

JULIANA TRACZ PEREIRA

**MÉTODOS DE DESINFECÇÃO EM ÁGUA CONTENDO
Cryptosporidium parvum (APICOMPLEXA: CRYPTOSPORIDIIDAE)
E SUA DETECÇÃO POR TÉCNICA DE BIOLOGIA MOLECULAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de Concentração Parasitologia, dos Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Oliveira Costa

**CURITIBA
2007**

JULIANA TRACZ PEREIRA

**MÉTODOS DE DESINFECÇÃO EM ÁGUA CONTENDO
Cryptosporidium parvum (APICOMPLEXA: CRYPTOSPORIDIIDAE)
E SUA DETECÇÃO POR TÉCNICA DE BIOLOGIA MOLECULAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de Concentração Parasitologia, dos Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Oliveira Costa

**CURITIBA
2007**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo incentivo e apoio dados durante todos os momentos.

À Universidade Federal do Paraná, por viabilizar minha formação profissional e intelectual.

Ao Departamento de Patologia Básica, por proporcionar a realização deste curso.

À Professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, pela orientação, oportunidade e ensinamentos.

À Professora Dra. Adriana Oliveira Costa pela co-orientação.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná.

Às Professoras Dras. Rosângela Clara Paulino e Edilene Alcântara de Castro, pela valiosa ajuda na execução do trabalho, além do apoio e amizade.

Ao Wellington Cesar Gallice, pela paciência e ajuda tão importantes.

À bióloga e técnica do Laboratório de Parasitologia Molecular, Luciane Mara Hennig, pela amizade e auxílio.

À colega e amiga Paôla Wolski Meireles, pelo apoio em muitos momentos.

Ao médico veterinário Nelson Luis Mello Fernandes, pela amizade, auxílio e conselhos.

À FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, pelo auxílio financeiro do presente projeto.

Ao Srs. Cleverson Vitorio Andreoli, Wagner Schuchardt, Wandir Roche, Carlos Hartmann e Carlos Eduardo Ferreira da Silva (SANEPAR), ao Sr. Vicente Martinazzo (EKA) e ao Sr. Joel Rodrigues (Diagtech) pelo auxílio prestado durante os experimentos.

Ao Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas (UFPR).

A todas as pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para a conclusão desta etapa em minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo Geral	5
2.2 Objetivos Específicos	5
3 REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 <i>Cryptosporidium</i>	6
3.1.1 Histórico	6
3.1.2 Taxonomia e Classificação	7
3.1.3 Morfologia	8
3.1.4 Biologia	8
3.1.5 Patogenia	10
3.1.6 Criptosporidiose no homem	10
3.1.7 Criptosporidiose em animais de produção	11
3.1.8 Criptosporidiose em animais de companhia	11
3.1.9 Epidemiologia	12
3.2 Métodos de detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp. em água	16
3.2.1 Métodos diretos	16
3.2.2 Métodos indiretos	19
3.3 Tratamento da água com objetivo de remoção ou inativação de <i>Cryptosporidium</i> spp.	21
3.4 Avaliação da viabilidade de oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i>	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção e purificação de oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i>	27
4.2 Detecção molecular de <i>Cryptosporidium parvum</i> em água	28
4.2.1 Extração de ácido desoxirribonucléico (DNA)	28
4.2.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	29
4.2.3 Eletroforese em gel de agarose	31
4.2.4 Determinação da sensibilidade da PCR	31

4.3	Metodologia de desencistamento para determinação da viabilidade de oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i>	32
4.4	Métodos químicos para inativação de <i>Cryptosporidium parvum</i> em água.....	33
4.4.1	Desinfecção por ácido hipocloroso	33
4.4.2	Desinfecção por dióxido de cloro.....	34
4.4.3	Desinfecção por ozônio	35
4.5	Concentração dos oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i> após os métodos de desinfecção química	35
4.6	Medidas de segurança para organismos patogênicos	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1	Obtenção e purificação de oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i>	37
5.2	Padronização da detecção molecular de <i>Cryptosporidium parvum</i> em água.....	39
5.2.1	Extração de DNA.....	39
5.2.2	Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	42
5.3	Metodologia de desencistamento para determinação da viabilidade de oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i>	46
5.4	Métodos químicos para inativação de <i>Cryptosporidium parvum</i> em água.....	48
5.4.1	Efeito do ácido hipocloroso sobre a viabilidade de oocistos de <i>C. parvum</i>	48
5.4.2	Efeito do dióxido de cloro sobre a viabilidade de oocistos de <i>C. parvum</i>	51
5.4.3	Efeito do ozônio sobre a viabilidade de oocistos de <i>C. parvum</i>	57
5.5	Medidas importantes para garantir a qualidade da água.....	62
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	CICLO BIOLÓGICO DE <i>Cryptosporidium</i> spp	9
FIGURA 2 -	APARELHO USADO PARA FILTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUA PARA CONCENTRAÇÃO DOS OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i>	36
FIGURA 3 -	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE <i>Cryptosporidium parvum</i> . CÔLUNA 1, PM-PADRÃO DE PESO MOLECULAR 100BP; COLUNAS 2 A 4, PRIMER AWA (GÊNERO-ESPECÍFICO): 2, (10 ³ OOCISTOS); 3, (10 ² OOCISTOS); 4, (10 ⁵ OOCISTOS); COLUNAS 5 A 8, PRIMER LAX (ESPÉCIE-ESPECÍFICO): 5, (10 ² OOCISTOS); 6, (10 ³ OOCISTOS); 7, (10 ⁴ OOCISTOS) E 8, (10 ⁵ OOCISTOS)	42
FIGURA 4-	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO ESPECÍFICO DE <i>Cryptosporidium parvum</i> EM AMOSTRAS DE ÁGUA CONTAMINADAS COM DIFERENTES QUANTIDADES DE OOCISTOS. CN, CONTROLE NEGATIVO (SEM DNA); PM, PADRÃO DE PESO MOLECULAR; CP, CONTROLE POSITIVO. O PAR DE INICIADORES USADO PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA FOI CRY15F/CRY9R.....	43
FIGURA 5 -	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO A PARTIR DE NESTED-PCR COM OS PRIMERS XIAOF/XIAOR E AWA995F/AWA1206R COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> . PM, PADRÃO DE PESO MOLECULAR 100 BP; CN, CONTROLE NEGATIVO	44
FIGURA 6 -	TESTE DE VIABILIDADE <i>IN VITRO</i> PARA <i>Cryptosporidium parvum</i> VISTO EM MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE. A-B: OOCISTOS INTACTOS, C-E: OOCISTOS PARCIALMENTE DEENCISTADOS, F-G: OOCISTOS DEENCISTADOS (APENAS A MEMBRANA DO OOCISTO), H: OOCISTOS INTACTOS, COM DESTRUÇÃO DAS ESTRUTURAS INTERNAS POR EXPOSIÇÃO AO OZÔNIO.....	47
FIGURA 7 -	REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO HIPOCLOROSO (2 PPM, pH 7,5) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i>	49
FIGURA 8 -	REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO (1 PPM, 2 PPM E 5 PPM) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i>	52
FIGURA 9 -	REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO pH (7,0 E 8,0 A 19°C) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> COM DIÓXIDO DE CLORO (2PPM)	53
FIGURA 10 -	REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM OZÔNIO NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> (SISTEMA ABERTO)	57
FIGURA 11 -	REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM OZÔNIO NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> (SISTEMA FECHADO)	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ESPÉCIES DE <i>Cryptosporidium</i> E PRINCIPAIS HOSPEDEIROS	7
TABELA 2 -	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE <i>Cryptosporidium</i> spp. QUE FACILITAM A TRANSMISSÃO POR VIA HÍDRICA E ALIMENTAR	16
TABELA 3-	LISTA DE ALVOS MOLECULARES, TÉCNICAS DE AMPLIFICAÇÃO E PRINCIPAL APLICAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Cryptosporidium</i> spp.	21
TABELA 4 -	LISTA DE <i>PRIMERS</i> (INICIADORES) TESTADOS NAS REAÇÕES DE PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE <i>Cryptosporidium</i> spp. E <i>C. parvum</i>	30
TABELA 5 -	COMPONENTES DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS EM UMA REAÇÃO DE PCR	30
TABELA 6 -	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA OS DIFERENTES INICIADORES PARA <i>Cryptosporidium</i> spp. E <i>C. parvum</i>	31
TABELA 7 -	DOSAGEM POR ESPECTROFOTOMETRIA DE DNA EXTRAÍDO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> , EMPREGANDO ULTRA-SOM E ENZIMAS.....	40
TABELA 8 -	DOSAGEM POR ESPECTROFOTOMETRIA DE DNA EXTRAÍDO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> , EMPREGANDO SOMENTE ENZIMAS	40
TABELA 9 -	DOSAGEM POR ESPECTROFOTOMETRIA DE DNA EXTRAÍDO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> , EMPREGANDO CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO	41
TABELA 10 -	DADOS DA REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO HIPOCLOROSO (2 PPM, pH 7,5) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i>	49
TABELA 11 -	PARÂMETROS ANALISADOS DURANTE O MÉTODO DE INATIVAÇÃO COM ÁCIDO HIPOCLOROSO (2PPM) EM ÁGUA ULTRAPURA (pH 7,5) CONTENDO OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i>	50
TABELA 12 -	DADOS DA REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO (1 PPM, 2 PPM E 5 PPM) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i>	52
TABELA 13 -	DADOS DA REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO pH (7,0 E 8,0 A 19°C) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> COM DIÓXIDO DE CLORO (2PPM)	53
TABELA 14 -	EFICIÊNCIA DO DIÓXIDO DE CLORO NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> (10 ⁴ /mL) EM ÁGUA ULTRAPURA (pH 7,0 A 19°C)	54
TABELA 15 -	RESUMO DE DADOS DE INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> USANDO DIÓXIDO DE CLORO E COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS DO PRESENTE ESTUDO (ADAPTADO DE CHAURET ET AL., 2001).....	56

TABELA 16 -	DADOS DA REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM OZÔNIO NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> (SISTEMA ABERTO)	57
TABELA 17 -	EFICIÊNCIA DO OZÔNIO NA REDUÇÃO DA VIABILIDADE DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> UTILIZANDO SISTEMA ABERTO.....	58
TABELA 18 -	DADOS DA REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM OZÔNIO NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> (SISTEMA FECHADO)	59
TABELA 19 -	EFICIÊNCIA DO OZÔNIO NA REDUÇÃO DA VIABILIDADE DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> UTILIZANDO SISTEMA FECHADO.....	60
TABELA 20 -	VALORES DE CT PARA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> EMPREGANDO OZÔNIO COMO DESINFETANTE.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	- Adenina
APHA	- American Public Health Association
ASTM	- American Society for Testing and Materials
AWWA	- American Water Works Association
C	- Citosina
COWP	- <i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein
CT	- Concentração do desinfetante (mg/L ou ppm) x Tempo de contato (minutos)
DAPI	- 4,6-Diamino-2-phenylindole
DNA	- Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
dNTP	- Deoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	- Diacetato de fluoresceína
G	- Guanina
g	- Grama
x g	- Gravidade
GP60	- Glicoproteína 60
HCl	- Ácido clorídrico
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
Hsp70	- Heat shock protein 70
ICR	- Information Collection Rule
IF	- Imunofluorescência
IMS	- Separação imunomagnética
KCl	- Cloreto de potássio
L	- Litro
log	- Logaritmo
mg	- Miligrama
Mg ²⁺	- Íon magnésio – cátion divalente
MgCl ₂	- Cloreto de magnésio
mL	- Mililitro

NaCl	- Cloreto de sódio
NaHCO ₃	- Bicarbonato de sódio
Nested-PCR	- PCR de seqüências internas
N/No	- Razão entre o número de oocistos de <i>C. parvum</i> viáveis e o número total de oocistos no início do experimento de desinfecção
PBS	- Solução salina tamponada (phosphate buffer saline)
PCR	- Polimerase Chain Reaction (Reação da Polimerase em Cadeia)
pH	- Potencial de hidrogênio
PI	- Iodeto de propídio
ppm	- Parte por milhão
RFLP	- Restriction fragment length polymorphism
RNA	- Ácido ribonucléico (Ribonucleic Acid)
RT-PCR	- PCR por transcriptase reversa
SIDA	- Síndrome da imunodeficiência adquirida
SSU-rDNA	- Small subunit ribosomic DNA – menor subunidade do DNA ribossômico
THM	- Trihalometano
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
UHT	- Ultra High Temperature
USEPA	- United States Environment Protection Agency
UTN	- Unidade de turbidez nefelométrica
<	- Menor que
>	- Maior que
≤	- Menor ou igual a
WEF	- Water Environment Federation

RESUMO

Cryptosporidium é um protozoário de reconhecida importância como patógeno de veiculação hídrica. Sua transmissão ocorre por meio da ingestão de oocistos, forma de resistência capaz de sobreviver no ambiente externo. Em indivíduos jovens (0 a 15 anos) e imunocomprometidos, a infecção pode se tornar grave, com diarreia, síndrome de má absorção e atraso no crescimento, chegando a ser fatal em alguns casos. Criptosporidiose é considerada parasitose emergente e está incluída na lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde. A prevenção se faz necessária para evitar grandes epidemias, como as registradas em países desenvolvidos. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência ou não dos diferentes métodos de desinfecção com produtos químicos usados no tratamento convencional de água de abastecimento público, empregando o método de desencistamento *in vitro* para avaliação da viabilidade, e ainda determinar a sensibilidade analítica por meio de técnica de biologia molecular (PCR) na detecção de oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Nos métodos de desinfecção avaliados observou-se que o ácido hipocloroso a 2 ppm inativou 49% dos oocistos de *C. parvum* após 120 minutos de contato. Para o dióxido de cloro, foram necessários 5 ppm e tempo de contato de 90 minutos para inativar 90% dos oocistos de *C. parvum* presentes. O ozônio na concentração de 0,18 mg/L inativou 98,87% dos oocistos de *C. parvum* e para 100% de inativação, a concentração necessária foi de 0,24 mg/L. A técnica molecular (PCR) mostrou-se sensível para 10^2 oocistos de *C. parvum*. Neste trabalho, foi confirmada a resistência de *C. parvum* aos processos usuais de desinfecção, indicando a necessidade de tratamentos mais efetivos para melhorar a qualidade da água consumida no Brasil.

