levou ao desenvolvimento da técnica de separação imunomagnética, em que um forte campo magnético é aplicado para separar seletivamente os oocistos capturados na amostra concentrada, e desta forma a probabilidade de se ter problemas na identificação é reduzida desde que menos partículas são transferidas para a lâmina (CAREY et al., 2004). McCuin et al. (2001) relataram uma alta eficiência na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e demonstraram que a técnica IMS pode favorecer a detecção de um baixo número de oocistos nas amostras ambientais.

Técnicas alternativas usadas para concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. do ambiente aquático também resultam em diferentes percentuais de recuperação do parasito, podendo ser mediante uso de membrana de filtração (ONGERTH & STIBBS, 1987) com 5 – 25%; o método de floculação com carbonato de cálcio (VESEY et al., 1993) com 69%; método de dissolução da membrana (ALDOM & CHAGLA, 1995; MCCUIN et al., 2001) com 50%; sistema de filtro de espuma comprimida (SARTORY et al., 1998; RSHTON et al., 2000) com 19 – 73%; centrifugação com fluxo contínuo (SWALLES & WRIGHT, 2000) com 13 – 15% e pelo fluxo continuo de tamanho seletivo (ODA et al., 2000) com 0 – 85%.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE NA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. spp.

Na pesquisa ou diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. vários métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para a detecção dos oocistos com o objetivo de enfrentar as dificuldades obtidas pelos métodos convencionais (JOHNSON et al., 1995; ROCHELLE et al., 1997; SMITH, 1998; SOUZA et al., 2003). A reação em cadeia de

polimerase (PCR) vem se destacando por ser uma técnica bastante segura, uma vez que detecta seqüências específicas de DNA do parasito (JOHNSON et al. 1995, LABERGE et al., 1996b; KAUCNER & STINEAR, 1998; MONIS & SAINT, 2000; FENG et al., 2001).

Dentre as vantagens da PCR para a detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras clínicas e ambientais, pode-se citar a prevista sensibilidade da técnica, já que algumas publicações têm mostrado a detecção de menos que 10 oocistos por análise (LENG et al., 1995; MORGAM & THOMPSON, 1998), a habilidade para se analisar um grande numero de amostras de uma vez, a especificidade além da rápida interpretação (WIDMER et al., 2002). Fontaine & Guillot (2002) comentam ainda que métodos de detecção microscópica, a exemplo da análise de imunofluorescência, são limitados devido à dificuldade na detecção de oocistos e por não serem específicos para espécies patógenas de humanos.

Sobre a especificidade da PCR, esta técnica amplifica um segmento específico do DNA de *Cryptosporidium* spp. garantindo a detecção exclusiva desse protozoário como a exemplo do uso de iniciadores (primers) de seqüências que amplificam o gene COWP, o qual codifica uma proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium parvum*, e o gene 18S ribossomal de *Cryptosporidium* spp., além de ser capaz de diferenciar todos os genótipos de *Cryptosporidium* spp. (SPANNO et al., 1997; XIAO et al., 1999; KATO et al., 2002; FOUNTAIN & GUILLOT, 2003).

A utilização de métodos adequados para a extração do DNA dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. presentes em amostras e a amplificação deste através de PCR tem apresentado resultados significativos na sua genotipagem. O estudo dos genótipos de isolados de *Cryptosporidium* spp. contribui para a elucidação da epidemiologia da criptosporidiose (HADJUSEK et al., 2004).

Porém em muitos casos, as vantagens da PCR normalmente estão acompanhadas de certas restrições, principalmente em relação à presença de inibidores da reação ou devido à dificuldade de extração de seu DNA de *Cryptosporidium* spp. (SLUTER et al., 1997; SCHEU et al., 1998). Desta forma o desempenho da metodologia pode ser influenciado pela origem da amostra, variação individual entre amostras fecais e conservação das amostras (JOHNSON et al., 1995; LENG et al., 1995; DA SILVA et al., 1999; PATEL et al., 1999; BIALEK et al., 2002).

No que se refere às particularidades de *Cryptosporidium* spp. spp., comentam-se sobre a dificuldade na extração do DNA devido principalmente à resistência da parede do oocisto à ruptura mecânica, dificultando a liberação do seu conteúdo interno (HARRIS & PETRY, 1999; REDUKER et al., 1985).

Inúmeros trabalhos vêm sendo realizados com o intuito de melhorar a eficiência da técnica de PCR, tentando remover ou reduzir a presença de inibidores de reação, aperfeiçoar os protocolos de extração e de amplificação (incluindo a avaliação de novos primers), prevenir ou digerir contaminantes, dentre outros (JOHNSON et al., 1995; GOBET et al., 1997; SINGH, 1997; ZHU et al., 1998, WIDMER et al., 1999; WU et al., 1999; BLEARS et al., 2000; HIGGINS, 2001).

Quanto às técnicas de amplificação, além da PCR simples, a PCR multiplex e a nested-PCR vêm demonstrando resultados bastante satisfatórios nas pesquisas de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (MAYER & PALMER, 1996; ROCHELE et al., 1997, MONIS & SAINT, 2000). Na PCR multiplex se utiliza mais de um par de primer na detecção simultânea de organismos diferentes em uma amostra com apenas uma única reação de PCR (ROCHELE et al., 1997; PATEL et al., 1999; ORLANDI & LAMPEL, 2000). A nested-PCR, que envolve um segundo processo de amplificação usando primers homólogos a seqüências internas de um segmento já amplificado, tem

sido aplicada para aumentar a especificidade e sensibilidade (BALATBAT et al., 1996; MAYER & PALMER, 1996). Este procedimento é especialmente útil quando se precisa detectar um pequeno número do organismo alvo numa microflora diversa como amostras fecais e ambientais (KOSTRZYNSKA et al., 1999; AMAR et al., 2004), embora não seja recomendada para uso em diagnóstico laboratorial devido ao grande risco de contaminação dos produtos da PCR (PERSING, 1993).

No Brasil, embora os estudos sobre *Cryptosporidium* spp. venham aumentando, Almeida (2004) comenta que até o momento, poucos são aqueles que avaliaram a técnica de PCR, ressaltando ainda que nestes estudos o processamento das amostras de fezes só foi possível com a importação de *kits específicos* para a extração e purificação de DNA, sendo inviável o seu uso na rotina. A falta de estudos anteriores de padronização da técnica de PCR adequadas às condições laboratoriais no Brasil tornou esse trabalho pioneiro no assunto de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. sem a utilização de kits importados, apresentando resultados satisfatórios.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDOM, J.E.; CHAGLA, A.H. Recovery of *Cryptosporidium* spp. oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 186-187, 1995.

ALMEIDA, T. T. C. Padronização e avaliação de métodos moleculares para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase). **Tese** (Doutorado em Saúde Pública – área de Prática em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública, USP, São Paulo, 2004.

AMAR, C.F.; DEAR P.H.; McLAUCHLIN J. Detection and identification by real time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from human faeces. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 217-222, 2004.

AMBIENTE BRASIL. 2005. **A vida depende da água**. Disponível em <<http://www.ambientebrasil.com.br>> Acesso em: 22 dez. 2005.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th. Ed. Baltimore, Maryland, USA, APHA, AWWA, WEF, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th. Ed. Baltimore, Maryland, USA, APHA, AWWA, WEF, 1998.

ARCOVERDE, C.A.C. Enteroparasitoses em pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE. **Dissertação**, UFPE, Recife/PE, 2001.

BALATBAT, A. B.; JORDAN, G.W.; TANG, Y.J.; SILVA Jr., J. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human faeces by nested PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1769-1772, 1996.

BIALEK, R.; BINDER, N.; DIETZ K.; JOACHIM, A.; KNOBLOCH, J.; ZELCK, E.U.; Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, v. 43, p. 283-288, 2002.

BLEARS, M.J.; POKORNY, J.; CARRENO, R.A.; CHEN, S.; DE GRANDIS, A.S.; LEE, H.; TREVORS, J.T. DNA fingerprint of *Cryptosporidium parvum* isolates using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 4, p. 838-841, 2000.

BRASIL. Portaria nº 518 de 25 de Março de 2004. **Regulamenta os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências**. Brasília, DF: MS/ ANVISA, 2004.

CANEDO, Paulo, 2005. **Brasil da água doce e da água salgada: desafios e potencialidades**. Disponível em <http://semanact2005.mct.gov.br/index.php?action=/content/view&cod_objeto=48> Acesso em: 19 out. 2005.

CARDOSO, L.S.; DE CARLI, G.A.; LUCA, S.J. *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em efluentes biologicamente tratados e desinfetados. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 8, n. 4, p. 285-290, 2003.

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

Centro de Referência e Treinamento – **Doenças Sexualmente Transmitidas / AIDS** (CRT – DST/AIDS), 1997.

CETESB, São Paulo. **Microbiologia Ambiental** (Norma Técnica L5.), 2000.

CETESB. **Águas: rios e reservatórios**, 2005a. Disponível em <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/rios/informacoes.asp>> Acesso em: 22 dez. 2005.

CETESB. Padrões e parâmetros de qualidade, 2005b. Disponível em <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/rios/padroles.asp>> Acesso em: 22 dez. 2005.

DONNELLY, JK, STENTFORD, EI. The *cryptosporidium* problem in water and food supplies. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 30, p. 111-120, 1997.

DUFOUR, A.P.; FEIGE, M.; LINQUIST, A.H.D.; MESSENER, M.; REGLI, S.; RODGERS, C.; SCHAEFER, F.W.; SCHAUB, S.; SINCLAIR, J.; WYMER, L.J. Criteria for Evaluation of Proposed Protozoan Detection Methods. EPA 815-K-99-02. **United States Environmental Protection Agency**, Office of Research and Development, Cincinnati, 1999, 45268 p.

FARIAS, E.W.C.; GAMBA, R.C.; PELLIZRI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n.1, São Paulo. 2002.

FAYER, R. *Cryptosporidium* spp.: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp.: transmission, detection and identification. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12 – 13, p. 1305-1322, 2000.

FAYER, R.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 2004.

FENG, X.; RICH, S.M.; TZIPORI, S.; WIDMER, GIOVANNI. Experimental evidence for genetic recombination in the opportunistic pathogen *Cryptosporidium parvum*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 119, p. 55-62, 2001.

FERREIRA, G.M.; BEVILACQUA, P.D.; BASTOS, R.K.X.; OLIVEIRA, A.A.; DIAS, F.M. Dinâmica de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em manancial de abastecimento de água para consumo humano, Viçosa – Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Epidemiologia, 6., 2004, Recife. **Anais...** Recife: ABRASCO, 2004. 1 CD – ROM.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de saneamento básico, 2002. Disponível em <www.gov.br/home/presidencia/noticias/27032002psnb.shtm> Acesso em: 29 mar. 2006.

FONTAINE, M.; GUILLOT, E. Na immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 1778, p.1-8, 2002.

FONTAINE, M.; GUILLOT, E. Study of 18SrRNA and rDNA stability by real-time RT-PCR in heart-inactivated *Cryptosporidium parvum* oocysts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, p 237-243, 2003.

FRANCO, R.M.B.; CANTUSIO-NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 205-207, 2002.

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT,R.; CANUSIO-NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts in raw water from Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 109-111, 2001.

GAMBA, R.C.; CIAPINA, E.M.; ESPÍNDOLA, R.S.; PACHECO, A.; PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* sp.oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, S. Paulo-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 151–153, 2000.

GELLIN, BJ, SOAVE, R. Coccidian Infections in AIDS. Toxoplasmosis, cryptosporidiosis and isosporiasis. **Medical Clinical North American**, v. 76, p. 205-234, 1992.

GOBET, P.; BUISSON, J.C.; VAGNER, O.; NACIRI, M.; GRAPPIN COMPAROT, S.; HARLY, G.; AUBERT, D.; VARGA, I.; CAMERLYNEK BONNIN, A. Detection of *Cryptosporidium* spp. *parvum* DNA in formed human faeces by a sensitive PCR-based assay including uracil-N-glycosylase inactivation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 254-256, 1997.

GRIMASON, AM, SMITH, HV, SMITH, PG, JACKSON, ME, GIRDWOOD, RWA. Waterborne cryptosporidiosis and environmental health. **Environmental Health**, p. 228-233, sept. 1990.

GRIMASON, A.M.; SMITH, H.V.; PARKER, J.F.W.; BUKHARI, Z.; CAMPBELL, A.; ROBERTSON, L.J. Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced

identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples. **Water Research**, v. 28, p. 733-736, 1994.

HAJDUSEK, O.; DITRICH, O.; JAN SLAPETA. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 183-192, 2004.

HARICH, E.M.; GALVANI, A.T.; PADULA, J.A.; SANTOS, A.I.P., MENEGON, N.; SATO, M.I.Z. Detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais captadas para consumo humano. **Anais**. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador/BA, p. 17, 1999.

HARRIS, J. R., PETRY F. *Cryptosporidium* spp. *parvum*: structural components of the oocyst wall. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5., p. 839-849, 1999.

HARWOOD, V.J. Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens. **Water Environmental Research**, v. 73, n. 5, 2001.

HIGGINS, J.A.; JENKINS, M.C.; SHELTON, D.R.; FAYER, R.; KARNES J.S. Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for use in PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5321-5324, 2001.

JOHNSON, D.W.; PIENIAZEK, N.J.; GRIFFIN, D.W.; MISENER, L.; ROSE, J.B. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts

in water samples, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 3849-3855, 1995.

KATO, S.; LINDEGARD, G.; MOHAMMED, H. O. Utility of the *Cryptosporidium* spp. oocyst wall protein (COWP) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 153-159, 2002.

KAUCNER, C.; STINEAR, T. 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1743-1749, 1998.

KOSTRZYNSKA, M.; SANKEY, M.; HAACK, E.; POWER, C.; ALDOM, J.E.; CHAGLA, A.H.; UNGER, S.; PALMATEER, G.; LEE, H.; TREVORS, J.T.; DE GRANDIS, S.A. Three sample preparation protocols for polymerase chain reaction based detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples. **Journal of Microbiology**, v. 35, p. 65-71. 1998.

LABERGE, I, GRIFFITHS, MW, GRIFFITHS, MW. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 1-26, 1996a.

LABERGE, I.; IBRAHIM, A.; BARTA, J.R.; GRIFFITHS, M.W. Detection of *Cryptosporidium parvum* in raw milk by PCR and oligonucleotídeos probe hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3259-3264., 1996b.

LALLO, MA. Criptosporidiose canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo/SP, v. 1, n. 2, p. 20-22, 1996.

LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D. *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in raw and finished drinking water. **Journal American Water Works Association**, v. 87, p. 54-68, 1995.

LeCHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; LEE, R.G. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 2610-2616, 1991.

LENG, X.; MOSIER, D.A.; OBERST, R.D. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* spp. DNA from bovine feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 643-647, 1995.

LEVINE, N.D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* spp. (Protozoa, Apicomplexa). **Journal of Protozoology**, v. 31, p. 94-98, 1984.

LIMA, EC. Métodos de detecção e enumeração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água e leite, **Dissertação** (Mestrado em Nutrição – área Ciência dos Alimentos). UFPE / Recife-PE, 2001, 62p.

LIMA, E.C.; STAMFORD, T.M.L.; ALVES, L.C.; MOTA, R.A.; GLÓRIA FAUSTINO, M.A.; SHINOHARA, N.K.S. Importância da criptosporidiose para a saúde pública. **Revista Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 4, n. 1, p. 229-239, 2001.

LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; MILLAR, B.C.; McCORRY, K.A.J.; XU, J.; ROONEY, P.J.; DOOLEY, J.S.G. Occurrence and molecular genotyping of *Cryptosporidium* spp. in surface water in Northern Ireland. **Journal of Applied microbiology**, v. 91, p. 774-779, 2001.