Palavras-chave: ácido hipocloroso, *Cryptosporidium parvum*, desencistamento *in vitro*, dióxido de cloro, ozônio, PCR

ABSTRACT

Cryptosporidium is a protozoan that has its importance widely recognized in waterborne diseases. It is transmitted by the ingestion of oocysts, a form which is able to survive in outer environments. In young (zero to 15 years old) and immunocompromised individuals, the infection can become serious, with diarrhea, mal-absorption syndrome, and growth delay, and in some cases it can even be fatal. Cryptosporidiosis is considered an emerging parasitosis, which is included in the list of neglected illnesses published by the WHO-World Health Organization. Its prevention proves to be necessary in order to avoid widespread epidemics, as those reported in developed countries. The present work aims at evaluating the efficacy – or lack of efficacy – of the different disinfection methods involving chemical products used in conventional water supply treatment, employing the *in vitro* excystation method to evaluate the oocysts viability, and moreover to evaluate the analytical sensitivity through molecular biology method (PCR) in detection of *Cryptosporidium parvum*. In the disinfection methods evaluated, it was possible to observe that hypochlorous acid at 2 ppm inactivated 49% of *C. parvum* oocysts after a 120 min contact. For chlorine dioxide, 5 ppm and a 90 min contact were necessary to inactivate 90% of the *C. parvum* oocysts present. A 0.18 mg/L ozone concentration inactivated 98.87% of the *C. parvum* oocysts; and for 100% inactivation, the necessary concentration proved to be 0.24 mg/L. The molecular method (PCR) showed sensitivity of 10^2 *C. parvum* oocysts. In the present work, the resistance of *C. parvum* to the usual disinfection processes was confirmed, indicating the need for more effective treatments in order to improve the quality of potable water consumed in Brazil.

Keywords: chlorine dioxide, *Cryptosporidium parvum*, hypochlorous acid, *in vitro* excystation, ozone, PCR

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, dificilmente se encontra uma fonte de água doce que não tenha suas características alteradas pelo homem. A eliminação de resíduos provenientes da atividade humana é um dos fatores relevantes na contaminação dos corpos d'água, constituindo um dos grandes problemas de saúde pública em diversas partes do mundo (AMARAL et al., 1994). Há muito tempo a qualidade da água vem sendo deteriorada, apresentando assim, um risco potencial de comprometimento à saúde e ao bem-estar do homem (WORLD DEVELOPMENT REPORT, 1992). A industrialização e o aumento populacional dos centros urbanos têm intensificado a contaminação dos mananciais tornando necessário o tratamento da água para o consumo humano (DI BERNARDO e DANTAS, 2005). Desta forma, quanto mais conservado um manancial mais simples será o tratamento da água.

A infra-estrutura de saneamento na maioria dos países em desenvolvimento é caracterizada por provisão pequena e desigual. Aproximadamente duas em cada dez pessoas não tiveram acesso à água limpa em 2000, cinco em cada dez pessoas não tiveram condições adequadas de saneamento e nove entre dez pessoas não tiveram água tratada, especialmente em áreas rurais (WORLD DEVELOPMENT REPORT, 2006). Apenas 69% da população da América Latina e do Caribe têm acesso a serviços de saneamento básico de esgoto e somente 10% do esgoto coletado é tratado. O acesso a suprimento adequado de água limpa e saneamento básico é fator crítico para a garantia da saúde (OPAS, 1998). Quando estes serviços não são disponibilizados em determinadas áreas, um dos reflexos é o registro de altos níveis de morbidade e mortalidade provenientes de doenças diarréicas.

No Brasil, em 2003, a população residente era de 173.966.052 habitantes, com 84,3% residindo em áreas urbanas. A quinta causa de morte no país, com taxa de 5,5%, foram as doenças infecciosas e parasitárias (OPAS,2005). Em 2004, doenças infecciosas e parasitárias foram responsáveis por 8,38% das internações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). A existência de um sistema de tratamento eficiente de águas e esgoto é de fundamental importância para que não se tenha contaminação ambiental e se reduza a morbidade e mortalidade por doenças infecto-parasitárias.

Dentre os agentes causadores de doenças parasitárias, veiculados pela água, merece destaque *Cryptosporidium* spp., protozoário que infecta o homem e animais domésticos, outros mamíferos silvestres, aves e répteis. Causa quadros clínicos severos, tanto em humanos como em animais domésticos. A doença pode se manifestar com diarreia, má absorção com déficits nutricionais e graves perdas de peso. A criptosporidiose em crianças pequenas está associada a episódios de diarreia prolongada pós-infecção, levando à má absorção e diminuição do crescimento (AGNEW et al., 1998). Segundo alguns estudos, a criptosporidiose é endêmica na maioria das regiões tropicais, sendo *Cryptosporidium* spp. um dos três principais agentes causadores de diarreia infecciosa. No Brasil, o protozoário representa causa de morbidade e mortalidade em crianças de zero a cinco anos de idade e pacientes portadores de HIV (OSHIRO et al., 2000, GATEI et al., 2003). Hospedeiros infectados podem excretar entre 10^9 e 10^{10} oocistos de *Cryptosporidium* spp. por grama de fezes, o que faz tanto animais domésticos quanto selvagens serem considerados reservatórios de infecção humana (SMITH e ROSE, 1998). A patologia em animais silvestres ainda é pouco conhecida e por isso discute-se o papel destes animais como reservatórios deste microrganismo (APELBEE et al., 2005).

Vários são os surtos de criptosporidiose citados na literatura recente, especialmente nos Estados Unidos e Reino Unido (LECLERC et al., 2002, SMITH et al., 2006). Deflagração de criptosporidiose de origem hídrica tem sido assinalada em associação com contaminação de poço artesiano (NIME et al., 1976), água filtrada de rede de abastecimento público (SMITH, 1998, SMITH et al., 2006) e água superficial não tratada (ORLANDI e LAMPEL, 2000). *Cryptosporidium* spp. representa um desafio à infraestrutura de saneamento das cidades. Pelo fato da água ser o veículo mais importante na transmissão de oocistos de *Cryptosporidium* spp. muitos estudos têm sido feitos sobre a ocorrência do parasito em esgotos, águas superficiais, subterrâneas e tratadas em vários países (SMITH e ROSE, 1998). Na Inglaterra, GOH et al. (2004) mostraram que consumo de água de abastecimento público, é um importante fator de risco para criptosporidiose esporádica em humanos. Nos Estados Unidos, estudo sobre fatores de risco para criptosporidiose esporádica em pessoas imunocompetentes mostrou que a maior proporção de casos foi atribuída ao contato com bovinos, seguido do contato com

crianças com quadro diarréico, hábito de nadar em piscinas, lagos e viagens internacionais (ROY et al., 2004). Águas de recreação, tais como piscinas públicas e parques aquáticos, freqüentemente usadas por um grande número de pessoas, têm sido relacionadas a epidemias de criptosporidiose nos últimos anos (CARPENTER et al., 1999). MATHIEU et al. (2004) demonstraram numa investigação epidemiológica no ano de 2000 em Ohio, EUA, que o principal fator de risco para surtos de criptosporidiose foi o uso de piscinas recreacionais.

Este parasito apresenta, no curso do seu ciclo biológico, oocistos como formas de resistência, que são eliminadas junto com fezes no ambiente. O homem muitas vezes facilita a dispersão destas formas no solo e na água, quando os contamina com suas próprias fezes ou as de animais. Isso ocorre por falta de saneamento básico ou ainda por realizar a coleta de esgoto, proceder a tratamento primário e lançá-los no ambiente, com organismos ainda viáveis. A reciclagem de corpos d'água favorece a infecção por *Cryptosporidium* spp., por estarem sujeitos a lançamentos de esgotos e pela capacidade dos oocistos em sobreviver por longos períodos em variadas condições ambientais.

Face aos constantes relatos da ocorrência desta protozoose, esforços importantes têm sido feitos para melhorar métodos de detecção e controle do parasito a partir de uma possível fonte de infecção: a água. O tamanho micrométrico (2-6 µm em compressão) deste organismo dificulta a sua detecção, necessitando-se de técnicas de concentração de grande volume de água, seguido de identificação microscópica das formas parasitárias. Estes procedimentos demandam estratégias complexas e experiência considerável do pesquisador, além de apresentarem custo elevado. Métodos moleculares como PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) têm se mostrado promissores como alternativa para a detecção destes parasitos, podendo ser futuramente empregados para avaliar a qualidade de processos de tratamento da água. Ressalta-se, entretanto, que diferentemente de bactérias, a detecção dos protozoários em água, por si só não é suficiente para a avaliação do risco de infecção para humanos. É imprescindível avaliar de forma adequada a viabilidade dos oocistos, já que somente aqueles viáveis possibilitam a ocorrência de infecção.

Apesar dos processos de tratamento de água (associação de coagulação, floculação, sedimentação e filtração) reduzirem em até 3 a 4 logs (99,9 e 99,99%,

respectivamente) de *Cryptosporidium* spp. da água de superfície, os oocistos deste microrganismo são capazes de passar na etapa de filtração e resistir ao tratamento por cloração (SMITH et al., 2006). O cloro é o desinfetante utilizado nos processos convencionais de tratamento de água. Contudo, nas concentrações usuais, ele não apresenta taxas efetivas de inativação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. (FAYER et al., 1995, FINCH et al., 1997). Para que o cloro seja eficiente, são necessárias altas concentrações do produto e longo período de contato, o que tornaria o processo não aplicável. A busca por produtos desinfetantes que sejam eficientes na inativação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. é alvo de muitas pesquisas. Neste contexto, o dióxido de cloro e o ozônio são alternativas a serem consideradas para aprimorar os sistemas convencionais de tratamento de água. Deve haver o desenvolvimento e avaliação de métodos continuamente, buscando confirmar os parâmetros de qualidade. Estas informações, além de contribuir para identificação e avaliação de risco de surtos de origem hídrica, poderão ser úteis às instituições governamentais como base para a definição, estruturação e implementação de políticas públicas de saneamento e de saúde.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Comprovar a eficiência ou não dos diferentes produtos químicos empregados na desinfecção da água contendo *Cryptosporidium parvum*, bem como determinar a sensibilidade analítica da técnica de biologia molecular na detecção deste protozoário.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar a sensibilidade analítica da técnica molecular (PCR) na detecção de *Cryptosporidium parvum* em água, em escala laboratorial.
2. Determinar a viabilidade do protozoário pelo método de desencistamento *in vitro*;
3. Testar a eficiência do ácido hipocloroso sobre o protozoário presente na água;
4. Testar a eficiência do dióxido de cloro, em diferentes concentrações, sobre o protozoário presente na água;
5. Testar a eficiência do ozônio, em diferentes concentrações, sobre o protozoário presente na água.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Cryptosporidium*

3.1.1 Histórico

Este parasito foi observado pela primeira vez em 1907, no tubo digestivo de um camundongo de laboratório, aparentemente sadio (TIZZER, 1907, 1910). Mas sua presença só foi relacionada à doença em 1955 em perus (SLAVIN, 1955) e em 1971 em bezerros (PANCIERA et al., 1971). O primeiro caso de infecção humana foi relatado em 1976, em uma criança de três anos de idade residente da zona rural (NIME et al., 1976). Todavia, a criptosporidiose só passou a ter importância no início dos anos 80 com o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e a seguir com as epidemias de veiculação hídrica (CRAUN et al., 1998, SMITH e ROSE, 1998). Várias epidemias de criptosporidiose foram registradas nos Estados Unidos, no Texas em 1985 e Geórgia em 1987 (D'ANTONIO et al., 1985, HAYES et al., 1989). Devido a estas epidemias a agência de proteção ambiental inclui o parasito na lista de organismos a serem pesquisados em água potável (SAVIOLI et al., 2006). A maior epidemia ocorreu em Milwaukee, EUA, em 1993, onde 403.000 pessoas foram contaminadas pela ingestão de água potável contendo oocistos do protozoário (MACKENZIE et al., 1994). Atualmente a criptosporidiose é considerada uma doença emergente e a Organização Mundial da Saúde (OMS) a coloca na lista das doenças negligenciadas (SAVIOLI et al., 2006). A exposição humana ao parasito aumenta com a concentração de crianças em creches, popularização de piscinas públicas, aumento do número de indivíduos imunocomprometidos e certas peculiaridades do parasito. Por se tratar de uma séria questão de saúde pública, vários são os estudos para detecção e inativação de *Cryptosporidium* spp.

3.1.2 Taxonomia e classificação

Phylum Apicomplexa

Classe Sporozoasida

Subclasse Coccidiasina

Ordem Eucoccidiida

Subordem Eimeriina

Família Cryptosporidiidae

Gênero *Cryptosporidium* (LEVINE, 1980).

Cryptosporidium é o único coccídeo pertencente à família Cryptosporidiidae e muitas espécies têm sido encontradas parasitando numerosos vertebrados como mamíferos (bovino, ovino, cães, homem), aves, répteis e peixes (O'DONOGHUE, 1995). Apresenta potencial zoonótico como assinalado na Austrália, África, América (Costa Rica, Haiti, EUA e Brasil) (Tabela 1).

TABELA 1 - ESPÉCIES DE *Cryptosporidium* E PRINCIPAIS HOSPEDEIROS

Espécies de <i>Cryptosporidium</i>	Principais hospedeiros
<i>C. hominis</i>	Humanos, macacos
<i>C. parvum</i>	Bovinos, outros ruminantes, humanos
<i>C. bovis</i>	Bovinos
<i>C. muris</i>	Roedores
<i>C. suis</i>	Suínos
<i>C. canis</i>	Cães
<i>C. felis</i>	Gatos
<i>C. meleagridis</i>	Perus, humanos
<i>C. andersoni</i>	Bovinos, camelos
<i>C. wrairi</i>	Porquinho da Índia
<i>C. baileyi</i>	Aves
<i>C. galli</i>	Aves
<i>C. serpentis</i>	Serpentes
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos
<i>C. molnari</i>	Peixes
<i>C. nasorum</i> *	Peixes

FONTE: Cacciò et al., 2005 (revisão, tabela baseada no artigo de Xiao et al., 2004) e Appelbee et al., 2005. *Appelbee et al., 2005 citam esta espécie como parasita de peixes e não citam *C. molnari*.

Sete espécies foram descritas parasitando humanos (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris*) (SMITH et al., 2006). Estudos recentes, usando como ferramentas a biologia molecular, têm demonstrado a grande variabilidade genética intra-específica. A análise de mais de 3000 amostras permitiu identificar que *Cryptosporidium parvum* e *C. hominis* são as espécies mais freqüentemente assinaladas (MORGAN-RYAN et al., 2002). Mas suas prevalências variam em diferentes partes do mundo. *C. hominis* é mais freqüente na América do Norte, América do Sul, Austrália e África, enquanto que *C. parvum* seria mais prevalente na Europa.

3.1.3 Morfologia

O parasito possui diversas formas dependendo da fase no ciclo biológico. Os oocistos têm forma esférica ou elíptica, chegando medir de 2 a 6 µm de diâmetro, quando comprimido. No interior dos oocistos possuem quatro esporozoítos (sem esporocistos) e um corpo residual. A parede é lisa e dupla. Existem dois tipos de oocistos: os de parede espessa (80%) e parede delgada (20%). As demais formas são encontradas nas células intestinais dos hospedeiros, constituindo de meronte contendo merozoítos e os gametócitos masculinos e femininos (AKIYOSHI et al., 2003).

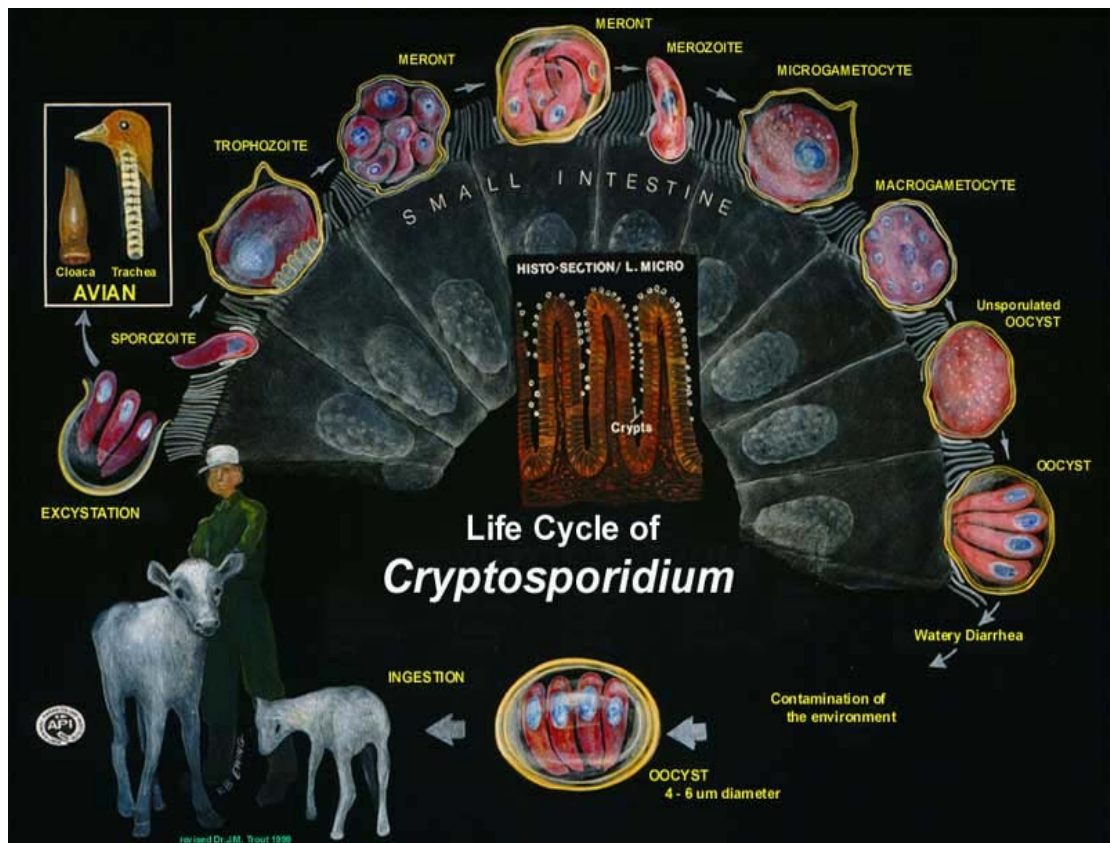
3.1.4 Biologia

A infecção com *Cryptosporidium* spp. ocorre por ingestão dos oocistos viáveis presentes na água ou alimentos. O desencistamento ocorre pela exposição a temperaturas corporais, ácido gástrico, tripsina e sais biliares. Os esporozoítos liberados penetram nas microvilosidades intestinais, geralmente do jejuno ou íleo, ou trato respiratório. Forma-se então um vacúolo parasitóforo intracelular, porém extracitoplasmático. Neste local os esporozoítos transformam-se em trofozoítos e sofrem divisão múltipla, formando o meronte, onde são gerados merozoítos de tipo I ou de tipo II, por meio de reprodução assexuada.

Os merozoítos de tipo I são capazes de infectar outras células e repetir a reprodução assexuada. Os merozoítos de tipo II iniciam o ciclo sexuado

(gametogonia), gerando gametas masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogametócitos). Cada microgameta fertiliza um macrogameta, produzindo o zigoto, dentro de um oocisto, o qual sofre meiose e dá origem ao oocisto esporulado. Os oocistos são liberados na luz intestinal e excretados nas fezes (Figura 1).

FIGURA 1 - CICLO BIOLÓGICO DE *Cryptosporidium* spp.



FONTE: psi.barc.usda.gov/awpl/cryptosporidium

O ciclo biológico se completa de 12 a 14 horas e o período entre a ingestão de oocistos e a excreção destes nas fezes pode variar de acordo com o hospedeiro e a espécie de *Cryptosporidium* (FAYER, 1997).

O oocisto esporulado é a única forma exógena e já é infectante ao ser eliminado. Tal característica, aliada à auto-infecção, explica a baixa dose infectante para o homem. Estudos realizados com voluntários humanos indicaram doses infectantes mínimas de nove oocistos (OKHUYSEN et al., 1999).

3.1.5 Patogenia

O mecanismo de ação patogênica do parasito ainda não está completamente elucidado. Estudos mostram que a invasão celular por *Cryptosporidium* spp., por meio do complexo apical, é dependente de cálcio intracelular e de alterações do citoesqueleto do parasito (CHEN et al., 2004).

A criptosporidiose caracteriza-se por diarreia, dor abdominal, febre baixa, fadiga, perda de apetite e de peso, náusea e vômito. Outras manifestações clínicas incluem colecistite, hepatite, pancreatite e problemas respiratórios.

A susceptibilidade e a severidade da doença variam entre os indivíduos e dependem do estado imunológico e nutricional e exposição prévia, uma vez que pessoas que residem em áreas endêmicas apresentam infecção leve ou assintomática (CURRENT, 1994). O período entre a ingestão de oocistos e o aparecimento dos sintomas é de sete a dez dias, podendo variar de cinco a 28 dias.

3.1.6 Criptosporidiose no homem.

A doença no homem pode evoluir de quatro formas: assintomática, aguda, crônica ou fulgurante (intensa e rápida). A taxa de indivíduos excretando oocistos sem diarreia é baixa. HAYES et al. (1989) relatam que 13% de pessoas excretando oocistos não eram portadoras de diarreia. A forma aguda é observada em crianças com menos de cinco anos de idade (GRIFFITHS, 1998). A forma crônica geralmente ocorre em indivíduos mal nutridos ou em pacientes imunodeprimidos.

Em indivíduos imunocompetentes que desenvolvem casos de gastroenterite observa-se uma síndrome diarreica, com eliminação de fezes 3 a 10 vezes ao dia, sem sangue e contendo muco. Os principais sintomas são dores abdominais, febre, náuseas e vômitos. A doença normalmente é autolimitada. Em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes HIV-positivos com linfócitos CD4⁺ abaixo de 200 céls./mm³, a infecção pode ser crônica e fatal (POZIO et al., 1997). Pode apresentar-se na forma digestiva (93%) ou pulmonar (33%). A forma digestiva é caracterizada por uma diarreia líquida com eliminação de fezes de 10 a 20 vezes ao dia podendo levar a perda de 10 litros de água por dia. A progressão ocorre com perda importante de peso, hipovolemia e caquexia, levando à morte. Quando há

infecção maciça pode haver invasão pulmonar por contigüidade e pneumopatias intersticiais são descritas (MACKENZIE et al., 1994).

Torna-se importante destacar que não existe terapia curativa para criptosporidiose humana. Em indivíduos HIV-positivos é feita terapia antiretroviral, o que tem diminuído o risco de morte por diarreia. Nitazoxanide diminui a eliminação de oocistos e tem sido utilizado em crianças HIV-negativas (SAVIOLI et al., 2006). Desta forma, a prevenção deve ser considerada o ponto principal para controle da doença.

3.1.7 Criptosporidiose em animais de produção

O sinal comumente observado é diarreia líquida e profusa, possui coloração amarelada e odor fétido. Acompanhando a diarreia surge desidratação, febre e anorexia.

Em bovinos a doença afeta animais na faixa etária de quatro a 30 dias, com maior prevalência para duas semanas de idade. A excreção de oocistos pode durar sete dias. Quando ocorre uma epidemia até 85% dos animais podem ser afetados (TZIPORI et al., 1980).

Em caprinos quando o desmame ocorre em 24 a 48 horas pode haver uma diarreia profusa e mortalidade dos animais geralmente é observada em uma a duas semanas (VIEIRA et al., 1997).

Em suínos a doença apresenta-se de forma sazonal e 26% dos animais infectados apresentaram diarreia (SANFORD, 1987). Nos animais com diarreia foram observados outros agentes patogênicos.

Em aves a infecção pode se manifestar por síndrome digestiva ou pulmonar (SRETER e VARGA, 2000).