MAYER, C. L.; PALMER, C.J. Evaluation of PCR, and Fluorescent Antibodies for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. Species in Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2081-2085, 1996.

McCUIN, R.M.; BUKHARI, Z.; SOBRINHO, J.; CLANCY, J.L. Recovery of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 45, p. 69-76, 2001.

MEDEIROS, M.J. **Águas do Brasil, pelo Serviço Geológico, Rio de Janeiro: CPRM**, 2004. Disponível em: <<http://www.cprm.gov.br/asscom.htm>> Acesso em: 19 out. 2005.

MONIS, P.T.; SAINT C. P. Development of a nested-PCR assay for the detection of *Cryptosporidium parvum* in finished water. **Water Research**, v. 35, n. 7, p. 1641-1648, 2000.

MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. PCR detection of *Cryptosporidium* spp.: the way forward? **Parasitology Today**, v. 4, n. 6, p. 241-245, 1998.

MORGAN, U.M. Detection and characterization of parasites causing emerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1407-1421, 2000.

MORGAN, U.M.; WEBER, R.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; THOMPSON, R.C.A.; NDIRITU, W. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individual living in Switzerland, Kenya, and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1180-1183, 2000.

MULLER, A.P.B. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo. **Dissertação** (Mestrado em Ciências – área de Microbiologia). USP: São Paulo, 1999, 107p.

NIME, FA, BUREK, JD, PAGE, DL, HOLSCHER, MA, YARDLEY, JH. Acute enterocolitis in a human being infected with protozoan *Cryptosporidium* spp.. **Gastroenterology**, v. 70, p.592-598, 1976.

ODA, T.; SAKAGAMI, M.; ITO, H.; YANO, H.; RAI, S.K.; KAWABATA, M.; UGA, S. Size selective continuous flow filtration method for detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia*. **Water Research**, v. 18, p. 447-4481, 2000.

ONGERTH, J.E.; STIBBS, H.H. Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in river water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 672-676, 1987.

ORLANDI, P.A.; LAMPEL, K.A. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2271-2277, 2000.

PATEL, S.; PEDRAZA DIAS, S.; MCLAUCHLIN J. The identification of *Cryptosporidium* spp. species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* spp. outer wall protein (COWP) gene. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1241-1247. 1999.

PERSING D.H. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. **American Society for Microbiology**, p. 51-87, 1993.

QUINTERO-BETANCOURT, W.; PEELE, E.R.; ROSE, J.B. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayentanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. **Journal of Microbiological Methods**, v. 49, p. 209-224, 2002.

REDUKER, D. W.; SPEER, C.A.; BLIXT, J.A.. Ultrastructural change in the oocyst wall during excystation of *Cryptosporidium* spp. *parvum* (Apicomplexa; Eucoccidiorida). **Canadian Journal of Zoology**, v. 63, p. 1892-1896, 1985.

ROCHELLE, P.A.; DE LEON, R.; STEWART, M.H.; WOLFE, R. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.106-114, 1997.

RUSHTON, P.; PLACE, B.M.; LIGHTFOOT, N.F. An evaluation of a laser scanning device for the detection of *Cryptosporidium parvum* in treated water samples. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 303-307, 2000.

SARTORY, D.P.; PARTON, A.; PARTON, A.C.; ROBERTS, J.; BERGMAN, K. Recovery of *Cryptosporidium* spp. oocysts from small and large volume water sample using a compressed foam filter system. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 318-322, 1998.

SALVIN, D. *Cryptosporidium* spp. *meleagridis* (sp. Nov.). **Journal of Pathology**, v. 65, p. 262-266, 1955.

SBPC/Brasil. Águas: abundância e escassez, 2000. Disponível em <<http://www.comciencia.br/reportagens/aguas/aguas02.htm>> Acesso em: 19 out. 2005.

SCORZA, A.V.; BREWER, M.M.; LAPPIN, M.R. Polymerase chain reaction for detection of *Cryptosporidium* spp. In cat faeces. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, 423-426, 2003.

SCHEU, P.M.; BERGHOF, K.; STAHL, U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v.15, p. 13-31, 1998.

SINGH B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 27, n. 10, p.1135, 1997.

SLUTER, S.D.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Parameters affecting polymerase chain reaction detection of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p. 325-330, 1997.

SMITH, J.L. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* as Agents of Foodborne Disease. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 5, p. 451-461, 1993.

SMITH, H.V. Detection of parasites in the environmental. **Parasitology**, v. 117, p. S 113-141, 1998.

SMITH, H.V.; HAYES, C.R. The status of UK methods for the detection of detection of *Cryptosporidium* spp. spp oocysts and *Giardia* spp cysts in water concentrates. **Water Science Technology**, v. 35, p. 369-376, 1997.

SOLO-GABRIELE, H.; NEUMEISTER, S. US outbreaks of cryptosporidiosis. **Journal American Water Works Association**, v. 88, n. 76-86, 1996.

SOUZA, D.S.M. Comparison between immunomagnetic separation, coupled immunofluorescence, and the techniques of Faust et al. and of diagnosis of *Giardia lamblia* cysts in human Feces. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 339-342, 2003.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; Mc LAUHLIN et al. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* spp. oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C.*

wrairi and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, p. 209-217, 1997.

SWALES, C.; WRIGHT, S. Evaluation of a continuous flow centrifuge for recovery of *Cryptosporidium* spp. oocysts from large volume water samples. **Water Research**, v. 34, p. 1962-1966, 2000.

UNIAGUA. Doenças: Principais doenças relacionadas com a água, 2005. Disponível em <<http://www.uniagua.org.br/website/default.asp>> Acesso em: 22 dez. 2005.

UNITED STATES/ ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Method 1622; *Cryptosporidium* spp. in water by filtration/ IMS/ FA**. Office of Water. EPA-821-R-99-061. 2001, 51p.

_____. **Method 1623; *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* in water by filtration/ IMS/ FA**. Office of Water. EPA-821-R-99-006. 2001, 51p.

_____. National primary drinking regulation: monitoring requirements for public drinking water suppliers: *Cryptosporidium* spp., *Giardia*, viruses, disinfection byproducts, water treatment plant data and other information requirements. **Federal Register**, v. 61, p. 24354-24388, 1996.

VESEY, G.; SLADE, J.S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; DENNIS, P.; FRICKER, C.R. Routine monitoring of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water using flow cytometry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 87-90, 1993.

WARD, P. I.; DEPLAZES, P.; REGLI, W.; RINDER, H.; MATHIS, A. Detection on eight *Cryptosporidium* spp. DNA from frozen feces for PCR. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, v. 41, p. 37-42, 2002.

WIDMER, G.; ORBACZ, E.A.; TZIPORI, S. β -tubullin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocysts viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p.1584-1588. 1999.

WIDMER, G.; LIN, L.; KAPUR, V.; FENG, X.; ABRAHAMSEN, M.S. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum* : the key to understanding cryptosporidiosis. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1081-1090, 2002.

TYZER, E E. 1907. A esporozoan found in the peptic glands of the common mouse. In: ESTEBAN, E. and ANDERSON, B.S. *Cryptosporidium* spp. *muris*: Prevalence, Persistency and Detrimental Effect on Milk Product in a Drylot Dairy. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1068-1072, 1907.

TYZER, EE. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. In: ESTEBAN, E. And ANDERSON, B.S. *Cryptosporidium* spp. *muris*: Prevalence, Persistency and Detrimental Effect on Milk Product in a Drylot Dairy. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1068-1072, 1912.

ZHU, G.; MARCHEWKA, ENNIS J.G.; KEITTHLY, J.S. Direct isolation of DNA from patients stools for Polymerase Chain Reaction detection of *Cryptosporidium parvum*. **Journal Infecty Disease**, v. 177, p. 1443-1447, 1998.

5 TRABALHOS CIENTÍFICOS

5.1 TRABALHO CIENTÍFICO I: EFEITO DA ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS NA RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. EM AMOSTRAS FECAIS UTILIZANDO A TÉCNICA DE FLUTUAÇÃO COM CLORETO DE SÓDIO SATURADO²

5.1.1 Resumo

A criptosporidiose é uma parasitose emergente de grande interesse para a saúde pública. Métodos para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais e ambientais têm sido mundialmente avaliados. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da eliminação de resíduos através da técnica de centrífugo-flutuação com solução saturada de cloreto de sódio no percentual de recuperação de oocistos. Utilizou-se o método de Kinyoun para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. previamente concentrados e purificados foram identificados pelo método de coloração. Após a purificação os oocistos foram pesquisados no sobrenadante e sedimento finais, de forma que foram considerados como oocistos recuperados e perdidos, respectivamente. A purificação garantiu um material mais limpo, com poucos resíduos e de fácil leitura, recuperando-se no sobrenadante um percentual que variou de 39,0% a 98,4%, enquanto o percentual de oocistos perdidos junto ao sedimento variou de 0,76% a 3,1%. Conclui-se que a técnica de purificação a partir de um número elevado de oocistos influencia os percentuais de recuperação, resultando em ampla variação, sendo os oocistos purificados essencialmente livres de resíduos.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp., purificação, flutuação, cloreto de sódio

² Trabalho encaminhado para a Revista "Arquivos do Instituto Biológico"

5.1.2 Abstract

Cryptosporidiosis is an emergent disease of major interest in public health. The methods of *Cryptosporidium* spp. oocysts detection in fecal and environmental samples have been estimated world-wide. This work intended to evaluate the influence of the purification technique in the oocyst recovery rate and elimination of sample residues through a centrifugal-flotation technique using saturated sodium chloride solution. *Cryptosporidium* spp. oocysts previously concentrated and purified were identified by the Kinyoun staining method. After the purification, the supernatants and final sediments were examined for oocysts presence, being classified as recovered and lost oocysts, respectively. Using the purification technique verified a cleaner resulting material with fewer residues. The recovery rate in the supernatant ranged from 39,0% to 98.4%, whereas the lost oocyst rate in the sediment varied from 0,76% to 3.1%. In conclusion, the purification technique from a high number of oocysts influences the recovery rate, resulting in a wide variation, with the purified oocysts essentially free of residues.

Key words: *Cryptosporidium* spp., purification, flotation, sodium chloride

5.1.3 Introdução

A criptosporidiose, doença causada pelo protozoário do gênero *Cryptosporidium* spp., vem se tornando, nos últimos anos, uma importante parasitose emergente para a saúde pública (MARKELL et al., 2003). Diversos surtos têm sido descritos, geralmente associados à ingestão de água e alimentos contaminados ou devido ao contato direto com animais (DENG & CLIVER, 1999). Contudo, acredita-se que a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água e alimentos seja

subestimada. A dificuldade de detectar os oocistos de *Cryptosporidium* spp. está relacionada ao seu pequeno tamanho e peso molecular, quantidade de oocistos, além da presença de detritos, sugerindo a necessidade de cuidados especiais durante o processamento laboratorial, para a garantia de um diagnóstico seguro (O'DONOGHUE, 1995; IRWIN, 2002). Aliado a isso, o limite de detecção dos métodos de identificação de oocistos é variável (TAYLOR & WEBSTER, 1998).

Vários métodos de detecção têm sido relatados para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. associando etapas de concentração e de identificação do parasito nos diversos tipos de amostras, sejam fecais ou ambientais, mas apresentando seus aspectos positivos e negativos, não existindo ainda um método universalmente aceito (SMITH, 1998). Desta forma, várias técnicas de concentração têm sido utilizadas através da centrífugo-flutuação com a utilização de soluções saturadas de sacarose, sal ou sulfato de zinco, ou pela centrífugo-sedimentação, utilizando-se o formol-éter (SMITH, 1998; DENG & CLIVER, 1999), além de técnicas modernas, como a separação imunomagnética (IMS) (MULLER, 1999; SOUZA, 2003).

Quanto à recuperação dos oocistos mediante o uso de soluções saturadas, Nieminski et al. (1995), LeChevallier et al. (1995) e Lima (2001) verificaram que a eficiência da técnica de recuperação de oocistos depende de vários fatores, dentre eles: a natureza da amostra, a idade, “viabilidade” e características da parede dos oocistos, e substância química utilizada, considerando suas propriedades físico-químicas.

Vale ressaltar, ainda, os cuidados com a metodologia durante a manipulação das amostras e procedimento durante a análise na avaliação de métodos de pesquisa, quando se busca segurança na recuperação de oocistos, praticidade e economia.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da eliminação de resíduos da amostra através da técnica de flutuação com solução saturada de cloreto de sódio no percentual de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp..

5.1.4 Material e Métodos

5.1.4.1 Oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram obtidos a partir de uma solução fecal constituída de um pool de amostras fecais de pacientes humanos naturalmente infectados, proveniente do Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE), e conservada em formalina a 10% sob refrigeração por três meses.

5.1.4.2 Concentração e quantificação dos oocistos na amostra fecal

Para a concentração dos oocistos nas amostras fecais (2 ml), utilizou-se o método de formol-éter (BRASIL, 1996), e nove repetições foram realizadas. O sedimento final foi conservado com formalina a 10% (1:1), do qual duas alíquotas de 5µl foram usadas para confecção de esfregaço em lâmina.

Para a identificação dos oocistos, utilizou-se o método de coloração Kinyoun (BRASIL, 1996). A leitura das amostras foi realizada através de microscópio óptico com objetiva de imersão (40X) percorrendo todo o campo (OLIVEIRA & GERMANO, 1992) e observando as características dos oocistos referente à forma, cor e estruturas internas (LIMA, 2001). Para o cálculo do número médio de oocistos por ml da amostra

(X) utilizou-se a fórmula recomendada por Cantusio Neto & Franco (2004), conforme descrito abaixo:

$$X = \frac{\text{Nº médio de oocistos}}{\text{Volume do sedimento analisado } (\mu\text{l})} \times \frac{\text{Volume total do sedimento } (\mu\text{l})}{\text{Volume da amostra (l)}}$$

5.1.4.3 Purificação dos oocistos

O procedimento de purificação dos oocistos das nove amostras fecais, apresentando um número conhecido de oocistos, foi realizado conforme Figura 1. As preparações (1mL) foram suspensas em solução de eluição (dodecil sulfato de sódio 0,1%; Tween 80 0,1%; tampão de salina-fosfato; pH 7,4) na proporção de 1:20 (20 ml) por um período de 30 minutos e em seguida foram submetidas à flutuação com 30 mL de solução salina saturada ($1,2\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) com auxílio de cateter (16 G) e seringa (60 ml), aplicando cuidadosamente a solução sob a amostra. A mistura (50 ml) foi centrifugada sem prévia homogeneização a 605 $\times g$ por 10 minutos, acelerando e desacelerando gradativamente. Após a centrifugação, as fases (25 ml) sobrenadante, juntamente com a interface, e o sedimento foram separadas, para posterior lavagens com solução de eluição na mesma quantidade e água (10 ml). O conteúdo final foi conservado em formol a 10% (1:1), e do volume final (1 ml) do sobrenadante e sedimento foram analisados 5 μl quanto ao número de oocistos conforme metodologias supracitadas.

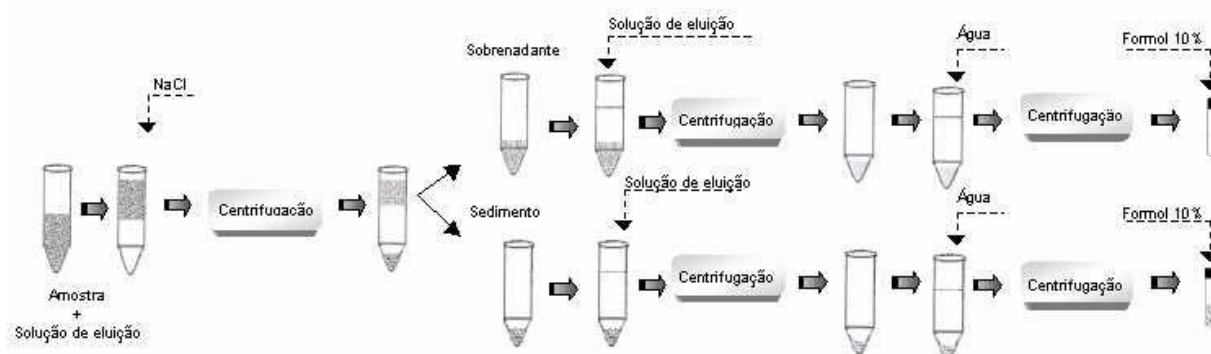


Figura 1. Desenho esquemático das etapas da purificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por flutuação com análise do sobrenadante e sedimento.

5.1.4.4 Eficiência da purificação de oocistos

A eficiência da purificação foi avaliada pelo número de oocistos recuperados no sobrenadante e pela avaliação visual da eliminação dos resíduos na amostra. Os oocistos recuperados no sedimento foram considerados como perdas. Desta forma determinou-se o percentual de recuperação (R) associando os números iniciais (I) e finais (F) de oocistos obtidos previamente e após o processo de purificação através da seguinte fórmula:

$$R = \frac{F}{I} \times 100$$

5.1.4.5 Análise de dados

Para avaliar o efeito da purificação no número de oocistos recuperados, os dados transformados (Log) foram analisados através do teste “t” de Student para observações pareadas ao nível de 5% de significância, pelo programa “STATISTIC FOR WINDOWS” 5.0 software.

5.1.5 Resultados e discussão

Após o processo de purificação com a solução saturada de cloreto de sódio, observou-se que o material purificado ficou mais limpo, com poucos resíduos e de fácil leitura, sendo mais eficiente que a técnica de formol-éter quanto à eliminação de resíduos na amostra, facilitando assim a detecção e/ou identificação de oocistos.

Estes resultados são semelhantes aos verificados por Huber et al. (2003), que comparando as técnicas de sedimentação pelo formol-éter e de centrífugo-flutuação utilizando solução saturada de açúcar observaram que a técnica de centrífugo-flutuação modificada foi mais eficiente para o diagnóstico de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos jovens, assim como aos obtidos por Garcia et al. (1983), que relataram maior eficiência para a centrífugo-flutuação, porém com base no percentual de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Por outro lado, Mtambo et al. (1992) apontaram que a técnica de sedimentação com formol-éter, foi mais eficiente que a flutuação com sacarose e ZnSO₄ em amostras fecais de gatos.

Quanto ao número de oocistos recuperados através da técnica de centrífugo-flutuação, os resultados foram satisfatórios, uma vez que em todas as amostras o número de oocistos recuperados no sobrenadante não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do número inicial, com exceção da amostra I, porém se verificou uma variação nos percentuais de recuperação entre 39% e 98,5% (Tabela 1).

Variações nos percentuais de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. são observadas em estudos com amostras fecais e ambientais devido a vários fatores, sejam inerentes à amostra, ao parasito, procedimento de concentração ou purificação do oocisto, além da substância química utilizada (NIEMINSKI et al., 1995; LeCHEVALLIER et al., 1995; KUCZYNSKA & SHELTON, 1999; LIMA, 2001).

Tabela 1. Médias e desvio padrão do número inicial de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e recuperados no sobrenadante e sedimento, após a técnica de purificação

Número de oocistos x 10 ³ /mL (Média ± dp)*			
(percentual de oocistos recuperados)			
Amostras	Número inicial de oocistos na amostra	Número final de oocistos	
		Sobrenadante	Sedimento
1	141 ± 36,7 ^{Aa}	104,5 ± 31,8 ^a (74,0)	4,5 ± 0,7 ^B (3,1)
2	143 ± 2,8 ^{Aa}	110 ± 14,1 ^a (76,9)	2,5 ± 0,7 ^B (1,7)
3	112,5 ± 3,5 ^{Aa}	85 ± 7,0 ^a (75,5)	2 ± 0,0 ^B (1,7)
4	132,5 ± 37,4 ^{Aa}	130,5 ± 40,3 ^a (98,4)	4 ± 0,0 ^B (3,0)
5	131 ± 15,5 ^{Aa}	95 ± 14,1 ^a (72,5)	1 ± 0,0 ^B (0,76)
6	105,5 ± 6,3 ^{Aa}	53,5 ± 11,3 ^a (50,7)	1 ± 0,0 ^B (0,94)
7	137,5 ± 34,6 ^{Aa}	93,5 ± 6,3 ^a (68,0)	1,5 ± 0,7 ^B (1,0)
8	115 ± 18,3 ^{Aa}	101 ± 1,4 ^a (87,8)	3 ± 0,0 ^B (2,6)
9	98,5 ± 9,1 ^{Aa}	38,5 ± 4,9 ^b (39,0)	1,5 ± 0,7 ^B (1,52)

Na horizontal letras maiúsculas e minúsculas iguais não diferem (p < 0,05).

*n= 2

Lima (2001) avaliando a recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água e leite mediante o uso de soluções saturadas observou que a natureza da amostra influenciou o percentual de recuperação, verificando o melhor resultado nas amostras de leite. Apesar deste estudo ter sido delineado para amostras fecais, foram observadas variações nos percentuais de recuperação, sugerindo que fatores intrínsecos da própria amostra contribuem para a variação, considerando que os oocistos usados no presente trabalho não foram provenientes de um único indivíduo.

Estudos têm demonstrado que substâncias utilizadas para a concentração de oocistos com densidades entre 1.050 e 1.300, através de gradientes de densidades contínuos ou descontínuos, são empregadas com a finalidade de flutuação, resultando em perdas insignificantes de oocistos viáveis ou não (MEDEMA et al., 1998; DENG & CLIVER, 2000; KUCZYNSKA & SHELTON, 1999).

A utilização da solução saturada de NaCl (1,2 g.ml⁻¹) contribuiu para a flutuação dos oocistos, pois além da elevada densidade, o efeito da solução também está relacionado com a habilidade de cátions monovalentes em dispersar partículas permitindo a separação entre os oocistos e os resíduos (KUCZYNSKA & SHELTON, 1999). Lima (2001) avaliando a concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água por diferentes substâncias químicas, verificou melhores resultados com o cloreto de sódio.

É importante salientar que o uso de soluções detergentes como tween 20, tween 80 e dodecil sulfato de sódio reduzem agregações e mantém os oocistos livres (SMITH & ROSE, 1990), de forma a otimizar o processo de purificação. Assim como os cuidados durante o procedimento da metodologia, como a forma de adicionar a substância de concentração, a decisão de homogeneizar a amostra junto com as substâncias, ou ainda a escolha do tipo de recipiente para a inoculação das amostras devem ser relevantes nos estudos com *Cryptosporidium* spp. (McNABB et al., 1985; ARROWOOD & STERLING, 1987; YOUNG & KOMISAR, 2005). Nesse trabalho, a forma pela qual a solução saturada foi adicionada cuidadosamente sob a amostra, e sem homogeneização, não provocando distúrbios entre a solução e a amostra, provavelmente facilitou ainda mais a flutuação dos oocistos, assim como a utilização de tubos cônicos plásticos, que diminuem a aderência dos oocistos aos recipientes.

Quanto às perdas de oocistos, verificou-se que os percentuais de recuperação nos sedimentos não complementaram os percentuais de oocistos recuperados nos sobrenadantes para 100%, com exceção da amostra D (Tabela 1), de forma que após o procedimento de purificação muitos oocistos não foram encontrados.

Nieminski et al (1995), avaliando influências da purificação na recuperação dos oocistos em amostras de água verificaram que quando a etapa de flutuação foi empregada houve redução de mais de 50% do número de oocistos recuperados, e sugeriram que quanto menor o número de etapas no procedimento, menor a probabilidade de perdas de oocistos.

Vale ressaltar que no presente trabalho não foram utilizados diferentes gradientes de densidade. Contudo a presença de oocistos em camadas intermediárias da solução no momento da purificação foi verificada por Arrowood & Sterling (1987), porém usando gradientes descontínuos.

Dentre outras causas de perdas dos oocistos em amostras submetidas à flutuação, a densidade dos oocistos desempenha um papel relevante. Alguns fatores como a idade e a “viabilidade” dos oocistos, podem estar relacionados com a capacidade de aderência do oocisto, e consequentemente influenciar a sua densidade, o que mostra a importância de atentar-se para o tempo que os oocistos ficam em contato com as partículas na amostra (SMITH et al., 1989; SMITH & ROSE, 1990; KUCZYNSKA & SHELTON, 1999, YOUNG & KOMISAR, 2005). Há divergências quanto ao efeito da “viabilidade”, pois conforme LeChevallier et al. (1995) oocistos não viáveis são melhor recuperados por flutuação, porém Bukhari & Smith (1995) comentam que esses oocistos têm mais facilidade de adesão à resíduo e consequentemente apresentam densidade mais elevada, tendo menos chances de serem recuperados por técnicas de flutuação.

Desta forma pode-se pressupor que a purificação através da técnica de flutuação terá melhor eficiência na recuperação de oocistos quando empregada em estudos com amostras frescas, e isso pode ser uma realidade para estudos com amostras fecais, enquanto para amostras ambientais, o uso desta técnica poderá comprometer os resultados, pois uma vez presentes no ambiente, os oocistos são capazes de sobreviver por longos períodos suportando ampla variação de temperatura, e desta forma a sua idade será bastante variável. A técnica de separação imunomagnética pode ser promissora, considerando que o comprometimento da densidade do oocisto, não influencia na sua eficácia, além de que o magnetismo envolvido no procedimento facilita o isolamento do oocisto (CAREY et al., 2004).

5.1.6 Conclusão

A técnica de purificação a partir de um número elevado de oocistos influencia os percentuais de recuperação, resultando em ampla variação, sendo os oocistos purificados essencialmente livres de resíduos.

5.1.7 Referências Bibliográficas

ARROWOOD M.J. & STERLING C.R. 1987. Isolation of *Cryptosporidium* spp. oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. **Journal of Parasitology**, v. 73, n. 2, p. 314-319.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS-Técnicas de diagnóstico**. Brasília/DF. 1996. 27p.

BUKHARI, Z.; SMITH, H.V. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 113-121, 1995.

CANTUSIO-NETO, R.; FRANCO, R.M.B. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 118, p. 52-59, 2004.

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

DENG, M.Q.; CLIVER, D.O. Comparative detection of *Cryptosporidium parvum* from apple juice. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 155-162, 2000.

DENG, M.Q; CLIVER, D.O. *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 113-121, 1999.

GARCIA, L.S.; BREWER, T.C.; BRUCKNER, D.A.; SHIMIZU, R.Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 185-190, 1983.

HUBER F., BONFIM T.C., GOMES R.S. Comparação da eficiência da técnica de sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrífugo-flutuação modificada na

detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. sp. em amostras fecais de bezerros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 2, p. 135-137. 2003.

IRWIN, P.J. Companion Animal Parasitology: A clinical perspective. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 581-593, 2002.

KUCZYNSKA, E.; SHELTON, D.R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2820-2826, 1999.

LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; SIEGEL, J.E.; ABBASZADEGAN, M. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 690-697, 1995.

LIMA, E.C. Métodos de detecção e enumeração de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água e leite. 2001, 62f. **Dissertação** (Mestrado em Nutrição – área de Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2001.

MARKELL, E.K.; Voge M.; John, D.T. Markell & Voge. **Parasitologia Médica**, 8º ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan. 2003.

MCNABB, S.J.N., HENSEL, D. M., WELCH D. F.; HEIJBEL, H.; McKee, G.L.; ISTRE, G.R. Comparasion of sedimentation and flotation techniques for identification

of *Cryptosporidium* spp. sp. oocysts in a large outbreak of human diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 587-589, 1985.

MEDEMA, G.J.; SCHETS, F.M.; TEUNIS, P.F.M.; HAVELAAR, H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4460-4466, 1998.

MTAMBO, M.M.A.; NASH, A.S.; BLEWETT, D.A.; WRIGHT, S. Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cat faecal specimens. **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 1-2, p. 49-57, 1992.

MULLER, A.P.B. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo. **Dissertação. USP**: São Paulo. 1999, 107p.

NIEMINSKI, E.C; SCHAEFER, F.W.I.I.I.; ONGERTH, J.E. Comparison of two methods for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1714-1719, 1995.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 139-195. 1995.

OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo-SP, Brasil-II/ Pesquisa de protozoários intestinais. **Revista de Saúde Pública**, v. 26, n. 5, p. 332-335, 1992.

SMITH, H.V.; MCDIARMID, A.; SMITH, A.L.; HINSON, A.R.; GILMOUR, R.A. An analysis of staining methods for the detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in water-related samples. **Parasitology**, v. 99, p. 323-327, 1989.

SMITH, H.V. Detection of parasites in the environment. **Parasitology**, v. 117,p. S113-141, 1998.

SMITH, H.V; ROSE, J.B. Waterborne Cryptosporidiosis. **Parasitology Today**, v. 6, p. 8-12, 1999.

SOUZA, D.S.M. Comparison between immunomagnetic separation, coupled immunofluorescence, and the techniques of Faust et al. and of diagnosis of *Giardia lamblia* cysts in human Feces. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 339-342, 2003.

TAYLOR, M.A.; WEBSTER, K.A. Recent advances in the diagnosis in livestock of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Giardia* and other protozoa of veterinary importance. **Research in Veterinary Science**, v. 65, p. 183-193, 1998.

YOUNG P. L.; KOMISAR S. J. Impacts of viability and purification on the specific gravity of *Cryptosporidium* spp. oocysts. **Water Research**, v. 39, p. 3349-3359, 2005.

5.2 TRABALHO CIENTÍFICO II: PESQUISA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. EM ÁGUAS SUPERFICIAIS NA REGIÃO METROPOLITANA DE RECIFE/PE.