3.1.8 Criptosporidiose em animais de companhia

Em gatos a espécie em causa é *C. felis*. Animais com infecção aguda também apresentam diarreia. São conhecidos dois casos de infecção causada por *C. felis* em pacientes HIV-positivos, nos Estados Unidos (MORGAN et al., 2000).

LALLO e BONDAN (2006) demonstraram prevalência de *C. parvum* de 9,5% na população canina de São Paulo entre 2003 e 2004.

Nos animais em geral a infecção pode se manter em estado subclínico e condições de stress ou outra condição de imunodepressão poderia reativar a excreção de oocistos (FAYER, 1997).

3.1.9 Epidemiologia

Vários são os fatores que influenciam a epidemiologia desta protozoose: pequeno tamanho do oocisto, baixa dose infectante, oocistos esporulados infectando imediatamente após sua eliminação com as fezes, pode ser transmitido de pessoa para pessoa, os oocistos são altamente resistentes no ambiente e se dispersam por via hídrica, alimentos ou ainda pelo ar. A transmissão direta (contato com pessoas infectadas ou animais infectados) ou indireta (ingestão de água contaminada, ingestão de alimentos contaminados, inalação dos oocistos) é favorecida por altas densidades populacionais (CACCIÒ et al., 2005). Águas recreacionais também representam grande problema de saúde pública, devido à alta resistência de *Cryptosporidium parvum* aos desinfetantes empregados nestas águas, especialmente o cloro, e ao grande número de banhistas (CARPENTER et al., 1999). A utilização de fezes de animais como adubo orgânico em culturas vegetais pode levar à infecção direta pela formação de aerossóis ou contaminar águas superficiais e subterrâneas. A ingestão de água contaminada é a principal via de contaminação humana (FAYER et al., 2000). Dezenove epidemias foram registradas nos últimos anos por consumo de água contaminada (SMITH e ROSE, 1998).

O parasito tem uma distribuição mundial e pode ser encontrado tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (SLIFKO et al., 2000; DI GIORGIO et al., 2002; HIGGINS et al., 2003; MONIS e THOMPSON, 2003). SMITH e ROSE (1998) relataram que ocorrem anualmente de 250 a 500 milhões de infecções causadas por *Cryptosporidium* spp. na Ásia, África e América Latina.

Nos Estados Unidos, surto de criptosporidiose que ocorreu na Geórgia (EUA) resultou da contaminação de água da rede pública de abastecimento, embora o sistema de tratamento da água fosse filtração em areia e cloração e cumprisse o exigido pelas normas oficiais americanas (HAYES et al., 1989). De acordo com

CORSO et al. (2003) pelo menos dez surtos de criptosporidiose foram associados com água potável nos Estados Unidos entre 1990 e 2000. O maior surto registrado neste país foi o que ocorreu em Milwaukee, no qual 403 mil pessoas foram afetadas, apesar de terem ingerido água filtrada e clorada (MACKENZIE et al., 1994). Relatos recentes demonstram que o parasito está presente em 80 a 97% de águas superficiais e em 26 a 54% de águas tratadas (SIMMONS et al., 2001, LUNA et al., 2002). Alguns estudos demonstraram que a criptosporidiose apresenta variação sazonal, sendo mais freqüente nos meses quentes e úmidos (UNGAR, 1990). Um estudo dos casos de infecção por parasitas intestinais no ano de 2000 nos Estados Unidos, mostrou uma prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 13%, sendo que o pico ocorreu na primavera (AMIN, 2002).

Em 2003, surto com 25 casos humanos confirmados de criptosporidiose ocorreu em Surrey, Canadá, dos quais 15 haviam nadado em piscina recreativa, na qual foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp. Em nove casos tratava-se de *C. parvum* (LOUIE et al., 2004).

Na Europa, LEMARCHAND e LEBARON (2003) detectaram a presença de *Cryptosporidium* spp. em 78% de amostras de água residual não tratada e 52% em efluentes de sistema de tratamento de esgoto por lodos ativados. Na Finlândia, o primeiro registro de *Cryptosporidium* em águas superficiais ocorreu em 2002 e estima-se 15 casos de criptosporidiose por ano nesse país (RIMHANEN-FINNE et al., 2002). Na Noruega o número de casos de criptosporidiose é baixo. Entre 1992 e 2003 (exceto 1999) houve 67 casos suspeitos da infecção, onde apenas dois foram comprovados como positivos, ambos em 2000 (ROBERTSON et al., 2006). Em 2005, 62 casos de infecção por *C. parvum* foram confirmados em Pertshire, Escócia, relacionados à visita em um centro de animais selvagens (McGUIGAN, 2005).

Segundo WANG et al. (2002) a taxa de infecção por *C. parvum* na Província Anhui, China, é de 1,33%. A taxa detectada em várias províncias foi entre 1,36 e 13,3%. Um estudo em Jeollanam-do, Coréia, demonstrou que apenas 1% dos pacientes imunocompetentes com diarreia foi positivo para *C. parvum* (LEE et al., 2005).

Em pacientes HIV - soropositivos no norte da Índia, 10,8% foram positivos também para *C. parvum* (MOHANDAS et al., 2002). No Iran, pesquisa com

indivíduos HIV - positivos apresentou prevalência de 1,5% para *C. parvum* (ZALI et al., 2004).

Estudo com crianças africanas da Uganda, que apresentavam diarreia persistente, detectou prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 31,3%. Entre as crianças com HIV, a taxa foi de 73,6% (TUMWINE et al., 2005). Em Gana, um estudo mostra prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 27,8 e 15,6% em crianças com e sem diarreia, respectivamente (ADJEI et al., 2004).

Segundo UNGAR et al. (1988) a prevalência de criptosporidiose em crianças de países latino americanos varia de 2 a 31%. Um estudo na Jamaica demonstrou uma prevalência de *Cryptosporidium* spp. em torno de 4%, especialmente em crianças (LINDO et al., 1998). ESTEBAN et al. (1998) registraram prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 31,6% em crianças da comunidade Aymara, no altiplano norte da Bolívia. Na Venezuela, em dois vilarejos ameríndios no oeste do país, um estudo determinou prevalência global de *Cryptosporidium* spp. de 8,8% (CHACÍN-BONILLA e SÁNCHEZ-CHÁVEZ, 2000). No Peru, XIAO et al. (2001) demonstraram uma prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 21% em crianças de uma comunidade urbana de baixa renda. No México, estudo com três comunidades de Chihuahua, foi encontrada taxa global de 70,4% de *Cryptosporidium* spp. (REDLINGER et al., 2002). Nestas comunidades não havia serviço municipal de saneamento e a maioria da população não tinha água encanada em suas casas. Na Guatemala, pesquisa feita com crianças de duas comunidades ao redor do Lago Atitlan mostrou uma prevalência de 32% de *Cryptosporidium* spp. (LAUBACH et al., 2004).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, de 1980 a 1999 foram notificados 4.691 casos de criptosporidiose em portadores de imunodeficiência. A presença do parasito tem sido assinalada desde os anos 80 quer seja em pacientes imunodeprimidos ou em crianças que representam grupos de risco (MOURA et al., 1989). Os estudos sobre *Cryptosporidium* spp. e criptosporidiose geralmente estão relacionados a levantamentos epidemiológicos em algumas regiões do país. MASCARINI e DONALÍSIO (2006) demonstraram prevalência de 15,5% (2002) e 3,7% (2003) de *Cryptosporidium* sp. em crianças de creches municipais de Botucatu, São Paulo.

Com relação à presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente, registram-se vários trabalhos científicos no Brasil. GAMBA et al. (2000) mostram a

contaminação de águas superficiais em oito de dez pontos examinados no município de Itaquaquecetuba. FRANCO et al. (2001), em pesquisa de oocistos em águas superficiais do rio Atibaia, assinalam a presença de oocistos durante três semanas consecutivas. No município de Campinas, o protozoário também foi observado tanto em águas superficiais como em água mineral (FRANCO e CANTUSIO, 2002). HELLER et al. (2004) relatam a presença de *Cryptosporidium* spp. em água de mananciais, em concentrações elevadas com 510 oocistos de *Cryptosporidium* spp. por litro. A taxa média ficou entre seis a 20 oocistos por litro. Em efluentes de ETA(s) os autores detectaram quantidades de oocistos de *Cryptosporidium* spp. superiores às citadas na Europa.

Os protozoários de veiculação hídrica têm como característica comum a presença de formas capazes de resistir por meses no ambiente externo, especialmente na água. No ambiente, os oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem sobreviver por até um ano a 4°C (TAMBURRINI e POZIO, 1999). Na água, os oocistos podem permanecer viáveis por até 176 dias, incluindo 35 dias na água do mar, suportam ampla variação de temperatura e não são alterados pela luz do sol (CHAURET et al., 1995).

Também pode haver contaminação de plantações de hortaliças, por meio de água contaminada utilizada para irrigação. Estas, se não devidamente higienizadas e consumidas cruas, podem se transformar em importantes vias de transmissão. O primeiro relato de infecção por consumo de alimentos contaminados com oocistos de *Cryptosporidium* spp. ocorreu em Maine, EUA, em 1994 após a ingestão de suco de maçã fresco, onde 213 pessoas foram infectadas (MILLARD et al., 1994). No Brasil, não há registro de surtos diretamente associados à contaminação alimentar por *Cryptosporidium* spp. Outras características destes protozoários são: a resistência aos desinfetantes, seu tamanho reduzido, as baixas doses infectantes e serem os reservatórios de infecção o homem ou os animais (Tabela 2).

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE *Cryptosporidium* spp. QUE FACILITAM A TRANSMISSÃO POR VIA HÍDRICA E ALIMENTAR

Característica	<i>Cryptosporidium</i> spp.
Grande número de oocistos eliminados pelos hospedeiros infectados.	Oocistos são infectantes quando eliminados nas fezes. Aproximadamente 10^{10} oocistos são excretados durante infecção sintomática. 10^7 oocistos por grama de fezes em bovinos infectados.
Especificidade multi-hospedeiro aumenta o potencial de disseminação e contaminação ambiental.	Sete espécies descritas de <i>Cryptosporidium</i> e duas não descritas (cervo e macaco) infectam o homem.
Grande resistência de oocistos aumenta a sobrevivência em ambientes favoráveis antes da ingestão por hospedeiros potenciais.	A sobrevivência de oocistos é intensificada em ambientes frios e úmidos (regiões temperadas). Seis meses suspensos em água.
Sobrevivência dos oocistos a alguns processos de tratamento de água.	Surto por veiculação hídrica indicam que oocistos podem sobreviver a tratamentos físicos e desinfecção. Oocistos são resistentes a desinfetantes comumente utilizados no tratamento da água.
O pequeno tamanho de oocistos ajuda na passagem pelos filtros de areia.	Os oocistos de todas as espécies que infectam o homem têm 4,5 - 6,0 μm , com exceção de <i>C. muris</i> , que tem 8,4 X 6,3 μm (comprimento X largura).
Dose infectante baixa significa que poucos oocistos viáveis precisam ser ingeridos para a infecção se estabelecer em hospedeiros susceptíveis.	A dose infectante para <i>C. parvum</i> é 9 -1042 oocistos; dez oocistos podem causar infecção em primatas não-humanos juvenis.
A excreção de oocistos nas fezes facilita a disseminação para a água.	Oocistos viáveis excretados por hospedeiros paratênicos (transporte passivo) como os gansos do Canadá.
A excreção de oocistos em cursos de água facilita a contaminação de moluscos filtradores marinhos e de água doce.	Acima de 5×10^3 oocistos de <i>C. parvum</i> . Oocistos de <i>C. parvum</i> , <i>C. hominis</i> e <i>C. meleagridis</i> podem ser detectados em vários mariscos.

FONTE: Smith et al., 2006 (Adaptado de Smith et al., 1995).

3.2 Métodos de detecção de *Cryptosporidium* spp. em água

3.2.1 Métodos diretos

No que diz respeito à detecção deste parasito deve-se lembrar que a quantidade de oocistos freqüentemente encontrada em amostras ambientais é pequena, demandando a concentração de grandes volumes de água para sua recuperação (100L ou menor escala de 10-20L) (CAREY et al., 2004). Os métodos mais comuns para detecção e quantificação, inicialmente desenvolvidos para *Giardia*

spp. e posteriormente empregados para *Cryptosporidium* spp., constam de etapas como a concentração das formas parasitárias na amostra de água, a purificação das mesmas e a coloração por imunofluorescência (VESEY et al., 1993b, LECHEVALLIER et al., 1995, JAKUBOWSKI et al., 1996, BORCHARDT e SPENCER, 1997).