5.2.1 Resumo

Cryptosporidium spp. é um parasito emergente que acomete o homem e animais, sendo os pacientes imunocomprometidos mais gravemente afetados pela doença diarréica. O parasito é transmitido pela rota fecal-oral e apresenta grande disseminação e resistência ambiental. A associação de casos da doença na população humana com a presença de *Cryptosporidium* spp. em águas de consumo ou de recreação tem motivado a pesquisa do parasito no ambiente aquático. Esse trabalho objetivou a obtenção de dados de ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais da Região Metropolitana de Recife utilizando as técnicas de coloração histoquímica e imunológica. Oocistos foram pesquisados em mananciais e no sistema de tratamento (água bruta e tratada) através da filtração das amostras em membrana (47mm de diâmetro e 3µm de porosidade nominal) sob pressão negativa, sendo identificados pelos métodos de coloração Kinyoun e imunofluorescência direta (IFD) associada ao 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), analisando-se amostras durante 12 meses, nos períodos seco (Setembro a Fevereiro) e chuvoso (Março a Agosto). A qualidade da água foi avaliada através dos parâmetros microbiológicos (coliformes totais e fecais) e físico-químicos (turbidez e pH). Na água tratada não se verificou ocorrência de *Cryptosporidium* spp., enquanto nas amostras de água bruta foram encontradas estruturas álcool-ácido resistentes semelhantes aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 100% (05/05) dos locais e em 40% (24/60) das amostras analisadas pelo método Kinyoun, sendo a presença do parasito confirmada pela técnica IFD/DAPI em 40%

(02/05) dos locais e em 5% (03/60) das amostras, com o número variando de 16 a 40 oocistos/l, e verificando sua ocorrência no período seco e chuvoso. Todas as amostras encontraram-se dentro dos limites microbiológicos e físico-químicos padrões, exceto no parâmetro turbidez. Conclui-se que oocistos de *Cryptosporidium* spp. ocorrem em águas de rio na Região Metropolitana de Recife, sendo este o primeiro relato de *Cryptosporidium* spp. em mananciais de Pernambuco e do Nordeste. A técnica IFD/DAPI permite uma melhor identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, no entanto a coloração histoquímica demonstrou ser útil como uma técnica de triagem.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp., água bruta, água tratada, Kinyoun, Imunofluorescência, DAPI

5.2.2 Abstract

Cryptosporidium spp. is an emergent pathogen that affects man and animals, with immunocompromised individuals being more seriously affected by the disease. The parasite is transmitted by fecal route and presents great environmental dissemination and resistance. Involvement of this parasite in human disease and the presence of *Cryptosporidium* spp. in either recreational or consumption water has motivated the research of the parasite in the aquatic environment. This work aimed to assess the occurrence of the parasite in superficial waters of the Metropolitan Region of Recife using histochemical and immunologic techniques. Oocysts of *Cryptosporidium* spp. were assessed in river waters and water treatment systems (treated and raw water) through filtration of the samples in a membrane (diameter of 47mm, nominal porosity of

3µm) under negative pressure, and also by the Kinyoun staining method, direct immunofluorescence (IFD) and 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) methods. The samples were analyzed during 12 months, during drought (September to February) and raining (March to August) seasons. The water quality was evaluated using both microbiological (total and fecal coliform counts) and physicochemical (turbidity and pH) parameters. The oocysts were not found in treated water, but in raw water samples acid fast structures like *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in 100% (05/05) of the locations investigated and in 40% (24/60) of the analyzed samples when using the Kinyoun identification technique, being the presence of the parasite confirmed by IFA/DAPI technique in 40% (02/05) of the locations investigated and in 5% (03/60) of the samples tested, with the number varying from 16 oocysts/l to 40/l, in dry and raining seasons. All the samples were found within the microbiological and physicochemical standards limits, except in the turbidity parameter. In conclusion, *Cryptosporidium* spp. oocysts occur in river waters of the Metropolitan Region of Recife. This is the first report of *Cryptosporidium* spp. in surface water in the state of Pernambuco and in the Northeast of Brazil. The IFD/DAPI technique was shown to be the best performance in the identification of *Cryptosporidium* spp oocysts in water samples. Therefore, histochemical staining technique demonstrated to be useful as a screening method.

Key word: *Cryptosporidium* spp., raw water, treated water, Kinyoun, Immunofluorescence, DAPI

5.2.3 Introdução

Diante do cenário das doenças provocadas por protozoário que têm veiculação hídrica no Brasil, a criptosporidiose vem se destacando. Das espécies conhecidas *Cryptosporidium parvum* e *C. hominis* (antes reconhecida como genótipo 1 de *C. parvum*) são mais frequentemente associadas à infecção no homem, embora haja relatos em casos humanos do envolvimento de *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, genótipos cervine e pig (XIAO et al, 2004). Esse parasita produz oocistos que apresentam resistência ambiental e, desta forma, podem ser veiculados por água e alimentos contaminados atingindo um grande contingente da população (MacKENZIE et al., 1994; SMITH & ROSE, 1998; SMITH, 1998; CAREY et al., 2004). Os oocistos podem reter a sua infectividade por vários meses no ambiente, principalmente quando associado a material fecal (YANG et al., 1996), ou na água (MEDEMA et al., 1998).

A contaminação do ambiente aquático por parasitas intestinais pode ocorrer de várias formas, mas principalmente pela deficiência de infra-estrutura dos serviços de esgotamento sanitário e do tratamento das águas residuais de esgoto, presença do homem e animais infectados nas margens dos rios e lagos, ou nas redondezas de poços. Ainda pode se verificar o aumento do grau de contaminação pela concentração de matéria orgânica na época de chuvas escassas e pelas chuvas intensas ocasionando erosão e lixiviação dos solos contaminados. Na água tratada a presença desses parasitos pode ser devido a contaminações cruzadas ou devido à facilidade que os oocistos têm em ultrapassar os filtros usados em tratamentos convencionais (LeCHEVALLIER et al., 1991b; SMITH, 1998).

A presença de material fecal no solo e conseqüentemente nos corpos de água, tem resultado freqüentemente na associação da contaminação aquática pelo

Cryptosporidium spp. com animais, dentre os quais o gado bovino tem se destacado devido à elevada frequência de infecção e grande eliminação de oocistos (10^4 /g) nas fezes, de forma que quaisquer atividades com estes animais como ranchos, pastos e fazendas têm sido reconhecidas como significantes fontes de contaminação do ambiente aquático (SCOTT et al., 1994; GRACZYK et al., 1997; ATWILL et al., 1998). A associação epidemiológica da contaminação de águas superficiais com oocistos de *Cryptosporidium* spp. através de esterco, a partir dos estudos de fatores ambientais e geográficos, revelou a efetiva participação do gado bovino na veiculação do parasito (GRACZYK et al., 2000).

Há vários relatos de ocorrência de *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático no mundo, sendo identificados no Japão, Reino Unido, Alemanha, Austrália, Canadá, Estados Unidos, Espanha, Costa Rica e Brasil (SMITH, 1998; LUNA et al., 2002), seja em águas superficiais bruta ou tratada (LeCHEVALLIER et al, 1991a; LeCHEVALLIER et al, 1991b; TSUSHIMA et al. 2003; MULLER, 1999; LUNA et al., 2002), águas minerais engarrafadas (FRANCO & CANTUSIO NETO, 2002), em poços (GAMBA et al., 2000), esgotos tratados ou não (MADORE et al., 1987; SMITH, 1998; FARIAS et al., 2002), lodo ativado (SANTOS et al., 2004) ou no mar (FAYER et al., 2004).

No Brasil, apesar da preocupação com a presença do parasito em água de consumo humano, retratada pela portaria 1469/MS (BRASIL, 2000), revogada pela portaria 518/MS (BRASIL, 2004), dados referentes à pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em águas de fontes diversas (tratada ou bruta) têm sido relatados nos Estados de São Paulo e de Minas Gerais (MULLER, 1999; GAMBA et al., 2000; FRANCO et al. (2001); FRANCO & CANTUSIO NETO, 2002; FERREIRA et al., 2004).

Grandes esforços têm sido feitos para o desenvolvimento e aprimoramento de métodos de detecção e desinfecção mais eficazes e/ou remoção de *Cryptosporidium* spp. em estações de tratamento de água assim como o monitoramento deste patógeno nas fontes de água (MYODA & HUANG, 2001). A identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. pode ser realizada por diferentes métodos, e isso associado à complexidade das técnicas têm resultado em assunto polêmico entre os estudiosos, de forma que o uso de apenas um método pode não ser suficiente para confirmar a sua presença na amostra e desta forma resultar na necessidade de outros métodos confirmatórios (WIDMER et al., 1998). Vale salientar que os oocistos presentes nas amostras de água estão sujeitos a uma variedade de condições ambientais que podem afetar a habilidade dos corantes na coloração dos oocistos (SMITH et al., 1989).

A imunofluorescência direta tem sido o método mais usado mundialmente para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água como, por exemplo, pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2001), porém estudos têm sido realizados com a técnica histoquímica, demonstrando elevados percentuais de ocorrência do parasito (LUNA et al., 2002) e semelhantes aos obtidos pela técnica de PCR (ALI et al., 2004).

O corante vital 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) é fluorogênico, possibilitando o seu uso simultâneo ao ensaio de imunofluorescência e por técnicas microscópicas, e desta forma aumenta a precisão na identificação deste parasito, permitindo a visualização do oocisto e dos núcleos dos esporozoítos, de forma rápida e menos laboriosa, e isso é de extrema importância quando os oocistos ocorrem em pouco número nas amostras ambientais (GRIMASON et al., 1994). Assim sendo, o DAPI tem sido usado para confirmação de diagnóstico, uma vez que o surgimento de organismos e partículas de tamanho e cor semelhantemente ao oocisto, confunde o analista (FAYER

et al., 2000), além de que as pressões ambientais podem tornar os oocistos atípicos com alterações na forma e tamanho, e alterações físicas como distorção e contração (SMITH, 1998).

Uma variedade de testes moleculares oferece alternativas aos diagnósticos convencionais de oocistos de *Cryptosporidium* spp., mas apesar da rapidez, alta sensibilidade e precisão, apresentam algumas limitações, devido aos resultados falso-positivos que podem ocorrer devido à presença de microrganismos não viáveis, às contaminações laboratoriais e ambientais (FAYER et al., 2000).

A estação de tratamento d'água (ETA) Presidente Castelo Branco é responsável pelo abastecimento de 36% da Região Metropolitana de Recife, abrangendo a cidade de Recife, São Lourenço da Mata, Camaragibe e Jaboatão, e realiza um tratamento convencional (mistura com carvão ativado e coagulação com sulfato de alumínio, seguidos pela floculação, decantação, filtração em filtros de areia e desinfecção com cloro) das águas captadas de diferentes mananciais incluindo o Rio Tapacurá, além do Rio Capibaribe e o Rio Duas Unas com capacidade nominal de tratamento de 4m³/s. Os maiores mananciais (Rio Tapacurá e seu afluente várzea do Una) existentes na bacia do Rio Tapacurá exportam água para a região metropolitana do Recife em mais de 25% da oferta (BRAGA, 2001).

Considerando que nessa bacia ocorrem as três atividades potencialmente poluidoras básicas: domésticas, industriais e agropastoris, e que a ETA recebe águas de diferentes mananciais, este estudo objetivou a análise da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais bruta destinadas ao tratamento convencional e da água após o seu tratamento completo, no período de setembro de 2003 a agosto de 2004.

5.2.4 Material e Métodos

Amostras de águas superficiais foram analisadas durante 12 meses, nos períodos seco (Setembro à Fevereiro) e chuvoso (Março à Agosto), sendo coletadas com galões na quantidade de cinco litros em pontos de captação existentes nos mananciais (Rio Tapacurá, Rio Duas Unas, Rio Capibaribe em Tiúma, e Rio Capibaribe em Castelo), e na entrada e saída do sistema de tratamento (água bruta e tratada, respectivamente), totalizando cinco locais de coleta de água bruta com 60 amostras e 12 amostras de água tratada coletadas na saída do sistema de tratamento.

As amostras foram filtradas sob pressão negativa usando membranas de ésteres de celulose (47mm de diâmetro e 3µm de porosidade nominal). Para a concentração dos oocistos foi usada a metodologia descrita em Aldom & Chagla (1995) com modificação na etapa de dissolução da membrana em acetona, sendo utilizado a sua eluição com solução contendo Dodecil Sulfato de Sódio (1%) e Tween 80 (1%) e auxílio de uma espátula plástica para raspagem da superfície da membrana (Franco et al., 2001). O volume resultante foi centrifugado (605 x g; 10 minutos), e posteriormente sucessivas centrifugações foram realizadas com álcool 95% e 70% ressuspendendo os sedimentos. Duas alíquotas de 5 µl do sedimento final foram colocadas em lâminas e para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. foi usado o método de coloração Kinyoun (BRASIL, 1996), a imunofluorescência direta conforme recomendações do fabricante do kit Merifluor (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio) associado ao corante 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI-Sigma®) conforme Smith et al. (2002).

Para a identificação dos oocistos, nas preparações com coloração de Kinyoun sob leitura com microscopia óptica, consideraram-se as estruturas ovóides ou esféricas de 4-6 µm de diâmetro que apresentavam coloração vermelha e estruturas

internas (LIMA et al., 2004). Nas preparações resultantes da análise IFD/DAPI, sob leitura em microscópio de epifluorescência com filtro para DAPI, consideraram-se as estruturas com tamanho e formato compatíveis, na cor verde-maçã, com ou sem sutura exibindo fluorescência, e quando se observou de um a quatro núcleos azuis-céu, bem distintos, dentro de um único oocisto com coloração azul-clara ou intensa (USEPA, 2001).

O cálculo do número médio de oocistos por litro (X) foi realizado de acordo com a fórmula descrita por Cantusio Neto & Franco (2004):

$$X = \frac{\text{Nº médio de oocistos}}{\text{Volume do sedimento analisado } (\mu\text{l})} \times \frac{\text{Volume total do sedimento } (\mu\text{l})}{\text{Volume da amostra (l)}}$$

Para a realização do teste controle quanto a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. spp., amostras de água foram coletadas na entrada (água bruta) e saída (água tratada) do sistema de tratamento, sendo a água destilada usada como controle negativo e o ensaio realizado sob duas repetições para cada tipo de amostra de água (bruta e tratada). Oocistos de *Cryptosporidium* spp. spp. foram gentilmente cedidos pelo setor de parasitologia do Laboratório Central do Estado (LACEN- PE), sendo purificados através da centrífugo-flutuação com solução saturada de NaCl (1,2 g mL⁻¹) e conservados em formol a 10% sob refrigeração. O procedimento de quantificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. padrão baseou-se em Lima et al. (2004), e para inoculação das amostras controle seguiu-se o protocolo do método 1622 (USEPA, 2001), sendo as amostras de água tratada e água bruta inoculadas com um número estimado de 1,5 x 10² oocistos/l.

A determinação da eficiência de recuperação (R) baseou-se no método 1622 (USEPA, 2001), considerando o número de oocistos presentes na amostra inoculada (I)

e sem inoculação (S) e o número de oocistos inoculados (O), através da seguinte fórmula:

$$R = \frac{I - S}{O} \times 100$$

Para a avaliação da qualidade da água, as análises bacteriológicas de coliformes totais e termotolerantes e as análises físico-químicas (turbidez e pH) foram realizadas conforme metodologia descrita no APHA (1998).

Dados de precipitação pluviométrica durante o estudo foram obtidos no Laboratório de Meteorologia de Pernambuco (ITEP/PE).

5.2.5 Resultados e Discussão

As amostras de água tratada não apresentaram positividade nas análises parasitológicas, enquanto nas amostras de água bruta verificou-se positividade tanto pelo método histoquímico quanto pelo método imunológico. Desta forma, nas amostras de água bruta foram encontrados estruturas álcool-ácido resistentes similares aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 100% (05/05) dos locais estudados, estando presente em 40% (24/60) das amostras, sendo a presença do parasito confirmada pela técnica IFD/DAPI em 40% (02/05) dos locais e em 5% (03/60) das amostras (Tabela 1).

Isto vem alertar sobre a superestimação da presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. quando a coloração histoquímica é usada, embora sejam bastante discutidos, entre os estudiosos no assunto, os fatores que podem influenciar o desempenho da técnica de imunofluorescência. Considerando que o princípio da técnica depende da formação do complexo antígeno-anticorpo, comenta-se que a presença de resíduos na amostra pode impedir a marcação fluorescente dos oocistos; e outros fatores

podem ser inerentes ao próprio oocisto de origem ambiental, uma vez que a formação deste complexo depende da integridade do oocisto (VESEY et al., 1993; SMITH, 1998; MYODA & HUANG, 2001).

No presente estudo uma das amostras positivas para o parasito apresentou turbidez elevada de 73,9 UNT (Tabela 1), valor acima do valor máximo recomendado (Brasil, 2005), isto demonstra que a interferência na técnica de identificação pela presença de resíduos como verificado por Myoda & Huang (2001), é relativa, e os oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem ser diagnosticados a partir de reações de imunofluorescência em amostras que apresentam elevado número de resíduos, assim como se verifica em amostras de esgotos e de lodo ativado (MADORE et al., 1987; SMITH, 1998; FARIAS et al., 2002; SANTOS et al., 2004). Isto sugere que, se o baixo número de amostras positivas pela técnica imunológica foi devido a problemas no desempenho da técnica, a influência pode ter sido resultante de outros fatores. Neste estudo, por exemplo, durante o procedimento de concentração na amostra, os oocistos tiveram forte exposição ao álcool, no entanto não existem dados que demonstrem a influência do álcool na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp..