Para concentrar as amostras de água, as técnicas envolvem geralmente a filtração empregando filtros do tipo cartucho de polipropileno (MUSIAL et al., 1987) ou membranas filtrantes (ONGERTH e STIBBS, 1987). Após a passagem da amostra, as partículas de tamanho maior que a porosidade nominal (a partir de 1 μm) são recuperadas com eluentes. Taxas de recuperação por este tipo de filtração são variadas, sendo reportados valores de 11,2% para filtros tipo cartucho por SHEPHERD e WYN-JONES (1996). Nas membranas filtrantes de acetato-celulose, cuja recuperação dos parasitos pode se dar por dissolução das mesmas por acetona, foram relatadas taxas de recuperação de 70,5% (ALDOM e CHAGLA, 1995), com a vantagem de não haver alteração das formas em etapas posteriores de coloração com anticorpo monoclonal (GRACZYK et al., 1997). Outra opção de concentração é a floculação química com carbonato de cálcio, com posterior dissolução dos flocos em ácido e redução do volume a um mililitro para análise (VESEY et al., 1993b). Utilizando este método, SHEPHERD e WYN-JONES (1996) obtiveram taxas de recuperação acima de 70% para *Cryptosporidium* spp., tanto em água destilada como em água de rio.

Na etapa de purificação, os parasitos podem ser separados de outros sedimentos, o que geralmente é realizado por técnicas de flutuação em gradiente de Percoll ou sacarose. Com isso, o material de interesse passa por uma separação adicional de outras partículas que dificultam a identificação dos parasitos.

Na quantificação/identificação de *Cryptosporidium* spp. do material, a metodologia mais freqüentemente empregada é a imunofluorescência (IF), utilizada também para detecção em exame parasitológico de fezes (RUSNAK et al., 1989). A imunofluorescência emprega anticorpos monoclonais ou policlonais específicos, marcados com isotiocianato de fluoresceína, capazes de se ligarem à superfície do parasito (IF direta) ou do anticorpo primário (IF indireta). Isso permite visualizar os parasitos por emissão de fluorescência e morfologia. ONGERTH e STIBBS (1987), desenvolveram um método indireto com anticorpos policlonais específicos para

Cryptosporidium de amostra ambiental, previamente purificado. Os anticorpos monoclonais podem diminuir a reação cruzada com outros organismos e forma complexos parasita-anticorpo mais estáveis.

O método americano ASTM (American Society for Testing and Materials) foi um dos primeiros que utilizou o procedimento filtração/flutuação/detecção por imunofluorescência para identificar e quantificar *Cryptosporidium* spp. em água (ASTM, 1991). Entretanto, baixos índices de recuperação (25,3%) foram descritos para este método (LECHEVALIER et al., 1991). Posteriormente, a USEPA aprovou o método ICR Protozoan Method, como parte de uma regra de monitoramento conhecida como “Information Colletion Rule” (USEPA, 1996). O método ICR apresenta princípios similares ao ASTM, porém limitações como a baixa eficiência de recuperação de oocistos demandava modificações para melhorar a detecção (LECHEVALIER e NORTON, 1995).

No Reino Unido e Austrália, a citometria de fluxo baseada na distribuição celular é outro método de detecção bastante utilizado para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais (VESEY et al., 1993a). O princípio deste método é a detecção de células eletricamente carregadas em função de um sinal fluorescente. Amostras concentradas de água são incubadas com anticorpo monoclonal conjugado a um fluorocromo, que se liga à parede do oocisto e o torna fluorescente. Uma suspensão é aplicada no citômetro, o qual analisa as células, diferenciando-as pelo tamanho, conteúdo interno e fluorescência. O material livre de debris é então coletado em lâmina e observado ao microscópio. Estudos mostram que esta técnica é bem mais sensível que a IF, além de demandar menos tempo que o método ASTM (COMPAGNON et al., 1997). A desvantagem deste método é o alto custo do aparelho e a necessidade de experiência do operador do mesmo.

Uma das importantes inovações tecnológicas aplicadas aos métodos para detecção de parasitos foi a separação imunomagnética (IMS). A IMS substitui a purificação por flutuação, a qual pode determinar a ocorrência de falsos positivos na imunofluorescência, devido ao fato de estruturas de densidade e aspecto similar às formas parasitárias sofrerem ligações inespecíficas aos anticorpos utilizados para os parasitos. Isto ocorre especialmente em *Cryptosporidium* spp., cujo tamanho reduzido dificulta a sua identificação. A IMS utiliza partículas ou pérolas magnéticas adsorvidas com anticorpos capazes de capturar os oocistos em meio aos

sedimentos concentrados. Aplica-se então um forte campo magnético que captura os complexos pérolas/parasitos, os quais são removidos e posteriormente separados, resultando em uma suspensão purificada (CAREY et al., 2004). A separação imunomagnética é utilizada no método 1623 da EPA (USEPA, 2001), para detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. e no protocolo padrão de operação para monitoramento de *Cryptosporidium* spp. ou SOP (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002). Ambos utilizam, após a separação imunomagnética, a imunofluorescência para detecção. Incluem também a microscopia de contraste por interferência e uso de corante vital (DAPI – 4,6-diamino-2-phenylindole e PI – iodeto de propídio) para confirmação morfológica. Entretanto, a eficiência da IMS diminui com amostras de água com alta turbidez.

Conforme observado, as técnicas disponíveis para detecção de *Cryptosporidium* spp. em água envolvem procedimentos complexos e demorados. Discute-se também que a variação entre lotes dos *kits* de identificação por imunofluorescência e a reatividade cruzada dos anticorpos com algas e outros elementos possa levar a erros de interpretação (QUINTERO-BITENCOURT et al., 2002). Embora bem padronizadas por pesquisadores e técnicos americanos, o custo destas metodologias é um fator limitante considerando a realidade brasileira. Outra desvantagem é que estas metodologias permitem apenas a identificação do gênero do parasito em questão, não permitindo determinar a fonte de contaminação e se representa ou não risco para o homem. Neste contexto, alternativas para a etapa de detecção dos parasitos devem ser consideradas.

3.2.2 Métodos indiretos

Entre as novas propostas de metodologia a detecção molecular específica por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) tem se mostrado promissora e permite o estudo da genotipagem para melhor compreensão da epidemiologia e conhecimento das fontes de infecção.

Na Tabela 3 estão relacionadas seqüências alvos e métodos moleculares utilizados para identificação de *Cryptosporidium* spp.

Como metodologia molecular, a PCR tem a vantagem sobre métodos microscópicos, que têm como limitações o tamanho e o número reduzido dos

parasitos em amostras ambientais e a necessidade de experiência por parte do pesquisador para reconhecer a morfologia. A especificidade e sensibilidade da PCR têm levado à sua utilização para detectar *Cryptosporidium* spp. em amostras clínicas e ambientais (MONIS et al., 2002; KAUCNER e STINEAR, 1998).

A técnica é capaz de amplificar milhares de vezes regiões específicas do DNA, através de uma reação que usa os elementos básicos do processo de replicação natural desta molécula. Os componentes essenciais para que a reação ocorra são: DNA polimerase termoestável (Taq polimerase), oligonucleotídeos (*primers* ou iniciadores) para iniciar a síntese de DNA, deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), cátion divalente (Mg^{2+}), tampão para manter o pH, cátions monovalentes (KCl), DNA molde (template).

A reação ocorre após a abertura da fita de DNA que permite o pareamento entre os iniciadores e o DNA alvo e nova síntese. Como resultado obtém-se um fragmento amplificado, específico do organismo estudado, que é separado posteriormente por eletroforese.

LOWERY et al. (2001) utilizaram a PCR em amostras de água de consumo na Irlanda do Norte, para detectar *Cryptosporidium* spp. após separação imunomagnética. Os autores destacam a sensibilidade e especificidade da técnica, além da capacidade de fornecer a genotipagem dos parasitos de forma rápida. RIMHANEN-FINNE et al. (2002), detectaram de 50 a 100 oocistos em água de superfície e constataram que alta turbidez exige purificação extra antes da PCR.

Um dos problemas da técnica de PCR é a presença de inibidores, que são freqüentes em amostras ambientais. Para minimizar este problema, os pesquisadores utilizam técnicas mais aprimoradas para extração do DNA das amostras, como o uso de resinas especiais (HALLIER-SOULIER e GUILLOT, 1999; GUY et al., 2003). No que se refere à sensibilidade, trabalhos como de CHUNG et al. (1999), MONIS e SAINT (2001) e STURBAUM et al. (2001) têm mostrado que a PCR é sensível para detectar de um a 10 oocistos de *Cryptosporidium* spp. Nestes trabalhos os autores utilizaram a estratégia da Nested-PCR, na qual o material já submetido a uma primeira amplificação é re-amplificado, aumentando a sensibilidade.

SMITH et al. (2006) referem-se à PCR como uma técnica viável para monitorar *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais, pois alguns problemas de

inibição da Taq polimerase, sensibilidade e avaliação da viabilidade podem ser superados.

TABELA 3 – LISTA DE ALVOS MOLECULARES, TÉCNICAS DE AMPLIFICAÇÃO E PRINCIPAL APLICAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* spp.

Alvos moleculares	Técnicas de amplificação	Principal aplicação
18SSU rDNA	PCR, nested PCR, sequenciamento, PCR tempo real, microarranjo.	Identificação de espécies e genótipos
Hsp 70	PCR, nested PCR, sequenciamento, PCR tempo real, microarranjo.	Identificação de espécies e genótipos
COWP	PCR, nested PCR, sequenciamento, PCR tempo real, microarranjo.	Identificação de espécies e genótipos
Actina	PCR, nested PCR, sequenciamento.	Identificação de espécies e genótipos
β-Tubulina	PCR, nested PCR, sequenciamento.	Identificação de espécies e genótipos
GP60	PCR, nested PCR, sequenciamento.	Identificação de subgenótipos
Microsatelites	PCR, nested PCR, sequenciamento.	Identificação de subgenótipos
Minisatelites	PCR, nested PCR	Identificação de subgenótipos
RNA extracromossomal	RT-PCR, sequenciamento, heteroduplex.	Identificação de subgenótipos

FONTE: Cacciò et al., 2005 e Smith et al., 2006. Abreviações: 18SSU-rDNA - Small subunit ribosomic DNA; Hsp70 - Heat shock protein 70; COWP – *Cryptosporidium* oocist wall protein; GP60 - glicoproteína 60; RFLP - restriction fragment length polymorphism; RT-PCR - Reverse Transcription-PCR .

3.3 Tratamento da água com objetivo de remoção ou inativação de *Cryptosporidium* spp.

Em virtude do aumento de surtos de criptosporidiose de origem hídrica, esforços têm sido empreendidos pelas empresas de saneamento para monitorar e reduzir a presença deste patógeno na água de consumo.

A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) estabeleceu, em 1999, uma das primeiras regulamentações para controle de *Cryptosporidium* spp. Estas normas exigem filtração e desinfecção de toda água de superfície e de rede de abastecimento, visando redução (remoção ou inativação) de *Cryptosporidium* spp. de 3 a 4,5 logs (99,9 a 99,997%, respectivamente), dependendo do nível de

contaminação da água (USEPA, 1999). No Reino Unido, a regulamentação da Agência de Água estipula um número máximo permitido de 10 oocistos por 100 L de água tratada por processo de filtração (FAIRLEY et al., 1999).

Como resultado da implementação destas normas a porcentagem de água tratada contendo oocistos de *Cryptosporidium* spp. caiu de 8% registrados em 1999 para 1% em 2003 (SAVIOLI et al., 2006).

No Brasil, o Ministério da Saúde, publicou a Portaria MS nº 518, onde estabelece parâmetros para tratamento da água de abastecimento (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). O Cap. IV , Art. 11, § 8º, trata do padrão de potabilidade exigindo ausência de *Escherichia coli* ou Coliformes termotolerantes em 100 mL. Com vistas a assegurar a eficiência para remoção de enterovírus, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. é recomendado para filtração rápida valores de turbidez inferiores a 0,5 UT em 95% dos dados mensais, e nunca superiores a 5,0 UT. Todavia, para cumprir tais normas torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas sensíveis e específicas para o monitoramento destes protozoários.

Processos convencionais de tratamento de água de efluentes contribuem para reduzir os microrganismos presentes na água, embora sua eficiência não seja a mesma para todos os protozoários (BETANCOURT e ROSE, 2004). As tecnologias mais comuns de tratamento de água incluem processos ou etapas como a coagulação/floculação, sedimentação, filtração e desinfecção.

Na etapa de desinfecção, organismos que não ficaram retidos nos processos anteriores são expostos a processos químicos ou físicos que têm o objetivo de torná-los inviáveis ou não infectantes. Destaca-se que, embora a desinfecção possa ser levada a ponto de esterilização, nem sempre se atinge a destruição completa dos microorganismos (MEYER, 1994).