Por outro lado, avaliando a qualidade da água, todas as amostras de água bruta encontraram-se dentro dos padrões da classe II (BRASIL, 2005), no que refere aos coliformes termotolerantes, apresentando valores variando de zero a $5,0 \times 10^2$ (padrão: 1000/ 100ml máx.), e ao pH com valores entre 6,93 a 8,89 (padrão: mín. 6,0 e máx. 9,0), no entanto quanto à turbidez, doze amostras apresentaram valores acima do máximo permitido variando de 42,2 a 106 UNT (padrão: 40 UNT máx.), das quais onze não apresentaram positividade quando analisadas pelos métodos Kinyoun e IFD/DAPI. Na Tabela 1 podem visualizados os dados das análises microbiológicas e físico-químicas das amostras de água bruta que apresentaram positividade na análise parasitológica.

Tabela 1. Resultados do número de estruturas álcool-ácido-resistentes coradas pelo método Kinyoun e oocistos de *Cryptosporidium* spp. identificados pela técnica IFD/DAPI, e das análises físico-químicas e microbiológicas das amostras de água bruta que apresentaram positividade na análise parasitológica no período seco e chuvoso

Período	Local	Parâmetros Físico-Químicos		Parâmetros microbiológicos		Número de estruturas álcool-ácido resistentes/l	Número de oocistos/l
		pH	Turbidez (UNT)	Colif. Totais (NMP/100ml)	Colif. Fecais (NMP/100ml)	Coloração Kinyoun	IFD/DAPI
Seco	I	7,8	16,8	$4,0 \times 10^1$	0	76	-
		9,0	8,2	$2,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	80	-
		8,18	12,3	$4,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	88	-
		8,54	17	0	0	100	-
		7,94	9,6	0	0	4	-
		7,38	7,8	0	0	4	-
	II	7,2	7,65	$2,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	8	-
		7,97	73,9	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	84	16
	III	7,76	5,35	$1,1 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$	84	-
		7,92	10,3	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	4	-
	IV	8,15	2,84	$1,1 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$	24	-
		7,55	4,8	0	0	16	-
	V	9,0	8,2	0	0	16	-
		8,18	54,1	$6,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	20	-
		8,35	24,1	$4,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	12	-
Chuvoso	I	7,9	13,8	$9,0 \times 10^1$	0	550	-
		8	12,5	$9,0 \times 10^1$	0	2100	-
		8,02	5,95	$4,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	2400	-
		7,5	5,5	$4,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	1900	40
		7,48	3,46	$9,0 \times 10^1$	0	650	-
		8,0	3,7	$9,0 \times 10^1$	0	600	40
	III	8,37	24,6	$2,0 \times 10^1$	0	10	-
		8,25	24,9	$4,0 \times 10^1$	0	40	-
	IV	7,93	27,7	$3,4 \times 10^2$	0	40	-

I) captação do rio Tapacurá II) Captação do rio Duas Unas, III) captação do rio Capibaribe em Tiúma, IV) captação do rio Capibaribe em Castelo, V) entrada do sistema de tratamento. IFD (imunofluorescência direta). DAPI (4'6'-Diamidino 2'-phenylindole). (-) negativo.

Os resultados apresentados foram corroborados por aqueles obtidos nas amostras controles, quando a técnica de Kinyoun permitiu um percentual de recuperação de 68,31% tanto na água bruta (67,7 UNT, pH = 7,2) quanto na água tratada (0,7

unidades nefelométricas de turbidez (UNT), pH = 6,8), enquanto após o emprego do método de imunofluorescência verificou-se uma diminuição do percentual de oocistos recuperados, de 33,05% e de 22,03% na água tratada e bruta, respectivamente. No entanto, em relação à diferença nos resultados entre os métodos, é importante lembrar que para o teste controle deste estudo, foram usadas amostras “*in natura*”, onde diferentes organismos álcool-ácido resistentes podem ser verificados.

Neste estudo, a possibilidade de ocorrências de diferentes organismos álcool-ácido resistentes no ambiente aquático, e a falta de especificidade da técnica de Kinyoun, dificultaram a realização do diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. de origem ambiental através dessa técnica. Ali et al. (2004) analisando a água de três rios através da técnica de Kinyoun, detectaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 33%, 50% e 100% das amostras, no entanto todas as amostras que apresentaram positividade por essa técnica também foram positivas quando analisadas pela técnica de PCR. Luna et al. (2002) obtiveram excelentes resultados após o emprego da coloração histoquímica para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água bruta, verificando um percentual de 85,7%, porém usando o método de Koster modificado, sendo esta a única técnica usada para diagnosticar o parasito.

Neste estudo verificou-se a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. apenas no Rio Capibaribe em Tiúma (16 oocistos/l) e no Rio Tapacurá (40 oocistos/l), no período seco e chuvoso, respectivamente (Tabela 1). Estas observações são diferentes dos resultados de Tsushima et al. (2003), que verificaram em Hokkaido/Japão a ocorrência deste parasito nos três mananciais selecionados para o estudo, sempre no período final do verão a início do outono com valores máximos de 3.300, 3.500 e 5.000 oocistos/litro, sendo importante considerar as fortes nevascas durante três meses no período do inverno que impossibilitaram a coleta de amostras. Poucas são as

informações sobre a influência climática na ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático, mas o comportamento sazonal deste parasito também tem sido relatado em estudos com alimentos e animais, revelando a sua ocorrência no período de verão e inverno (SANFORD & JOSEPHSON, 1982, SCOTT et al., 1994, MONGE et al., 1996).

Os resultados deste trabalho encontram-se dentro da variação mundial. A contaminação de águas superficiais por *Cryptosporidium* spp. tem sido verificada em vários países com diferentes percentuais de ocorrência e variações no número de oocistos por litro, sejam nos países desenvolvidos ou em desenvolvimento, observando-se percentuais de amostras positivas variando de 4,4% até 100% (Smith, 1998), assim como valores de 0,05 oocistos/l (WATANABE et al., 2005) a 5.800 oocistos/l (Madore et al., 1987). A presença deste parasito nas águas superficiais é muito relativa às condições do meio, pois depende do potencial das fontes de contaminação do ambiente aquático, e a sua detecção, muitas vezes, está relacionado à área geográfica selecionada para o estudo, ou ainda, à eficiência da metodologia empregada.

Em relação à frequência de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. de acordo com o local neste estudo, verificou-se que foi maior para o Rio Tapacurá com valor de 16,66% (02/12), enquanto no Rio Capibaribe em Tiúma foi de 8,33% (01/12). Vale salientar a existência de um curral de bovinos de localização ribeirinha e próximo ao ponto de captação do Rio Tapacurá. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que bovinos de leite e corte assumem importante papel na contaminação aquática com oocistos de *Cryptosporidium* spp. (HANSEN & ONGERTH, 1991; GRACZYK et al., 1997; GRACZYK et al., 2000). Hansen & Stenstrom (1998) observaram que a frequência de amostras positivas foi aproximadamente duas vezes mais alta em águas

superficiais de áreas agrícolas, e seis vezes mais alta em áreas com potencial impacto de efluentes, quando comparado com zonas de nascentes.

É importante considerar que existem diversas fontes poluidoras no curso dos rios avaliados nesse estudo, que apesar da localização geográfica diferente, apresentam fatores comuns. Dados concretos de poluição ambiental para o Rio Tapacurá foram descritos por Braga (2001), e dentre as diversas fontes de contaminação por microrganismos patogênicos da bacia desse rio, pode-se destacar os efluentes não tratados de matadouros, principalmente quando abatidos animais doentes; de esgotos, seja de fossas sépticas ou despejados a céu aberto, em valetas, córregos ou diretamente nos cursos d'água e efluentes de terrenos com atividades agrícolas e pastoris.

Lechevallier et al. (1991a) associaram a maior densidade de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de rio com as descargas de esgoto e efluentes industriais. Por outro lado Hansen & Ongerth (1991) verificaram que a concentração de oocistos foi dez vezes mais elevada no ambiente aquático de áreas que recebiam influência de fazendas de gado bovino. Após analisar amostras de águas superficiais de diversas procedências, Madore et al. (1987) relataram a possibilidade de diferentes fontes de contaminação pelos oocistos, assim as águas de rio estavam expostas a tanques sépticos e descargas de esgoto de uma pequena comunidade, os canais de irrigação recebiam águas residuais de terras de pastagem de bovino e de esgoto tratado, e o córrego estava exposto ao solo de fazenda.

Assim, a localização de fazendas próximas aos corpos d'água aumenta a probabilidade de inundação e oportunidade de escoamento de oocistos (FRASER et al., 1998), da mesma forma como o tipo e tempo das atividades poluidoras podem influenciar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e a flutuação da densidade de oocistos em águas de rio. É importante informar que durante o desenvolvimento do estudo os

índices de precipitação pluviométrica representaram adequadamente as estações climáticas, de forma que foi maior no período chuvoso. Neste sentido Tsushima et al. (2003) comentam que o aumento no número de oocistos nos rios pode ter sido influenciado pelo maior fluxo de animais no local e pelos maiores índices de precipitação pluviométrica identificados por observações meteorológicas.

Quando oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram identificados pelo DAPI (Tabela 1), verificou-se que nas amostras do Rio Tapacurá os oocistos não apresentaram esporozoítos, enquanto na amostra do Rio Capibaribe em Tiúma os oocistos apresentaram dois esporozoítos. Este resultado é semelhante ao observado por Smith et al. (2002), quando verificaram que os oocistos de origem aquática podem apresentar números intermediários de esporozoítos, diferentes de zero e quatro, além de que observaram que oocistos vazios são mais freqüentes do que aqueles que apresentam quatro unidades de esporozoítos. Ainda conforme os estudos de Grimason et al. (1994) e LeChevallier et al. (1990) citado por Grimason et al. (1994), a maioria dos oocistos detectados nas amostras não apresentaram estruturas internas identificáveis. Isso vem reforçar que oocistos de origem ambiental com mais tempo de vida podem diferir de oocistos fecais recentemente eliminados, quanto à habilidade de manter-se intacto, e serem mais sujeitos a alterações físicas (SMITH et al., 2002).

A coloração pelo DAPI não depende diretamente da formação do complexo antígeno-anticorpo para permitir aferição do seu resultado, mas indiretamente devido à impossibilidade de ser avaliada isoladamente em análises com amostras de água pela grande variedade de estruturas apresentando a mesma cor, e portanto necessita da identificação prévia do oocisto pela imunofluorescência direta, desta forma a avaliação do seu desempenho está diretamente associada ao desempenho da técnica imunológica.

É de extrema relevância a utilização da imunofluorescência para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., considerando a especificidade do método. Enquanto a utilização de DAPI para a confirmação do diagnóstico é de fundamental importância, uma vez que torna a análise precisa, embora esta finalidade seja prejudicada quando os oocistos apresentam-se vazios, porém estes oocistos são indicativos de contaminação (SMITH, 1998).

Quanto às amostras de água tratada analisadas tanto pela coloração Kinyoun quanto pela técnica IFD/DAPI neste estudo se verificou que não apresentaram positividade, assim como atenderam às exigências da Portaria 518/MS (Brasil, 2004) no tocante a ausência de coliformes totais e termotolerantes, pH entre 6,21 e 7,7 (padrões: mín. 6,0 e máx. 9,5), no entanto, quanto a turbidez, cinco amostras apresentaram valores superiores ao recomendado variando de 1,76 a 2,9 UNT (padrão máximo: 1,0 UNT).

Em relação à ausência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de água tratada analisadas neste estudo mediante o uso da técnica IFD/DAPI, resultados semelhantes foram obtidos em São Paulo por Cantusio Neto & Franco (2004), quando analisaram amostras de água no sistema de tratamento, após a etapa de filtração. Considerando-se as taxas de eficiência de recuperação do método de detecção empregado no presente estudo, os resultados negativos nas amostras de água tratada não foram devido a metodologia usada, assim como foi demonstrado por Cantusio Neto & Franco (2004), quando obtiveram taxas de recuperação de 41,6% na água Milli-Q e 25,3% na água bruta artificial.

Vale salientar que as amostras de água bruta ou tratada que se apresentaram negativas quando analisadas pelo método de Kinyoun também foram negativas pela técnica IFD/DAPI, demonstrando assim que a coloração histoquímica não proporcionou resultados falso-negativos.

5.2.6 Conclusão

Conclui-se que oocistos de *Cryptosporidium* spp. ocorrem em águas de rio da Região Metropolitana de Recife, sendo este o primeiro relato de *Cryptosporidium* spp. em mananciais aquáticos de Pernambuco e do Nordeste. A técnica de imunofluorescência direta associada ao DAPI facilita uma melhor identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, no entanto a coloração histoquímica demonstrou ser útil como uma técnica triagem.

5.2.7 Referências Bibliográficas

ALDOM, JE; CHAGLA, AH. Recovery of *Cryptosporidium* spp. oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 186-187, 1995.

ALI, M.A.; AL-HERRAWY, A.Z.; EL-HAWAARY, S.E. Detection of enteric viruses, *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in two different types of drinking water treatment facilities. **Water Research**. v. 38, p. 3931- 3939, 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th. Ed. Baltimore, Maryland, USA, APHA, AWWA, WEF, 1998.

ATWILL, E. R.; HARP, J. A.; JONES, T.; JARDO, P.W.; CHECEL, S. Evaluation of periparturient dairy cows and contact surfaces as a reservoir of *Cryptosporidium*

parvum for calfhood infection. **American Journal Veterinary Research**, v. 59, p. 1116-1121, 1998.

BRAGA, R.A.P. (Coord.). **Gestão Ambiental da Bacia do Rio Tapacurá – Plano de Ação** / UFPE/CTG/DECIVIL/GRH. Ed. Universitária da UFPE, 2001, 101 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS – técnicas de diagnóstico**. Brasília/DF. 1996. 27p.

BRASIL. Portaria nº 1469 de 29 de Dezembro de 2000. **Regulamenta os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências**. Brasília, DF: MS/ ANVISA, 2000.

BRASIL. Portaria nº 518 de 25 de Março de 2004. **Regulamenta os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências**. Brasília, DF: MS/ ANVISA, 2004.

BRASIL. Resolução nº 357 de 17 de Março de 2005. **Regulamenta a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Brasília, DF: MMA/ CONAMA, 2005.

CANTUSIO-NETO, R.; FRANCO, R.M.B. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 118, p. 52-59, 2004.

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

FARIAS, E.W.C.; GAMBA, R.C.; PELLIZRI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.1, São Paulo. 2002.

FAYER, R.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, 2004.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp.: transmission, detection and identification. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.

FERREIRA, G.M.; BEVILACQUA, P.D.; BASTOS, R.K.X.; OLIVEIRA, A.A.; DIAS, F.M. Dinâmica de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em manancial de abastecimento de água para consumo humano, Viçosa – Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Epidemiologia, 6., 2004, Recife. Anais... Recife: ABRASCO, 2004. 1 CD – ROM.

FRANCO, R.M.B. & CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidial* oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 205-207, 2002.

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT,R.; CANUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts in raw water from Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 109-111, 2001.

FRASER, R.H.; BARTEN, P.K.; PINNEY, D.A.K. Predicting stream pathogen loading from livestock using a geographical information system-based delivery model. **Journal Environmental Quality**, v. 27, p. 935-945. 1998.

GAMBA, R.C., CIAPINA, E.M.P., ESPÍNDOLA, R.S., PACHECO, A., PELLIZARI, V.H., Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, S. Paulo – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.151 – 153, 2000.