Dos processos químicos, a substância desinfetante utilizada é o cloro. No início, o cloro era empregado na desinfecção de águas somente quando ocorriam epidemias. A partir de 1900 a cloração começou a ser empregada de maneira contínua (MEYER, 1994). Nas concentrações comumente utilizadas nos tratamentos convencionais de água, o cloro não apresenta taxas efetivas de inativação para oocistos de *Cryptosporidium parvum* (CAMPBELL, 1982, KORICH et al., 1990, FAYER et al., 1995, FINCH et al., 1997, VENCZEL et al., 1997). FAYER et al. (1995),

demonstraram em modelo animal, que oocistos ainda permaneciam infectivos após exposição a 5,25% de cloro. As concentrações efetivas são altas e requerem longo período de exposição, tornando o processo de desinfecção caro e tóxico (FAYER, 1997). CARPENTER et al. (1999), examinaram os efeitos do cloro sobre a viabilidade dos oocistos de *C. parvum*, simulando as condições usualmente encontradas em piscinas e águas recreacionais. Os valores de CT (Concentração x Tempo) são altos para obtenção de inativação e há resultados variáveis. Além disso, o CT tem seus valores alterados na presença de material fecal. Tal observação reforça o fato de que os oocistos se aderem às partículas orgânicas e ficam então protegidos da ação dos desinfetantes. A reatividade do cloro geralmente é menor em pH mais alto e temperatura mais baixa (MEYER, 1994, MACEDO, 2004). Nas estações de tratamento de água, a cloração pode ser realizada utilizando os derivados clorados inorgânicos (como hipoclorito de sódio, gás cloro e dióxido de cloro) ou orgânicos (cloraminas, especialmente monocloraminas) (MEYER, 1994, ANDRADE e MACEDO, 1996). As cloraminas também não apresentam taxas muito efetivas de inativação de oocistos de *C. parvum*. Da mesma maneira que o cloro, não alcançam mais que 1 log (90%) de inativação (KORICH et al., 1990, FINCH et al., 1997). KORICH et al. (1990), encontraram CT de 7.200 para o cloro e para a monocloramina. Contudo, em águas com teor de cloro residual, as cloraminas funcionam como uma fonte de cloro frente a qualquer substância oxidável que surgir na rede de abastecimento, como no caso de recontaminação. Isso se deve à instabilidade química das cloraminas, que reagem primeiro (MEYER, 1994). Outros estudos também mostram que a pré-cloração pode melhorar a inativação secundária das monocloraminas (FINCH et al., 1997, RENNECKER et al., 2000). Uma vantagem das cloraminas é que os subprodutos (ácido tricloroisocianúrico e dicloroisocianurato de sódio) da sua decomposição na água, apresentam toxicidade menor que o próprio princípio ativo. E não formam trihalometanos (THMs) em níveis considerados significativos (MACÊDO, 1997). Os THMs são formados pela reação do ácido hipocloroso com material orgânico natural (ROOK, 1979). Estas substâncias estão relacionadas a diversos tipos de câncer e por isso não podem estar presentes na água em concentração maior que 100µg/L, segundo a Portaria MS nº 518, Cap. IV, Art. 14. Pesquisa feita por FIGUEIREDO et al. (1999) mostrou que o cloro pode apresentar taxa de produção de THMs de 3,69 µg/L/h, sendo 4,7 vezes maior que a

taxa para cloraminas. Para controlar a formação de THMs, pesquisadores sugerem o uso de desinfetantes alternativos ao cloro, como dióxido de cloro e ozônio (PASCHOALATO et al., 2003). De qualquer modo, para se alcançar altos níveis de inativação de oocistos de *C. parvum*, também ocorrerá aumento dos riscos toxicológicos.

A taxa de inativação de oocistos de *C. parvum* com dióxido de cloro tem sido alvo de diversas pesquisas e apresenta resultados melhores que os do cloro (PEETERS et al., 1989, KORICH et al., 1990, FINCH et al., 1997, LIYANAGE et al., 1997, LI et al., 1998). KORICH et al. (1990), obtiveram CT de inativação de 78 (1,3 ppm por 60 minutos). RUFFELL et al. (2000), propõem valores mínimos de CT para 1 log (90%) de inativação de 71,2. Os valores de CT são dependentes da temperatura e do pH. Uma desvantagem do dióxido de cloro é a produção de cloritos e cloratos, além de outras espécies aniônicas. Estas substâncias ainda não têm seu efeito sobre a saúde completamente elucidado (MEYER, 1994).

O ozônio apresenta os melhores resultados de inativação de *C. parvum* em relação ao dióxido de cloro, cloro e cloraminas (KORICH et al., 1990, FINCH et al., 1997). Para inativação de 2 log (99%), PEETERS et al. (1989) obtiveram CT de 4,1 a 4,6 mg. min/L, PERRINE et al. (1990) obtiveram CT de 2,6 mg. min/L e KORICH et al. (1990) apresentaram um CT de 5 mg. min/L. FINCH et al. (1993), observaram inativação de 2 log (99%) com CT na faixa de 2 a 8 mg. min/L a 22°C e CT de 5 a 10 mg. min/L a 7°C, enquanto ROCHELLE et al. (2002) obtiveram 2,2 log (>99%) de inativação de oocistos de *C. parvum* expostos ao ozônio utilizando CT de 16 mg. min/L de ozônio e KEEGAN et al. (2003) obtiveram 2,19 log (>99%) com CT de 20 mg. min/L. Estudos feitos por RENNECKER et al. (2000) mostram que o pré-tratamento feito com ozônio diminui o valor de CT necessário para inativação secundária com cloro livre. O mesmo ocorre para a utilização de monocloramina como desinfetante secundário. Da mesma forma que aconteceu em outros estudos (RENNECKER et al., 1999, RUFFELL et al., 2000), a temperatura exerceu importante efeito sobre a cinética de inativação de oocistos de *C. parvum*. Porém, efeitos sinérgicos de desinfecção seqüencial foram observados em temperaturas mais baixas. Diferentes preparações de oocistos apresentam diferentes níveis de resistência ao ozônio. Isso se deve a variações nas cepas, técnicas de purificação ou ambos (RENNECKER et al., 1999). Estudos indicam que o aumento da temperatura

e tempo de armazenamento tem impacto significativo no número de oocistos viáveis. Entretanto, alguns oocistos de *C. parvum* permanecem infectantes por meses (WARE e SCHAEFER, 2005). Pesquisas têm mostrado que tratamento de pré-oxidação com ozônio leva a baixos níveis de THMs com demanda de cloro inalterada (GALLARD e VON GUNTEN, 2002). Segundo estudos de VON GUNTEN (2003), uma dose de 2,5 mg/L de ozônio reduziu em 70% a formação de THM. Isso ocorre porque o ozônio reage com o material orgânico natural e leva a uma remoção parcial dos precursores de THM. O problema do tratamento da água com ozônio é que ocorre produção de bromato, o qual representa risco à saúde devido ao seu potencial carcinogênico. Para minimizar a formação de bromatos medidas adicionais no tratamento da água têm sido investigadas, como pré-cloração e adição de amônia antes da aplicação do ozônio (BUFFLE et al., 2004).

3.4 Avaliação da viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium parvum*

A viabilidade de *Cryptosporidium parvum* pode ser avaliada por ensaios de desencistamento *in vitro*, coloração vital (DAPI/PI), infecção experimental em camundongos ou cultivo celular. Embora haja alguns autores que dizem que o desencistamento *in vitro* e a coloração vital superestimam a viabilidade dos oocistos de *C. parvum* (KORICH et al., 1990, FINCH et al., 1993, BLACK et al., 1996, BUKHARI et al., 2000), outros mostram que o desencistamento *in vitro* é uma alternativa adequada para avaliar os métodos de desinfecção. RENNECKER et al. (1999), mostraram que resultados de inativação com ozônio, obtidos pelo método de desencistamento *in vitro*, foram consistentes com os de infectividade animal observados em estudos anteriores. RUFFELL et al. (2000), obtiveram resultados de desencistamento *in vitro* condizentes com os resultados obtidos com infecção experimental por LIYANAGE et al. (1997) e LI et al. (1998) para avaliação da inativação de oocistos de *C. parvum* por dióxido de cloro. O mesmo foi observado por RENNECKER et al. (2000). JENKINS et al. (2002), observaram boa correlação entre inoculação em animal e cultivo celular, em múltiplos ensaios de viabilidade. ROCHELLE et al. (2002), também encontraram resultados equivalentes entre os dois métodos. Apesar do cultivo celular representar uma alternativa para comprovar a eficácia de processos de desinfecção, apresenta desvantagens como o custo mais

elevado, maior demanda de trabalho para sua execução e o tempo mais longo para se obter a resposta do teste.

Levando-se em conta as vantagens e desvantagens de cada método, foi escolhido o método de desencistamento *in vitro* na aferição da viabilidade dos parasitos neste trabalho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e purificação de oocistos de *Cryptosporidium parvum*

Foram realizados 250 exames de pacientes HIV-positivos e suspeita clínica de criptosporidiose, usando-se o método de coloração por fucsina ácida. Também foi realizada busca do parasito em bezerros neonatos. Foram examinadas 420 amostras de gado de corte procedentes da região de Guarapuava, Paraná. Os oocistos de *C. parvum* foram obtidos de fezes de bezerros neonatos infectados por via oral com uma solução aquosa de 10^6 oocistos, na UFMT (Dra. Márcia Benedita – Universidade Federal do Triângulo Mineiro). Os animais foram alimentados durante todo o período com leite de vaca desnatado (UHT). As fezes destes animais foram examinadas diariamente para a pesquisa de oocistos de *C. parvum*. Aquelas contendo oocistos foram diluídas em água, peneiradas (peneiras com malhas de 0,150; 0,053 e 0,037 mm), adicionadas de solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 2,5% e estocadas a 4°C até o momento do uso. A purificação dos oocistos foi realizada utilizando protocolos descritos por ORTEGA-MORA et al. (1992) com modificações segundo SILVA et al. (2000). Abaixo são descritas as etapas principais:

- Eliminar o $K_2Cr_2O_7$ mediante lavagem com PBS pH 7,2 - Tween 80 (PBS-T) a 2% (1.500 g por 10 minutos);
- Retirar a porção lipídica por suspensão em PBS-T/éter etílico 7:1 e centrifugação a 1.500 g por 10 minutos;
- Eliminar os resíduos de éter etílico por lavagens (três vezes) com PBS-T;
- Purificar os oocistos em gradiente descontínuo de sacarose, com soluções de densidade 1,05 g/mL e 1,15 g/mL e centrifugação a 1.500 g por 20 minutos à temperatura ambiente;
- Separar a banda rica em oocistos e eliminar dos restos de sacarose mediante lavagens (três vezes) com PBS pH 7,2 (1.500 g por 10 minutos);
- As bactérias remanescentes eram eliminadas por suspensão dos oocistos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e descanso por 10 minutos em banho de gelo;

- Lavar os oocistos (três vezes) com PBS (1.500 g por 10 minutos);
- Quantificar os oocistos em câmara de Neubauer utilizando como corante de contraste solução aquosa de verde malaquita a 0,17%.
- Estocar os oocistos em PBS com antibióticos, penicilina (500 UI/mL) e estreptomicina (0,024 mg/mL) e 0,01% de Tween 20 a 4°C.

4.2 Detecção molecular de *Cryptosporidium parvum* em água

Nesta etapa do trabalho são descritos a metodologia de extração de ácido desoxirribonucléico (DNA), a padronização da técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) e determinação de sua sensibilidade para detecção de *Cryptosporidium parvum* em água.

4.2.1 Extração de Ácido desoxirribonucléico (DNA)

Três métodos foram testados: método clássico, segundo SAMBROOK (1989), método proposto por WEISS (1993) e modificado, e associação dos métodos acima citados com aplicação de ultra-som.

A extração de DNA para a execução da PCR teve quatro passos básicos: lise celular, desproteinização, concentração e quantificação do DNA extraído.

Lise celular – Para a lise da parede dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* foram testados três protocolos. No primeiro foram realizados três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido a -196°C por 5 minutos e descongelamento a 37°C por 5 minutos. No segundo protocolo a ruptura celular foi feita com tampão de lise contendo β -mercaptoetanol [100 μ L de 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) + 100 μ L 50 mM EDTA (pH 8,0) + 50 μ L SDS a 10% + 3,5 μ L 70 mM β -mercaptoetanol] e enzimas (lisozima, proteinase K e RNAse). No terceiro protocolo foi acrescentada uma fase de ruptura celular por ultra-som com cinco ciclos de 30 segundos a 50 Hz (Anexo 1), seguido de digestão com lisozima (100 mg/mL), RNAse (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL).

Desproteínização – Os ácidos nucleicos são moléculas predominantemente hidrofílicas e facilmente solúveis em água. As proteínas, no entanto, contêm diversos resíduos hidrofóbicos que são parcialmente solúveis em ácidos orgânicos. Para a completa remoção destes resíduos foi empregada uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (Anexo1).