GRACZYK, T. K.; EVANS, B.M.; SHIFF, C.J.; KARREMAN, H.J.; PATZ, J.A. Environmental and Geographical factors contributing to watershed contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Environmental Research**, section A, n. 82, p. 263-271. 2000.

GRACZYK, T. K.; FAYER, R.; CRANFIELD, M.R. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium parvum*: Implication for waterborne transmission. **Parasitology Today**, v. 13, p. 348-351. 1997.

GRIMASON, A.M.; SMITH, H.V.; PARKER, J.F.W.; BUKHARI, Z.; CAMPBELL, A.; ROBERTSON, L.J. Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples. **Water Research**, v. 28, p. 733-736, 1994.

GRIMASON, A.M.; CAMPBELL, B.M.; PATON, C.A.; NICHOLS, R.A.B. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in water concentrates determined by using 4',6' – Diamidino – 2 – Phenylindole and immunofluorescence microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5198-5201, 2002.

HANSEN, J.S., ONGERTH, J.E. Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2790-2795, 1991.

LeCHEVALLIER, MW; Lee, RG.; MOSER, R.H. Evaluation of current treatment practices for removal of waterborne parasites. 1990. In : GRIMASON, A.M.; SMITH, H.V.; PARKER, J.F.W.; BUKHARI, Z.; CAMPBELL, A.; ROBERTSON, L.J. Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples. **Water Research**, v. 28, p. 733-736, 1994.

LeCHEVALLIER, MW; NORTON, WD; Lee, RG. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 57, n. 9, p. 2610-2616, Sept. 1991a.

LeCHEVALLIER, MW, NORTON, WD, LEE, RG. *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 57, n. 9, p. 2617-2621, 1991b.

LIMA, E.C.; MELO, V.S.P.; BRITO, F.L.C.; ALVES, L.C.; STAMFORD, T.L.M. Avaliação de diferentes técnicas de coloração histoquímica na identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água e leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n. 1/2, p. 21-26, 2004.

LUNA, S.; LILIANA REES, L.; MISAEEL CHINCHILLA; et al. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. spp. en aguas superficiales en Costa Rica. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 57, p. 63-65, 2002.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KARSMERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B.; DAVIS, J.P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* spp. infection transmitted through the public water supply. **National England Journal of Medicine**, v. 33, p. 161-167, 1994.

MADORE, MS, ROSE, JB, GERBA, CP, ARROWOOD, MJ, STERLING, CR. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in sewage effluents and selected surface waters. **The Journal of Parasitology**, v. 73, n.4, p. 702-705, 1987.

MEDEMA, G.J., SCHETS, F.M., TEUNIS, P.F.M., HAVELAAR, H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 64, n. 11, p. 4460-4466, 1998.

MONGE, R., CHINCHILLA, M., REYES, L., Estacionalidade de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v.44, n.2, p. 369-375, 1996.

MULLER, A.P.B. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo. **Dissertação** (Mestrado em Ciências – área de Microbiologia). USP: São Paulo, 1999, 107p.

MYODA, S.P.; HUANG, C.P. A microscope system with a dual-band filter for the simultaneous enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts and sporozoites. **Water Research**, v. 35, n. 17, p. 4231-4236, 2001.

SANFORD, S.A.; JOPSEHSON, G.K.A. Bovine cryptosporidiosis clinical and pathological findings in forty- two scouring neonatal calves. **Canadian Veterinary Journal**, v. 23, p. 243-247, 1982.

SANTOS, L.U.; BONATTI, T.R.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R.M.B. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 6, p. 309-313, 2004.

SCOTT, C.A.; SMITH, H.V.; GIBBS, H.A. Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckle cows. **Veterinary Research**, v. 134, p. 172-175. 1994.

SMITH, H.V.; McDIARMID, A.; SMITH, A.L.; HINSON, A.R.; GILMOUR, R.A. An analysis of staining methods for the detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in water-related samples. **Parasitology**, v. 99, p. 323-327, 1989.

SMITH, H.V. Detection of parasites in the environmental. **Parasitology**, v. 117, p. S 113-141, 1998.

SMITH, H.V.; CAMPBELL, B.M.; PATON, C.A.; NICHOLS, R.A.B. Significance of Enhanced Morphological Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in Water Concentrates Determined by Using 4',6' -Diamidino-2-Phenylindole and Immunofluorescence Microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 10, p. 5198- 5201, 2002.

SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Waterborne cryptosporidiosis, current status. **Parasitology Today**, v. 14, p. 14-22. 1998.

TSUSHIMA, Y., KARANIS, P., KAMADA, T., MAKALA, L., XUAN, X., TOHYA, Y., AKASHI, H., NAGASAWA, H., Seasonal change in the number of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water samples from the rivers in Hokkaido, Japan, detected by the ferric sulfate flocculation method. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 1, p.121-123, 2003.

UNITED STATES/ ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA).
Method 1622; *Cryptosporidium* in water by filtration/ IMS/ FA. Office of Water.
EPA-821-R-99-061. 2001. 51p.

WATANABE, YUKO; KIMURA, KENJI; YANG, CHENG-HSIUNG, OOI HONG-KEAN. Detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts and *Giardia* sp. Cysts in faucet water samples from cattle and goat farms in Taiwan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 12, p. 1285 – 1287, 2005.

WIDMER, G. Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. **Advanced Parasitology**, v. 40, p. 223-239, 1998.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* spp. taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Review**, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.

YANG, S.; HEALEY, M.C.; DU, C. Infectivity of preserved *Cryptosporidium parvum* oocysts for immunosuppressed adult mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.13, p. 141-145. 1996.

5.3 TRABALHO CIENTÍFICO III: AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. e *Cryptosporidium parvum* EM AMOSTRAS FECAIS

5.3.1 Resumo

A criptosporidiose é uma doença causada pelo *Cryptosporidium* spp., protozoário patogênico e emergente, responsável por diarreia severa, principalmente em pacientes imunodeprimidos. Vários surtos já foram descritos em humanos associados à ingestão de água contaminada e ao contato direto com animais. Métodos de detecção com maior sensibilidade vêm sendo avaliados, dentre eles a reação em cadeia da polimerase (PCR). Este trabalho tem como objetivo a avaliação dos métodos de extração do DNA deste parasito e sua detecção a partir de reações de PCR com a utilização de iniciadores gênero e espécie - específicos. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras fecais humanas preservadas foram quantificados sem purificação ou após a purificação pela técnica de flutuação. O DNA foi extraído após as reações com proteinase K e solução de lise, com exposição dos oocistos ao congelamento e descongelamento. A partir do DNA extraído os primers CPB-DIAGF/CPB-DIAGH e HB-1/HB-2 foram usados para a amplificação dos genes 18S ribossomal (*Cryptosporidium* spp.) e COWP (proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium parvum*), cujos produtos amplificados é de 435pb e 358pb respectivamente. Os produtos da PCR foram obtidos apenas com o uso dos primers CPB-DIAGF/CPB-DIAGH, sendo o melhor perfil de amplificação observado quando 10^5 oocistos foram usados para a extração do DNA, e após o emprego dos protocolos de extração e de amplificação modificados. Conclui-se que as técnicas de extração e

amplificação avaliadas neste estudo podem ser usadas para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras com elevado número de oocistos.

5.3.2 Abstract

Cryptosporidiosis is a disease caused by *Cryptosporidium* spp., a pathogenic and emergent protozoa responsible for severe diarrhea, mainly in immunocompromised patients. Some outbreaks have already been reported in human being associated with the ingestion of contaminated water and direct contact with animals. More sensible detection methods such as Polymerase Chain Reaction have been evaluated. This work aimed evaluate the DNA extraction method for this parasite and also its detection from PCR reactions by using genus and species-specific starters. *Cryptosporidium* spp. oocysts obtained from human fecal samples were quantified either without further purification or after its purification through the centrifugal-flotation method. The DNA was extracted with proteinase K and lysis buffer, and exposing the oocysts to a freezing/thawing process. After the DNA extraction, the primers CPB-DIAGF/CPB-DIAGR and HB-1/HB-2 were used for the amplification of the genes 18S ribossomal (*Cryptosporidium* spp.) e COWP (*Cryptosporidium parvum* oocyst wall protein), which amplification products were 435bp and 358bp, respectively. The PCR products were obtained only when were used the primers CPB-DIAGF/CPB-DIAGR, with the best amplification result observed when 10^5 oocysts were used for DNA extraction, and after using the modified extraction and amplification protocols. In conclusion, the extraction and amplification techniques evaluated in this study can be used for *Cryptosporidium* spp. oocysts detection in samples with high number of oocysts.

5.3.3 Introdução

Dentre as parasitoses emergentes de importância humana, a criptosporidiose vem se tornando uma doença de grande importância para a saúde pública (MARKELL et al., 2003). Esta doença é causada pelo protozoário do gênero *Cryptosporidium* spp. (coccídeo, Apicomplexa), parasita oportunista que apresenta caráter zoonótico e possui amplo espectro de hospedeiros incluindo o homem (SMITH, 1998). Existem treze espécies de *Cryptosporidium* spp. atualmente reconhecidas: *C. muris*, *C. andersoni*, *C. parvum*, *C. hominis*, *C. wrairi*, *C. felis*, *C. canis* em mamíferos; *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. galli* em pássaros; *C. serpentis*, *C. saurophilum* em répteis; e *C. molnari* em peixes (XIAO et al., 2004), porém considera-se que oito espécies podem infectar o homem, *C. hominis* (antes reconhecida como genótipo 1 de *C. parvum*), *C. parvum*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, e os genótipos cervine e pig (XIAO et al., 2004).

Segundo Baraldi et al. (1999), a criptosporidiose é transmitida através da rota fecal-oral, e diversos surtos de criptosporidiose já foram descritos em seres humanos, geralmente associados à ingestão de água contaminada ou pelo contato direto com animais (PENG et al., 1997). Muller (1999) ressalta que 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 com o intuito de assegurar a qualidade de água, pois a ausência de uma metodologia padronizada para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no meio ambiente dificulta a viabilização de um monitoramento ou pesquisa deste patógeno. Métodos moleculares têm sido aplicados para amostras ambientais na tentativa de otimizar os processos de detecção deste parasito, tornando-os mais rápidos e sensíveis como, por

exemplo, a técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase - PCR (LAXER et al., 1991; JOHNSON et al. 1995; MAYER & PALMER, 1996).

Há vários protocolos de extração e de amplificação do DNA de *Cryptosporidium* spp., sejam os oocistos purificados ou não e provenientes de diversas amostras (fecal, leite e ambiente). Conseqüentemente a sensibilidade da análise varia de acordo com o método usado, uma vez que pode ser influenciada por vários fatores, sejam eles inerentes ao parasito, amostra ou ao próprio protocolo (JOHNSON et al., 1995; ROCHELLE et al., 1997).

Devido às dificuldades de extração do DNA de *Cryptosporidium* spp. em quantidade e qualidade suficientes para a sua amplificação, e a inexistência de um método de extração padronizado, diferentes protocolos vêm sendo testados. Dentre os protocolos mais simples podem ser citados aqueles que submetem os oocistos à fervura a 100°C por 20 minutos em tampão de PCR ou aquecem os oocistos em tampão de PCR a 90°C por 20 minutos para posterior incubação com proteinase K a 55°C por 3 horas (WU et al., 2000). Outros protocolos ressuspendem os oocistos em proteinase K para incubação e posterior adição de tampão de lise com Tris-HCl, NaCl e SDS (MAYER & PALMER, 1996) ou prévia incubação em tampão de lise contendo Tris-HCl e EDTA para posterior incubação em SDS e proteinase K para digestão (LAXER et al., 1991). Outros acrescentam no tampão de lise o sarcosyl (LABERGE et al., 1996) ou β -mercaptoetanol (ALMEIDA, 2004). Observa-se ainda a suspensão dos oocistos em chelex-100 (JOHNSON et al., 1995). Para reforçar o processo de quebra mecânica dos oocistos, em seguida a estes procedimentos, emprega-se o choque térmico utilizando nitrogênio líquido ou banho de etanol gelado para o congelamento, e o banho-maria para descongelamento. Esses protocolos geralmente são acompanhados pela purificação do DNA mediante o uso de fenol-clorofórmio-isoamyl.

Protocolos de extração mais complexos fazem uso de tiocianato de guanidina em Tris-HCl, EDTA e Triton-X – 100 e pérolas de zirconia (PATEL et al., 1999), isotiocianato de guanidina e pérolas de vidro (Stratech, Scientific, Luton, UK) e sílica (ENEMARK et al., 2002). Porém protocolos mais sofisticados com uso de kits tanto para a extração como para a purificação de DNA têm sido avaliados, a exemplo com PBS-EDTA e extração com FastPrep e FastDNA kit (BORNAY-LLINARES et al., 1999), FastDNA kit e QIAquick PCR purification kit (DA SILVA et al., 1999; SCORZA et al., 2003), QIAamp DNA mini isolate colluns (XIAO et al., 2001), além de kit para separação imunomagnética (Dynabeads anti-*Cryptosporidium* spp., Dynal A.S., Oslo, Norway) para remover contaminantes para posterior incubação com proteinase K (WU et al., 2000).

Considerando que no ambiente aquático podem ocorrer diversas espécies de *Cryptosporidium* spp. e que o risco de infecção pela população humana estão mais freqüentemente associados ao *C. parvum*, além de que não existem métodos padronizados de extração e de amplificação do DNA do parasito, nesse estudo dois pares de primers, gênero e espécie - específicos, foram usados para avaliação da técnica de PCR a partir da pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. spp. e *C. parvum* em amostras fecais naturalmente contaminadas.

5.3.4. Material e Métodos

5.3.4.1 Oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram obtidos a partir de amostras fecais humanas, gentilmente cedidas pelo Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE).

5.3.4.2 Concentração e quantificação dos oocistos na amostra fecal

Para a concentração dos oocistos na amostra utilizou-se o método de formol-éter (BRASIL, 1996). A conservação do conteúdo final foi realizada acrescentando-se formol (10%) até atingir o volume de 1ml. Deste volume alíquotas de 5µl do sedimento foram usados para a confecção de esfregaços em lâminas.

A coloração das lâminas foi feita pela técnica de Kinyoun (BRASIL, 1996), e a leitura foi realizada mediante uso de microscópio óptico com objetiva de imersão (40X) percorrendo-se todo o campo (OLIVEIRA & GERMANO, 1992) e observando-se a característica dos oocistos referente à forma, cor e estruturas internas (LIMA, 2001). O cálculo do número de oocistos na amostra (X) se baseou em Cantusio Neto & Franco (2004) como descrito abaixo:

$$X = \frac{\text{Nº médio de oocistos}}{\text{Volume do sedimento analisado } (\mu\text{l})} \times \frac{\text{Volume do sedimento } (\mu\text{l})}{\text{Volume da amostra } (\mu\text{l})}$$

5.3.4.3 Purificação dos oocistos nas amostras fecais

Em algumas amostras previamente concentradas pelo formol-éter, realizou-se uma purificação por centrífugo-flutuação com solução saturada de cloreto de sódio (1,2 g.mL⁻¹) utilizando cateter (16 G) e seringa (60 ml), após a ressuspensão das amostras com a solução de eluição (Dodecil Sulfato de Sódio-SDS - 0,1%; Tween-80 0,1%; Solução Tampão Salina Fosfato -PBS; pH 7,4) (Figura 1).

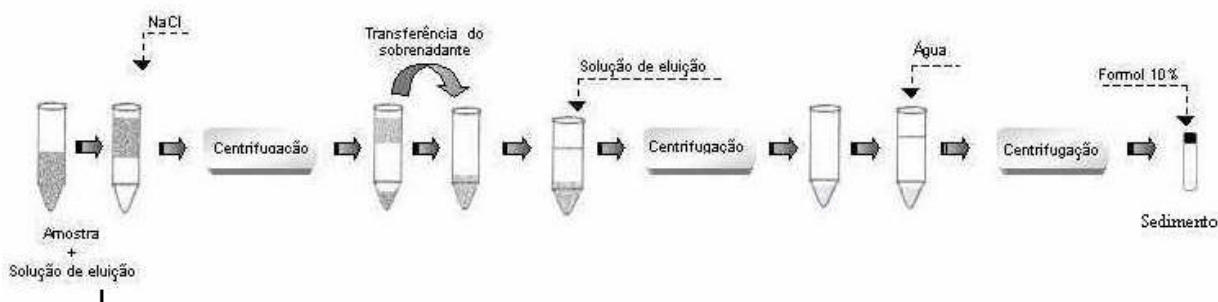


Figura 1. Desenho esquemático das etapas da purificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por flutuação.

5.3.4.4 Extração do DNA

Para o isolamento do DNA genômico dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram testados diversos protocolos descritos na literatura (LABERGE et al., 1996; JOHNSON et al., 1995; ALMEIDA, 2004; WU et al., 2000; PATEL et al., 1999) eliminando-se, sempre, o uso de kits para qualquer etapa da extração. Aqui estão descritos apenas os protocolos que apresentaram resultados positivos, realizados da seguinte forma: hipoclorito de sódio (6%) foi adicionado ao volume contendo os oocistos até a aferição de 700µl, e a mistura foi mantida em gelo por 10 minutos (homogeneizando em vortex a cada 1 minuto). As amostras foram centrifugadas por 12.000 $\times g$ durante 5 minutos em temperatura ambiente, desprezando-se o sobrenadante após a centrifugação. Em seguida, a lavagem dos oocistos foi realizada com 700µl de solução tampão PCR (10mM Tris pH 8,3; 50mM KCl; 3,5 mM MgCl₂) em três repetições (KOTRZYNSKA et al., 1999).

O material foi submetido à digestão enzimática com 250µl de proteinase K (20 mg ml⁻¹ em NaCl 0,15M) e incubado em banho-maria a 65°C por um período de

duas horas para a digestão da amostra. Em seguida se adicionou 250 µl da solução de lise contendo SDS (10%), NaCl (100mM) e Tris (500mM, pH 7,5) conforme Mayer & Palmer (1996), para lise celular por cinco ciclos de congelamento (nitrogênio líquido por dois minutos) e descongelamento (banho-maria a 65°C por 5 minutos). Posteriormente, acrescentou-se 500 µl de clorofane (mistura 25:24:1 de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico) e os tubos foram agitados em vortex por dois minutos. Após centrifugação a fase aquosa foi transferida para novos tubos e o DNA extraído com 500µl de clorofil (24:1 de clorofórmio-isoamil). Para a precipitação do DNA a fase aquosa foi misturada com 0,6 volumes de álcool isopropanol e incubada por 60 minutos a -20°C. Após nova centrifugação, o sedimento foi lavado com álcool etílico a 70%, e o produto final foi ressuspendido em água estéril.

5.3.4.5 Extração do DNA modificada

Em algumas amostras fecais a extração do DNA foi feita a partir de algumas modificações do protocolo original pelo uso de acetato de sódio (3M) previamente à adição de clorofane, e a substituição de clorofane por brazol (LGC Ltda, Brasil).

5.3.4.6 Amplificação por PCR e eletroforese do DNA

Para a amplificação do DNA do *Cryptosporidium* spp. foram avaliados dois pares de primers. O primeiro para amplificar uma seqüência de 358 pb do gene COWP que codifica uma proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium parvum* a partir do uso dos primers HB-1 (forward: 5' - GCCCACCTGGATATACACTTT - 3' que corresponde a seqüências de nucleotídeos na posição 527-548) e HB-2 (reverse: 5' -

TCCCCCTCTCTAGTACCAACAGGA- 3') que corresponde a seqüências de nucleotídeos na posição 861-884, e amplificam uma seqüência de 358 pb (pares de base) do gene COWP (proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium* spp.) (LABERGE et al., 1996). O segundo amplifica uma seqüência de 435 pb do gene 18S ribossomal a partir dos primers CPB-DIAGF (forward: 5' - AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG- 3') que corresponde a seqüências de nucleotídeos na posição 601 – 621 e CPB-DIAGR (reverse: 5' - TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG - 3'), que corresponde a seqüências de nucleotídeos na posição 1015 – 1035 (JOHNSON et al., 1995).

Na reação de PCR, para 25µl da mistura no volume final, foi usado tampão Taq (1x), 0,2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0,08 µM de cada primer, 1µl de DNA (concentração desconhecida) e 1U de Taq. DNA polimerase, em 40 ciclos (94°C por 1 min. para desnaturação, 45°C por 1 min. para anelamento, 72°C por 1 min. para alongamento e 72°C por 2 min. para a extensão final). As corridas eletroforéticas das amplificações foram realizadas em gel de agarose 1,3% em tampão TAE (0,04 M Tris acetato; 0,001 M EDTA pH 8,0) por 1h e 30 min. a 70 Volts. A observação das bandas foi feita após coloração com brometo de etídio (0,2 µg/ml) e posterior análise em um transluminador de Ultra Violeta. Para a comparação dos fragmentos da amplificação utilizou-se marcador molecular ladder - 100 pb.

5.3.4.7 Modificação da amplificação

Em algumas amostras de DNA extraído a amplificação foi feita a partir de algumas modificações do protocolo original pelo aumento da concentração dos primers (0,16 µM) e da Taq. polimerase (2 U).

5.3.5 Resultados e Discussão

Os produtos de PCR detectados no gel a partir do uso do protocolo original de extração e amplificação de DNA de *Cryptosporidium* spp. podem ser verificados na Figura 2. Em amostras com 50×10^3 oocistos por reação e utilizando 1 μ l e 5 μ l de amostra de DNA para amplificação, foi possível a visualização de fragmentos amplificados no gel, referente ao uso dos primers CPB-DIAGF (forward) e CPB-DIAGR (reverse), enquanto não se verificou amplificação de DNA com os primers HB-1 e HB-2 (Figura 2).

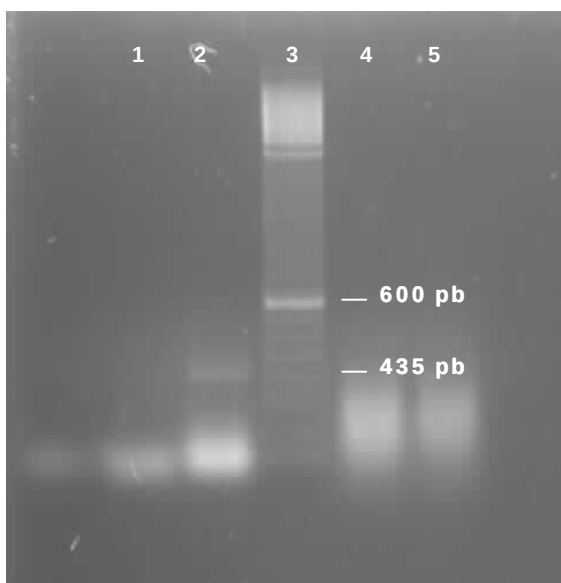


Figura 2 – Perfis da amplificação de amostras do DNA (5 μ l) de oocistos de *Cryptosporidium* spp. a partir de 5×10^3 oocistos (poços 2 e 5), e de 10^4 oocistos (poços 1 e 4), observando nos poços 1 e 2 a utilização dos primers CPB-DIAGF (forward) e CPB-DIAGR (reverse), no poço 3 o marcador molecular 100pb ladder e nos poços 4 e 5 o uso de primers HB-1 e HB-2.

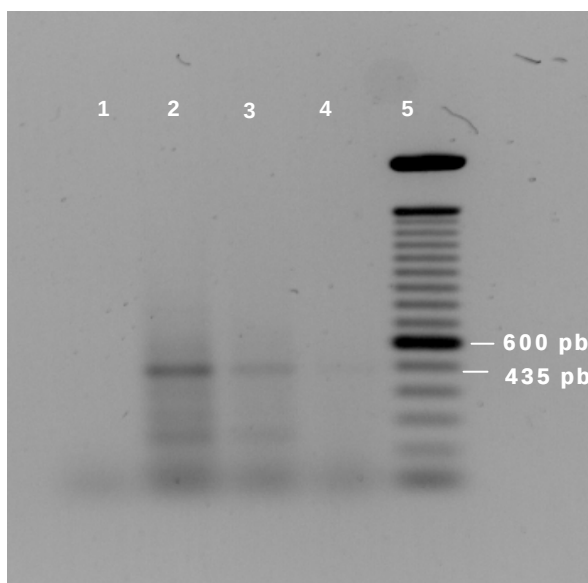


Figura 3 - Perfis da amplificação de amostras do DNA de oocistos de *Cryptosporidium* spp. a partir de 10^5 oocistos, onde o poço 1 mostra o resultado da extração e amplificação com protocolos originais; o poço 2 com primer (0,16 μ M) e Taq (2U); no poço 3 com Taq (2U); o poço 4 com MgCl₂ (3,0 mM) e no poço 5 com marcador molecular 100pb ladder.

A partir do uso de outros protocolos para extração e amplificação do DNA de *Cryptosporidium* spp., alterando-se a concentração e/ou substituição de reagentes, além do número de oocistos, volume da amostra e alterações de temperaturas de

anelamento para avaliar influências na reação, outros resultados foram obtidos, mas somente após o uso dos protocolos de extração e amplificação modificados, e com DNA extraído de 10^5 oocistos (Figura 3). A partir destes resultados foi possível observar um melhor perfil da amplificação devido a maior concentração dos primers e da Taq polimerase. O uso destes protocolos diante de um menor número de oocistos (5000 e 10000) por reação não possibilitaram resultados positivos (dados não mostrados).

No desenvolvimento de uma técnica de PCR para identificar *Cryptosporidium* spp. de amostras clínicas e ambientais, algumas etapas são críticas incluindo o número de oocistos, para assegurar a sensibilidade do diagnóstico, a lise da parede de oocisto e a incorporação de um protocolo para prevenir contaminantes, principalmente considerando que amostras orgânicas como fezes, água e solo podem conter inibidores que reduzem a sensibilidade da PCR em até 1000 vezes (JOHNSON et al., 1995).

A variação do limite de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. é comumente observada na literatura (LENG et al., 1996; PATEL et al., 1999; HAJDUSEK et al., 2004). Quando o mesmo protocolo de amplificação foi empregado para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de leite (LABERGE et al., 1996) e água (CHUNG et al. 1998), o limite de detecção foi semelhante, com o número de oocistos variando de 1 a 10 por 20ml ou por reação, respectivamente, apesar de serem usados protocolos de extração de DNA diferentes. No entanto Kotrzynska et al. (1999) comentam que apenas foi possível detectar produtos de PCR a partir de 10^5 oocistos por ml para a extração de DNA tanto em amostras fecais como em amostras de água, porém com a nested PCR este limite baixou para 10^3 oocistos por ml. Por outro lado, Almeida (2004) utilizou uma modificação do *nested*-PCR, que resultou na detecção do parasita a partir de 10^4 oocistos. O autor comentou que a quantidade de

DNA extraído não influenciou os resultados. Entretanto, pequenas quantidades como 7,0 µg/ml e 9,9 µg/ml foram positivas, enquanto grandes quantidades como 693,4 µg/ml foram negativas. Isto mostra que o excesso de DNA pode ser prejudicial à amplificação.

Os resultados apresentados neste trabalho divergiram daqueles obtidos por Gomes (2003) e Araújo (2004), que obtiveram resultados satisfatórios, muito certamente favorecidos pela utilização de kits nos protocolos utilizados para extração (Fast DNA *kit* – BIO 101, Inc., Santa Clarita, CA) e purificação de DNA (QIA quick PCR purification *kit* - Qiagen. Inc., Santa Clarita, CA). Entretanto, as observações deste trabalho se assemelharam às aquelas apresentadas por Almeida (2004), que obteve resultados a partir de protocolos simples, viável e de baixo custo, porém com baixa reprodutibilidade. Vale ressaltar ainda que Gomes (2003) e Araújo (2004) encontraram dificuldades na obtenção de produtos da PCR simples, sendo o resultado positivo apenas com o uso da *nested*-PCR.

Considerando a possibilidade da presença de substâncias inibidoras da PCR, Leng et al. (1995) comentam sobre a variação individual entre amostras fecais, e nesse estudo as suspensões fecais com oocistos padrões foram oriundas de diferentes indivíduos, além de que estavam conservadas em formol a 10%. Porém há divergências na literatura quanto à interferência desse conservante nas reações de PCR (JOHNSON et al., 1995; ROCHELLE et al., 1997; PATEL et al., 1999). Vale ressaltar que tentativas de análises realizadas neste estudo a partir de oocistos conservados em dicromato de potássio 2,5%, que segundo JOHNSON et al. (1995) pode ser facilmente eliminado da reação após os processos de lavagens diferentemente do formol, ou de oocistos apenas congelados a -20°C, assim como após a sua purificação por centrífugo-flutuação, não resultaram em produtos de PCR. Uma outra possibilidade de falha na detecção do parasita pode estar relacionada à qualidade do DNA extraído. O emprego da resina

Chelex-100 sugerida por Johnson et al. (1995), não resultou em ampliações, diferindo dos resultados do autor. A explicação para isto pode estar relacionada com a separação imunomagnética dos oocistos, com remoção completa dos inibidores de reação. Nem o uso de β -mercaptoetanol, e nem a adição de tiocianato de guanidina tiveram influência positiva sobre as nossas análises, contrariando dados da literatura (ALMEIDA 2004; PATEL et al. 1999). Substituindo-se a solução de lise (NaCl 120mM, EDTA 10 mM e Tris 25 mM, pH 7,25) contendo sarcosyl 1% e uso de menor concentração de proteinase K (0,6mg/ml) conforme descrito em Laberge et al. (1996) foi outra tentativa sem resultados. No entanto, a detecção de 1 a 10 cistos só foi possível no trabalho de Laberge et al. (1996) após a hibridização com sondas internas de oligonucleotídeos. Tentativas para a extração do DNA apenas por aquecimento dos oocistos foram realizadas conforme as sugestões de Wu et al. (2000), quando avaliaram sete pares de primers na detecção de *C. parvum*, porém diferentemente, não geraram resultados positivos no presente estudo, no entanto estes pesquisadores usaram oocistos purificados por separação imunomagnética.

No que se refere à importância da purificação dos oocistos para evitar ou reduzir inibidores de reação, os resultados do presente trabalho foram diferentes das observações de Sargent et al. (1998); Morgan et al. (1997) e de Almeida (2004), quando avaliaram a PCR para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. ou *C. parvum* em amostras fecais humanas e animais. Estes autores obtiveram resultados positivos, porém usando protocolos de extração e amplificação diferentes. Considerando que a flutuação dos oocistos neste estudo foi usada para reforçar a purificação das amostras concentradas pelo formol-éter, com o intuito de obter amostras fecais com uma menor quantidade de resíduos, e que resultados negativos também foram obtidos a partir das amostras não submetidas a centrífugo-flutuação não se pode subestimar a técnica utilizada.