Concentração – O DNA é uma molécula de alto peso molecular, para promover sua concentração, foram usadas soluções de acetato de sódio (3 M) e etanol puro. Nas lavagens subseqüentes usou-se etanol a 70%. O DNA foi eluído com 100 µL de tampão TEN (Tris-EDTA-NaCl).

Dosagem do DNA – A última etapa da purificação do DNA foi a verificação do rendimento e pureza. As ferramentas usadas foram: quantificação em gel de agarose a 0,8% e espectrometria (GeneQuant®). O DNA tem uma absorvância máxima em 260 nm e mínima em 234 nm. Proteínas têm absorção máxima em 280 nm devido à presença de resíduos de tirosina e triptofano. Para determinar a concentração de proteína contaminante no DNA foi feita uma leitura a 280 nm. A avaliação da relação A_{260}/A_{280} foi feita para determinar o grau de pureza do DNA extraído. O DNA extraído foi mantido a temperatura de 4°C até sua utilização.

4.2.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Cinco pares de *primers* ou iniciadores (Tabela 4) previamente descritos (LAXER et al., 1991, AWAD-EL-KARIEM et al., 1994, SPANO et al., 1998, XIAO et al., 1999) foram avaliados para amplificação de *Cryptosporidium* spp. (AWA995F/AWA1206R, CRY15F/CRY9R, XIAOF/XIAOR e XIAO2^aPCR/XIAO2^aPCR1) e *C. parvum* (LAX469F/LAX869R). Parâmetros como concentração de DNA molde, concentração de cloreto de magnésio e temperatura de anelamento foram avaliados para padronização da PCR.

Visando aumentar a sensibilidade da técnica foi feito PCR de PCR usando como DNA molde 5 µL da primeira PCR. Nas duas etapas de PCR foram usados os mesmos pares de iniciadores. Para melhorar ainda mais a sensibilidade passou-se a trabalhar com a técnica de Nested-PCR. Esta técnica se baseia na amplificação

primária de um fragmento de DNA com um determinado par de iniciadores. Em seguida, faz-se uma amplificação secundária de um fragmento interno ao que foi amplificado na primeira PCR, usando um par de iniciadores diferente do primeiro. O segundo par de iniciadores sempre amplifica uma seqüência menor que o primeiro par. No presente trabalho, utilizou-se na primeira PCR o par de iniciadores XIAOF/XIAOR, e na segunda os iniciadores internos AWA995F/AWA1206R para identificação do gênero e LAX469/LAX869 ou CRY15F/CRY9R para a identificação da espécie *C. parvum*.

As condições de amplificação do DNA são dadas nas Tabelas 5 e 6.

TABELA 4 – LISTA DE PRIMERS (INICIADORES) TESTADOS NAS REAÇÕES DE PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE *Cryptosporidium* spp. E *C. parvum*

Iniciador (primer)	Localização gênica	Seqüência 5'-3'	No. Bases	Fragmento amplificado
CRY15F	COWP	GTAGATAATGGAAGAGATTGTG	22	550 bp
CRY9R	COWP	GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG	25	550 bp
AWA995F	18SSU-rDNA	TAGAGATTGGAGGTTGTTCCCT	21	211 bp
AWA1206R	18SSU-rDNA	CTCCACCAACTAAGAACGGCC	21	211 bp
LAX469F	18SSU-rDNA	CCGAGTTTGATCCAAAAAGTTACGAA	26	451 bp
LAX869R	18SSU-rDNA	TAGCTCCTCATATGCCTTATTGAGTA	26	451 bp
XIAOF	18SSU-rDNA	TTCTAGAGCTAATACATGCG	20	1325 bp
XIAOR	18SSU-rDNA	CCCATTTCTTCGAAACAGGA	21	1325 bp
XIAO 2ªPCR	18SSU-rDNA	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	26	826-864 bp
XIAO 2ªPCR1	18SSU-rDNA	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	22	826-864 bp

TABELA 5 – COMPONENTES DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS EM UMA REAÇÃO DE PCR

Componentes	Concentração estoque	Volume na reação (µL)	Controle negativo da reação
Tampão	10X	2,5	2,5
dNTP MIX	2,5 mM	1	1
Primer1	5 ng/µl	0,5	0,5
Primer2	5 ng/µl	0,5	0,5
MgCl ₂	X mM	A ser determinada	A ser determinada
Taq polimerase	5 U/µL	0,5	0,5
DNA	---	A ser determinada	0
Água ultrapura	---	q.s.p.	q.s.p.
Total	---	25	25

TABELA 6 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA OS DIFERENTES INICIADORES PARA *Cryptosporidium* spp. E *C. parvum*

Número de ciclos	Temperatura/Tempo CRY15F/CRY9R	Temperatura/Tempo AWA995F/ AWA1206R	Temperatura/Tempo LAX469F/LAX869R	Temperatura/Tempo XIAOF/XIAOR
1 ciclo	94°C / 3 min. 94°C / 1 min.	95°C / 5 min. 94°C / 1 min.	95°C / 7 min. 94°C / 1 min.	94°C / 3 min. 94°C / 45 seg.
35 ciclos	65°C / 1 min. 72°C / 1 min.	54°C / 1 min. 72°C / 2 min.	52°C / 1 min. 72°C / 2 min.	55°C / 45 seg. 72°C / 1 min.
1 ciclo	72°C / 10 min.	72°C / 7 min.	72°C / 10 min.	72°C / 10 min.

Após a fase de extensão final o termociclador (ThermoHybaid®) foi programado para manter a temperatura a 4°C por uma a 10 horas. O produto da amplificação foi armazenado a 4°C até a eletroforese em gel de agarose.

4.2.3 Eletroforese em gel de agarose

Para determinar a quantidade aproximada de DNA, após o processo de extração foi usada agarose na concentração de 0,8%. Para avaliação dos produtos amplificados após a PCR, a concentração de agarose foi de 1,6%. Os produtos de amplificação eram aplicados no gel (10 ou 15 µL), acrescido de 2 µL de bromofenol, e submetidos a corrente elétrica (60V para os géis pequenos e 110 a 120 V para os géis grandes – fonte de eletroforese BIO-RAD) numa cuba de eletroforese (HORIZON® 58 ou HORIZON® 20•25).

O tempo de corrida eletroforética para separação das bandas dependia da concentração de agarose no gel e do tamanho da cuba (30 minutos a 4 horas). Após a separação dos produtos de PCR por eletroforese o DNA foi corado com brometo de etídio diluído a 1/20.000 em Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X, com concentração final de 0,5 µg/mL. Os géis eram visualizados em fonte ultravioleta a 365 nm (Life Technologies™) e fotodocumentados (Polaroid Gel Cam®).

4.2.4 Determinação da sensibilidade da PCR

Amostras nas concentrações de um a 10⁶ oocistos foram submetidas ao processo de extração de DNA e depois, à PCR específica para avaliação da sensibilidade.

A determinação das amostras de 10^6 a 10^2 oocistos foi realizada por contagem em câmara de Neubauer e diluição sucessiva, após filtração do material. As amostras contendo 10 formas parasitárias foram obtidas da seguinte maneira: Gotas de 4 a 10 μL de suspensão com 10^2 oocistos/mL foram distribuídas com espaçamento mínimo de 1,5 cm em placa de Petri. A placa foi levada ao microscópio invertido para visualização das gotas e aquelas contendo 10 oocistos de *Cryptosporidium parvum* foram selecionadas.

O mesmo procedimento foi repetido para obtenção de uma única forma parasitária, utilizando suspensão original com concentração < 50 oocistos/mL. Cada gota contendo o número de formas parasitárias desejado foi individualmente aspirada e transferida para um microtubo de 2,0 mL. No local aplicou-se 10 μL de PBS-T, para lavagem por aspiração, de 3 a 5 vezes, novamente transferindo-se o conteúdo para o mesmo microtubo.

Os microtubos contendo as quantidades determinadas de oocistos foram centrifugados duas vezes com água ultrapura esterilizada e o sedimento submetido à técnica de extração de DNA.

4.3 Metodologia de desencistamento para determinação da viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium parvum*

As amostras contendo oocistos de *C. parvum* foram submetidas ao método de desencistamento proposto por HOU et al. (2004). Amostras contendo aproximadamente 10^5 oocistos foram colocadas em microtubos de 1,5 mL e centrifugadas 11.000 g por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, deixando-se cerca de 100 μL de sedimento. Esse material foi incubado com 1,0 mL de PBS pH 3,8 a 37°C por 30 minutos. Centrifugou-se então por 10 minutos a 11.000 g, retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se a solução de desencistamento, composta por 200 μL de solução de Hanks, 400 μL de bile bovina a 1% e 50 μL de solução de NaHCO_3 a 0,44%. O material ficou a 37°C “overnight”. Centrifugou-se novamente, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi suspenso em 100 a 200 μL de solução de desencistamento, homogeneizado por agitação e examinado entre lâmina e lamínula, em microscópio (Olympus BX41) com iluminação de contraste de fase.

Foi realizada a contagem de 200 a 300 formas parasitárias, aplicando-se a seguinte fórmula para cálculo de viabilidade, expressa posteriormente em percentagem:

$$\frac{OD + PD}{T}$$

Onde:

OD - número de oocistos desencistados;

PD - número de oocistos parcialmente desencistados;

T - soma de todas as formas, incluindo OD, PD e os oocistos intactos.

A eficiência dos métodos de desinfecção foi avaliada pelos valores de CT e regressão linear do número de oocistos viáveis em função dos valores de CT. O cálculo do CT foi realizado através da multiplicação do tempo necessário de contato do desinfetante com os oocistos e da concentração do desinfetante. A regressão linear foi feita utilizando-se o programa Origin 7.0.

4.4 Métodos químicos para inativação de *Cryptosporidium parvum* em água

4.4.1 Desinfecção por ácido hipocloroso

Foi testado o efeito da concentração de 2 ppm de cloro livre sobre a viabilidade de oocistos de *C. parvum* em água. Esta concentração foi utilizada por ser a mesma usada em uma estação convencional de tratamento de água, pois é suficiente para garantir o residual mínimo de 0,2 ppm exigido pela Portaria MS nº 518 (Cap. IV, Art. 13).

A solução de cloro foi preparada a partir de solução de ácido hipocloroso, adicionada ao tampão fosfato (concentração final 0,01 M, pH 7,5), preparado com água ultrapura. O cloro livre foi aferido por método colorimétrico usando-se NNN-dietilphenilenodiamina (DPD Reagente para cloro livre, Permachem Reagentes) (APHA, 1999). Foram também realizadas as medições de pH, turbidez, alcalinidade e temperatura.

O ensaio de desinfecção de água contendo oocistos de *C. parvum*, por ácido hipocloroso, foi realizado em balão volumétrico de 2 L, contendo solução tamponada (pH 7,5) preparada em água ultrapura. Foi então adicionado 1 mL de suspensão de oocistos contendo 4×10^7 parasitos (concentração final de 2×10^4 oocistos/mL).

Nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos, 200 mL da suspensão foram retirados e transferidos para um béquer, onde foram acrescentados 4 mL de tiosulfato de sódio a 1% (proporção de 5 a 10 ppm de tiosulfato de sódio para cada 1ppm de cloro), para suspender a ação do cloro. Nestes tempos determinados, foi realizada a dosagem do cloro livre para correção da demanda de cloro de modo a restituir as concentrações ao nível de 2 ppm (concentração inicial).

4.4.2 Desinfecção por dióxido de cloro

Foi testado o efeito das concentrações de 1, 2 e 5 ppm de dióxido de cloro na água sobre a viabilidade de oocistos de *C. parvum*. As concentrações trabalhadas estão dentro da faixa citada na literatura (DI BERNARDO e DANTAS, 2005). As soluções de dióxido de cloro foram preparadas a partir de solução concentrada do produto (1.300 a 1.500 ppm) (gentilmente cedida por EKA Chemicals do Brasil S.A.), diluída em tampão fosfato, concentração final 0,01 M, preparada em água ultrapura, com pH 7,0. A concentração de dióxido de cloro foi aferida por método colorimétrico usando-se NNN-dietilphenilenodiamina (DPD Reagente para cloro livre, Permachem Reagentes) (APHA, 1999).

Cada ensaio de desinfecção de água contendo oocistos de *C. parvum* por dióxido de cloro foi realizado separadamente, em volume de 1 L em balão volumétrico. A concentração do parasito foi de 2×10^4 oocistos/mL, similares à concentração listada na literatura (CHAURET et al., 2001).

Após 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, foram retirados do frasco 100 mL da solução, separando-se 30 mL para medição do pH e depois para aferição da concentração de dióxido de cloro. Aos 70 mL restantes adicionou-se solução de tiosulfato de sódio a 1% (proporção de 5 a 10 ppm de tiosulfato de sódio para cada 1ppm de cloro), para suspender a ação do cloro.