Referindo-se as particularidades dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., acredita-se que a resistência da parede do oocisto reflete na dificuldade de liberação do seu conteúdo interno (REDUKER et al. 1985a), pela resistência à ruptura mecânica (HARRIS & PETRY, 1999) de forma que para a eliminação deste conteúdo a parede deve ser completamente removida. Considerando os esforços para contornar esta dificuldade, uma vez que diversos procedimentos foram usados para a extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. neste estudo. Os resultados deste estudo são discordantes das observações de Harris e Petry (1999), quando descrevem que a parede dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. não é totalmente solúvel em SDS 2% com 10% de β -mercaptoetanol. No presente trabalho, mesmo na ausência de β -mercaptoetanol, produtos de PCR foram obtidos. Isto pode ter sido verificado pelo tratamento prévio dos oocistos com hipoclorito de sódio, que segundo Reduker et al. (1985b) remove parcialmente a camada glicoprotéica externa do oocisto, e desta forma fragiliza o parasito antes da etapa de digestão. Vale salientar que a digestão dos oocistos neste estudo foi realizada com proteinase K, concordando com Harris & Petry (1999), que relatam uma grande depleção dos filamentos da camada interna do oocisto na etapa de digestão com proteinase K ou tripsina, enquanto a pepsina proporcionou menor efeito. Desta forma, a grande ocorrência de resultados negativos neste estudo sugere que isso pode ter sido influenciado por outros fatores. De acordo com Leng et al. (1995), também foi evidenciado que o emprego de um protocolo longo de extração de DNA pode resultar em grande ocorrência de falso-negativos, semelhante à forma realizada neste trabalho. Assim como a degradação do DNA durante a estocagem, ou ausência do DNA alvo (SCORZA et al., 2003).

5.3.6 Conclusão

As técnicas de extração e amplificação avaliadas nesse estudo podem ser usadas para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. spp. em amostras com elevado número de oocistos.

5.3.7 Referências bibliográficas

ALMEIDA, T. T. C. Padronização e avaliação de métodos moleculares para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase). 2004. 130f. **Tese** (Doutorado em Saúde Pública – área de Prática em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública, USP, São Paulo, 2004.

ARAÚJO, A.J.U.S. Estudo da ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) entre crianças do município de Taubaté-SP e caracterização genotípica de isolados clínicos do parasita. São Paulo, 2004. **Tese**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USPJ.

BARALDI, S.R.; MARQUE, E.G.L.; DIAS, R.M.D.S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n.1, p. 97-103, 1999.

BORNAY-LLINARES, F.J.; DA SILVA, A.J.; MOURA, I.N.S., MYJAC, P.; PIETKIEWICZ, H.; KRUMINIS-LOZOWSKA, W.; et al. Identification of

Cryptosporidium felis in a cow by morphology and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1455-1458, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS – técnicas de diagnóstico. Brasília/DF**. 1999, 27p.

CANTUSIO-NETO, R.; FRANCO, R.M.B. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia spp.* em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 118, p. 52-59, 2004.

CHUNG, E.; ALDOM, J.E.; CHAGLA, A.H.; KOSTRZYNSKA, M.; Lee, H.; PALMATEER, G.; TREVORS, J.T.; UNGER, S.; De GRANDIS, S. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in municipal water samples by the polymerase chain. **Journal of microbiological Methods**, v. 33, p.171-180, 1998.

DA SILVA, A.J.; BORNAY-LINARES, F.J.; MOURA, I.N.S.; SLEMENDA, S.B.; TUTTLE, J.L.; PIENIAZEK, N.J. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. **Molecular Diagnostic**, v. 4, n. 1, p. 57-64, 1999.

ENEMARK, H.L.; AHRENS, P.; JUEL, C.D.; PETERSEN, R.F.; ANDERSEN, J.S., LIND P.; THAMBORG, Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. **Parasitology**, v. 125, p. 331-341, 2002.

GOMES, A.H. Estudo comparativo entre métodos morfológico, imunológico e molecular aplicados ao diagnóstico da criptosporidiose em amostras fecais de pacientes

portadores do vírus HIV e AIDS. São Paulo. 2003. **Dissertação**. Instituto de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde.

HAJDUSEK, O.; DITRICH, O.; JAN SLAPETA. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 183-192, 2004.

HARRIS, J. R.; PETRY F. *Cryptosporidium* spp. *parvum*: structural components of the oocyst wall. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 839-849, 1999..

JOHNSON, D.W.; PIENIAZEK; GRIFFIN, D.W.; MISENER, L.; ROSE, J.B. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, Nov., p. 3849-3855, 1995.

KOSTRZYNSKA, M.; SANKEY, M.; HAACK, E.; POWER, C.; ALDOM, J.E.; CHAGLA, A.H.; UNGER, S.; PALMATEER, G.; LEE, H.; TREVORS, J.T.; DE GRANDIS, S.A. Three sample preparation protocols for polymerase chain reaction based detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 35, p. 65-71, 1999.

LABERGE, I.; IBRAHIM, A.; BARTA, J.R.; GRIFFITHS, M.W. Detection of *Cryptosporidium parvum* in raw milk by PCR and oligonucleotide probe hybridization **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 62, n. 9, p. 3259-3264, 1996.

LAXER, M. A.; TIMBLIN, B.K.; PATEL, R.J. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 45, p. 688-694, 1991.

LIMA, E. C. Métodos de detecção e enumeração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água e leite. 2001, 62p. **Dissertação** (Mestrado em Nutrição – área de Ciência de Alimentos). UFPE / Recife-PE, 2001.

LENG, X.; MOSIER, D.A.; OBERST, R.D., Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* spp. DNA from bovine feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 643-647, 1995.

MARKELL, E.K.; VOGEL, M.; JOHN, D.T. Markell & Vogt. **Parasitologia Médica**, 8^o ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan. 2003.

MAYER, C. L.; PALMER, C.J. Evaluation of PCR, and Fluorescent Antibodies for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. Species in Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2081-2085, 1996.

MORGAN, U.M.; CONSTANTINE, C.C.; FORBES, D.A.; THOMPSON, R.C.A. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 5, p. 825-830, 1997.

MULER. A. P. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da Região Metropolitana de São Paulo. 107f.

Dissertação (Mestrado em Ciências - área de Microbiologia). Universidade de São Paulo. São Paulo. 1999.

OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo – SP, Brasil – I / Pesquisa de Helmintos. In: OLIVEIRA, C.A.F., GERMANO, P.M.L. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo – SP, Brasil – II / Pesquisa de protozoários intestinais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo/SP, v. 26, n. 5, p. 332-335, 1992.

PATEL, S.; PEDRAZA-DIAS, S.; MCLAUCHLIN J. The identification of *Cryptosporidium* spp. species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* spp. outer wall protein (COWP) gene. **International Journal for Parasitology**, v.29, p. 1241-1247, 1999.

PENG, M.M.; XIAO, L.; FREEMAN, A.R.; ARROWOOD, M.J.; ESCALANTE, A.A.; WELTMAN, A.C. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 567-573, 1997.

ROCHELLE, P.A.; DE LEON, R.; STEWART, M.H.; WOLFE, R. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum*

and *Giardia lamblia* in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.106-114, 1997.

REDUKER, D. W.; SPEER, C.A.; BLIXT, J.A. Ultrastructural change in the oocyst wall during excystation of *Cryptosporidium* spp. *parvum* (Apicomplexa; Eucoccidiorida). **Canadian Journal of Zoology**, v. 63, p. 1892-1896, 1985a.

REDUKER, D. W.; SPEER, C.A.; BLIXT, J.A. Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. **Journal of Protozoology**, v. 32, p. 708-711, 1985b.

SARGENT, K.D.; MORGAN, U.M.; ELLIOT, A.; ANDREW THOMPSON, R.C. Morphological and genetic characterization of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 221-227, 1998.

SCORZA, A.V.; BREWER M.M.; LAPPIN M.R. Polymerase Chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. In cat feces. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 423-426, 2003.

SMITH, H.V. Detection of parasites in the environment. **Parasitology**, v. 117, p. S113-141, 1998.

XIAO, L.; LIMOR, J.R.; MORGAN, U.M.; SULAIMAN I.M.; THOMPSON, R.C.A.; LAL, A.A. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall

protein gene of *Cryptosporidium* spp. parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5499-5502, 2001.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* spp. taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Review**, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.

WU, Z.; NAGANO, I.; MATSUO, A.; UGA, S.; KIMATA, I.; ISEKI, M.; TAKAHASHI, Y. Specific PCR primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitive. **Molecular and Cellular Probes**, v. 14, p. 33-39, 2000.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- a) a técnica de purificação a partir de um número elevado de oocistos influencia os percentuais de recuperação, resultando em ampla variação, sendo os oocistos purificados essencialmente livres de resíduos.
- b) oocistos de *Cryptosporidium* spp. ocorrem em águas de rio da Região Metropolitana de Recife, sendo este o primeiro relato de *Cryptosporidium* spp. em mananciais aquáticos de Pernambuco e do Nordeste.
- c) a técnica de imunofluorescência direta associada ao DAPI permite uma melhor identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, no entanto a coloração histoquímica demonstrou ser útil como uma técnica de triagem.
- d) as técnicas de extração e amplificação de DNA podem ser usadas para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em amostras com elevado número de oocistos.

7. APÊNDICES

7.1 Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas e do número de estruturas álcool-ácido resistentes semelhantes aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de água do Rio Tapacurá no período seco e chuvoso

Período	Amostras	Parâmetros Físico-Químicos		Parâmetro microbiológicos		Número de like oocistos/l
		pH	Turbidez (UNT)	Colif. Totais (NMP/100ml)	Colif. Fecais (NMP/100ml)	
Seco	1	7,8	16,8	$4,0 \times 10^1$	0	76
	2	8,54	17	0	0	100
	3	7,94	9,6	0	0	4
	4	9,0	8,2	$2,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	80
	5	8,89	12,7	$2,2 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$	0
	6	8,18	12,3	$4,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	88
Chuvoso	7	7,9	13,8	$9,0 \times 10^1$	0	550
	8	8,02	5,95	$4,0 \times 10^1$	0	2400
	9	8	12,5	$9,0 \times 10^1$	0	2100
	10	7,5	5,5	$4,0 \times 10^1$	0	1900
	11	7,48	3,46	$9,0 \times 10^1$	0	650
	12	8,0	3,7	$9,0 \times 10^1$	0	600

7.2 Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas e do número de estruturas álcool-ácido resistentes semelhantes aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de água do Rio Duas Unas no período seco e chuvoso

Período	Amostras	Parâmetros Físico-Químicos		Parâmetro microbiológicos		Número de like oocistos/l
		pH	Turbidez (UNT)	Colif. Totais (NMP/100ml)	Colif. Fecais (NMP/100ml)	
Seco	1	6,93	20,9	$4,0 \times 10^1$	0	0
	2	6,94	26,8	$2,6 \times 10^2$	0	0
	3	7,15	8,12	$4,0 \times 10^1$	0	0
	4	7,2	8,2	$4,0 \times 10^1$	0	0
	5	7,38	7,8	0	0	4
	6	7,2	7,65	$2,0 \times 10^1$	0	8
Chuvoso	7	7,5	27,4	$4,0 \times 10^1$	0	0
	8	7,8	25	$4,0 \times 10^1$	0	0
	9	8,35	26	0	0	0
	10	8,1	27	0	0	0
	11	7,2	19,7	$2,8 \times 10^2$	0	0
	12	7,5	18	$2,8 \times 10^2$	0	0

7.3 Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas e do número de estruturas álcool-ácido resistentes semelhantes aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de água do Rio Capibaribe em Tiúma no período seco e chuvoso

Período	Amostras	Parâmetros Físico-Químicos		Parâmetro microbiológicos		Número de like oocistos/l
		pH	Turbidez (UNT)	Colif. Totais (NMP/100ml)	Colif. Fecais (NMP/100ml)	
Seco	1	7,97	73,9	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	84
	2	7,42	4,3	$1,7 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	0
	3	8	5,6	$1,4 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$	0
	4	7,94	4,1	$2,6 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	0
	5	7,76	5,35	$1,1 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$	84
	6	7,56	5,51	$3,4 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$	0
Chuvoso	7	7,79	96,1	$2,7 \times 10^2$	0	0
	8	7,62	95	$1,4 \times 10^2$	0	0
	9	7,6	61,3	$1,4 \times 10^2$	0	0
	10	7,63	65,4	$4,0 \times 10^1$	0	0
	11	8,37	24,6	$2,0 \times 10^1$	0	40
	12	8,25	24,9	$4,0 \times 10^1$	0	40

7.4 Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas e do número de estruturas álcool-ácido resistentes semelhantes aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de água do Rio Capibaribe em Castelo no período seco e chuvoso

Período	Amostras	Parâmetros Físico-Químicos		Parâmetro microbiológicos		Número de like oocistos/l
		pH	Turbidez (UNT)	Colif. Totais (NMP/100ml)	Colif. Fecais (NMP/100ml)	
Seco	1	7,92	10,3	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	4
	2	7,74	7,6	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	0
	3	8,43	8,9	$5,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^1$	0
	4	8,1	2,9	$3,4 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	0
	5	8,15	2,84	$1,1 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$	24
	6	7,9	2,84	$9,0 \times 10^1$	$9,0 \times 10^1$	0
Chuvoso	7	7,74	7,6	$6,0 \times 10^1$	0	0
	8	8,43	8,9	40×10^1	0	0
	9	8,1	2,9	$1,4 \times 10^2$	0	0
	10	7,93	27,7	$3,4 \times 10^2$	0	10
	11	7,84	31,9	$2,0 \times 10^1$	0	0
	12	7,87	34,2	$2,0 \times 10^1$	0	0

7.5 Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas e do número de estruturas álcool-ácido resistentes semelhantes aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de água da entrada do sistema de tratamento no período seco e chuvoso

Período	Amostras	Parâmetros Físico-Químicos		Parâmetro microbiológicos		Número de like oocistos/l
		pH	Turbidez (UNT)	Colif. Totais (NMP/100ml)	Colif. Fecais (NMP/100ml)	
Seco	1	7,55	4,8	0	0	16
	2	9,0	8,2	0	0	16
	3	7,7	11,6	$1,4 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	0
	4	8,18	54,1	$6,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	20
	5	8,35	24,1	$4,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	12
	6	7,7	19,4	$2,3 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$	0
Chuvoso	7	7,39	48,7	$1,4 \times 10^2$	0	0
	8	7,57	71,2	$5,0 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	0
	9	7,41	53	0	0	0
	10	7,32	51,3	$2,0 \times 10^1$	0	0
	11	7,24	106	$8,0 \times 10^1$	0	0
	12	7,16	72,2	$2,0 \times 10^1$	0	0

7.6 Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas das amostras de água da saída do sistema de tratamento no período seco e chuvoso.

Período	Amostras	Parâmetros Físico-Químicos		Parâmetros microbiológicos	
		pH	Turbidez (UNT)	Colif. Totais (NMP/100ml)	Colif. Fecais (NMP/100ml)
Seco	1	6,78	0,6	0	0
	2	6,96	2,95	0	0
	3	6,84	2,4	0	0
	4	6,38	2,9	0	0
	5	6,21	2,6	0	0
	6	6,38	1,76	0	0
Chuvoso	7	6,32	0,45	0	0
	8	7,1	0,8	0	0
	9	7,16	0,75	0	0
	10	7,0	0,6	0	0
	11	7,25	0,54	0	0
	12	7,7	0,4	0	0

Machado, Erilane de Castro Lima

Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na Região Metropolitana de Recife/PE / Erilane de Castro Lima Machado. – Recife : O Autor, 2006.

140 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2006.

Inclui bibliografia e apêndices.

1. Nutrição – Microbiologia dos alimentos . 2. *Cryptosporidium* spp. – Ocorrência no ambiente aquático – Águas superficiais. 3. Métodos de detecção – Concentração e identificação de oocistos. I. Título.

579.67

CDU (2.ed.)

UFPE

579.47

CDD (22.ed.)

BC2006-183