4.4.3 Desinfecção por ozônio

O ozônio foi gerado a partir de oxigênio puro utilizando-se um gerador de ozônio (modelo OKTEC[®]) cedido gentilmente pela empresa Diagtech. Foi aplicado na amostra, por meio de um difusor de bolhas, nas concentrações de 0,1; 0,45 e 0,7 mg/L

Os ensaios de desinfecção por ozônio foram realizados, primeiramente, em provetas de 1 L (sistema aberto). Os experimentos foram realizados em triplicata. O volume de água ultrapura foi de 800 mL contendo 2×10^4 /mL oocistos de *C. parvum*.

Posteriormente, para controlar a entrada de ozônio e evitar efeitos de flutuação na concentração do mesmo, o experimento foi realizado em balão volumétrico pirex de 1 L (sistema fechado) e com agitação no interior do reator. O volume de água ultrapura foi de 500 mL contendo 2×10^4 oocistos/mL de *C. parvum*, em experimento realizado em triplicata. As concentrações de ozônio foram ajustadas para 0,18; 0,24; 0,36; 0,48 e 1,44 mg/L. A concentração de ozônio foi medida em cada experimento pelo método azul de trissulfonato (CHIOU et al., 1995).

4.5 Concentração dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* após os métodos de desinfecção química

Após o ensaio de desinfecção com ácido hipocloroso, dióxido de cloro e ozônio, cada amostra foi imediatamente filtrada em aparelho da Millipore[™] (Millipore Filter Holder part # 4), contendo membrana filtrante de acetato celulose de diâmetro 47 mm e porosidade 0,8 μ m, sob pressão negativa de 10 a 15 cmHg (Figura 2). A membrana foi retirada e depositada em embalagem plástica com PBS-T para recuperação dos oocistos por fricção. As amostras foram centrifugadas a 1.000 g por 15 minutos e o sedimento submetido ao desencistamento segundo o protocolo de HOU et al. (2004).

O decréscimo da viabilidade foi avaliado com base em amostras controle mantidas na solução tamponada, com adição de tiosulfato de sódio a 1%, porém sem a aplicação dos desinfetantes. As amostras controle foram submetidas a todas as etapas de concentração que as amostras testes. Considerou-se a viabilidade obtida como 100%.

FIGURA 2 – APARELHO USADO PARA FILTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUA PARA CONCENTRAÇÃO DOS OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*



4.6 Medidas de segurança para organismos patogênicos

Como as infecções experimentais foram realizadas em bezerros neonatos, foi submetido ao comitê de ética animal o projeto “Frequência e caracterização genética da criptosporidiose bovina na região do Triângulo Mineiro – MG” que foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) em 21/03/2005, Protocolo CEUA UFTM nº 011.

Para coleta de fezes proveniente de humanos o projeto foi aprovado no comitê de ética junto ao Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da UFPR, Protocolo CEH HC nº 128.

Antes de ser descartada, a água contaminada experimentalmente que sobrou dos testes de desinfecção foi submetida à esterilização em autoclave, a temperatura de 121°C por 30 minutos. Toda vidraria e aparatos usados durante os experimentos foram submetidos à esterilização por calor ou química.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e purificação de oocistos de *Cryptosporidium parvum*

Os resultados dos exames realizados em amostras de pacientes humanos HIV-positivos e suspeita clínica de criptosporidiose e dos bezerros neonatos procedentes da região de Guarapuava, foram todos negativos. Para avaliar o efeito dos desinfetantes sobre oocistos de *C. parvum*, os mesmos foram obtidos a partir de infecções experimentais em bezerros neonatos para chegar às concentrações necessárias para os diferentes experimentos. A infecção experimental foi realizada na Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) em 21/03/2005. Protocolo CEUA UFTM nº. 011).

Nos últimos anos muitos são os trabalhos demonstrando prevalência deste protozoário em diferentes regiões do país. Um dos primeiros é realizado em Belém, Pará, onde LOUREIRO et al. (1990) estudando a ocorrência de criptosporidiose em crianças, encontraram prevalência de 5,2%. NEWMAN et al. (1994) estudaram a epidemiologia da criptosporidiose em uma comunidade de Fortaleza e verificaram que 94% das pessoas estudadas apresentavam anticorpos (IgG e IgM) para *Cryptosporidium* spp. Em Campinas, São Paulo, FRANCO e CORDEIRO (1996) observaram prevalência de 6,4% de *C. parvum* em crianças de creches. Em Uberlândia, Minas Gerais, em estudo realizado com crianças de 0 a 12 anos, observou-se prevalência de criptosporidiose de 4,26% e que as infecções apresentaram variação sazonal (GENNARI CARDOSO et al., 1996). MOITINHO et al. (1997) observaram a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em 6,6% de amostras de fezes de crianças de Maringá, no Paraná. Segundo OSHIRO et al. (2000), a prevalência de *C. parvum* em crianças menores de cinco anos, na zona urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, é de 1,1%. Num estudo com crianças portadoras de gastroenterite aguda em Ribeirão Preto, São Paulo, observou-se prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 1,8% (MEDEIROS et al., 2001). Em um estudo com crianças em uma escola de educação infantil de São Paulo, em 2001, 20,3% foram positivas para *Cryptosporidium* spp. (CARVALHO-ALMEIDA et al.,

2006). GONÇALVES et al. (2006) detectaram 12,9% de crianças infectadas com *Cryptosporidium* spp. num surto diarréico em creche de São Paulo, ocorrido em 2001. PEREIRA et al. (2002) detectaram prevalência de *C. parvum* de 18,7% em crianças abaixo de 10 anos, hospitalizadas por diarréia em Goiânia, Goiás. Além disso, também demonstraram que fatores intra e extra-familiar têm relevância na infecção.

No presente estudo, todas as amostras de humanos examinadas foram negativas. Seria esperado que pacientes HIV-positivos com suspeita de criptosporidiose, confirmassem esta suspeita nos exames, através do achado de oocistos. A negatividade das amostras pode ser explicada pelo tratamento com antiretrovirais e nitazoxanide, que diminuem a eliminação dos oocistos.

Quanto à criptosporidiose animal, LALLO e BONDAN (2006) demonstraram prevalência de *C. parvum* de 9,5% na população canina de São Paulo entre 2003 e 2004. GARCIA e LIMA (1993), detectaram 27,87% de positividade para *Cryptosporidium* sp. em amostras de fezes diarréica e não diarréica, de bezerros em Minas Gerais. O parasito foi encontrado em 74% das propriedades estudadas, evidenciando ampla distribuição do mesmo. MAIA et al. (1995), encontraram 27,1% de bezerros positivos para *C. muris* e 6,6% de vacas positivas para *C. parvum*, em propriedades de gado leiteiro e de corte em Montes Claros, Minas Gerais. QUADROS (2002), estimou média de 17% dos bovinos analisados como positivos para *Cryptosporidium* spp., em propriedades de Lages, Santa Catarina. A presença de oocistos variou de 10,16 a 23,84%. FEITOSA et al. (2004), encontraram valores positivos de 10,26% pelo ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) e 12,4% pelo teste de Sheather, para amostras fecais de bezerros em propriedades leiteiras na região de Araçatuba, São Paulo. EDERLI et al. (2004), encontraram 43,6% de positividade para *Cryptosporidium* em bezerros na microrregião de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. Também evidenciaram a ampla distribuição do parasito, onde em 96,3% das propriedades visitadas foram encontradas amostras de bezerros com a presença de oocistos de *Cryptosporidium*. No Canadá, McALLISTER et al. (2005) detectaram prevalência global de *Cryptosporidium* spp. de 13% em bovinos. Análises de amostras fecais por meio de PCR mostraram prevalência de 26% de *Cryptosporidium* spp. Apenas um isolado se tratava de *C. hominis* e a maioria dos genótipos isolados não são encontrados normalmente em humanos (RYAN et al.,

2005). Em um estudo na Malásia, FARIZAWATI et al. (2005), encontraram 98% de positividade para *Cryptosporidium* spp. em amostras de esgoto oriundo de bovinos, com concentrações entre 20 a $3,1 \times 10^3$ oocistos/mL. Esta alta prevalência do protozoário entre bovinos e a detecção de oocistos em amostras de água de rio mostram a possibilidade de bovinos serem fonte de contaminação de rios com oocistos de *Cryptosporidium*, o que representa risco à saúde humana, uma vez que pessoas podem fazer uso de água desses rios contaminados.

Ainda se faz necessário que sejam implementadas pesquisas, em todos os estados brasileiros, usando a mesma metodologia, a mesma faixa etária para determinar a taxa de prevalência em humanos, animais domésticos, silvestres e aquáticos e conhecer o verdadeiro risco da criptosporidiose em nosso meio.

5.2 Padronização da detecção molecular de *Cryptosporidium parvum* em água

5.2.1 Extração de DNA

O método de extração de DNA usando ultra-som e enzimas para a lise da membrana celular e digestão de proteínas e RNA apresentou maior concentração de DNA e melhor razão na relação A_{260}/A_{280} entre os três métodos empregados (Tabelas 8, 9 e 10), produzindo portanto, DNA de melhor qualidade. Para a dosagem de DNA, foram realizadas três repetições de cada concentração de oocistos para os três métodos de extração testados. A variação nas concentrações de DNA apresentadas se deve à oscilação do próprio espectrofotômetro (GeneQuant®) e ao lote de oocistos utilizado.

Uma das etapas principais da técnica de PCR é a obtenção de DNA de boa qualidade. Duas foram as dificuldades encontradas para trabalhar com oocistos de *Cryptosporidium* spp. Primeira, a parede dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. tem dupla membrana com espessura de 40 nm (HARRY e PETRY, 1999), o que os torna resistentes ao rompimento e liberação do DNA. Segunda dificuldade é que oocistos são formas encontradas em fezes, solo ou água o que dificulta o processo de isolamento e purificação de DNA, limitando a sensibilidade do método de PCR. Muitos são os contaminantes inibidores da técnica de PCR entre eles são citados

carboidratos e produtos químicos (HIGGINS et al., 2001). Nas amostras de água com alta turbidez há a necessidade de purificação extra antes da PCR (RIMHANEN-FINNE et al., 2002).

TABELA 7 – DOSAGEM POR ESPECTROFOTOMETRIA DE DNA EXTRAÍDO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*, EMPREGANDO ULTRA-SOM E ENZIMAS

Quantidade de oocistos	Absorbância a 260 nm	Razão A_{260}/A_{280}	Conc. de DNA ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,013	1,929	6,90
10	0,030	2,378	18,00
100	0,070	2,100	7,50
1000	0,060	2,891	3,90
10000	0,030	1,440	3,60
100000	0,050	2,475	17,50
1000000	0,070	1,483	12,50

TABELA 8 – DOSAGEM POR ESPECTROFOTOMETRIA DE DNA EXTRAÍDO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*, EMPREGANDO SOMENTE ENZIMAS

Quantidade de oocistos	Absorbância a 260 nm	Razão A_{260}/A_{280}	Conc. de DNA ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,013	2,308	6,90
10	0,050	3,583	2,20
100	0,010	0,791	0,70
1000	0,010	2,504	10,90
10000	0,030	3,636	10,70
100000	0,070	0,750	1,60
1000000	0,080	3,356	4,80

TABELA 9 – DOSAGEM POR ESPECTROFOTOMETRIA DE DNA EXTRAÍDO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*, EMPREGANDO CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO

Quantidade de oocistos	Absorbância a 260 nm	Razão A_{260}/A_{280}	Conc. de DNA ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,020	1,635	0,18
10	0,070	0,864	0,60
100	0,050	1,838	0,80
1000	0,020	2,670	0,50
10000	0,050	3,127	0,90
100000	0,060	3,424	0,80
1000000	0,070	2,956	0,90

Para avaliar a melhor técnica de extração, controles positivos (*spiking*) foram acompanhados microscopicamente a cada etapa da extração e verificou-se que o simples congelamento e descongelamento ou poucos ciclos de ultra-som não rompem a parede cística. São necessários primeiramente pelo menos cinco ciclos de ultra-som para romper oocistos de *C. parvum*, seguidos de dois ciclos de três congelamentos a -196°C e descongelamentos a 37°C . O primeiro ciclo deve ser realizado antes da incubação em tampão de lise TEM (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8,0) e o segundo após a digestão com lisozima, SDS, Proteinase K e RNase.

Uma vasta literatura é encontrada propondo diferentes protocolos de extração de DNA para *Cryptosporidium* spp. Os princípios dos métodos são: 1) químicos, usando digestão alcalina e fenol/clorofórmio (XIAO et al., 2002, JIANG e XIAO, 2003, ALVES et al., 2003), hipoclorito de sódio e Chelex-100; 2) métodos físicos usando pérolas de zircônia com sílica ativada ou pérolas de vidro com sílica ativada (McLAUHLIN et al., 1999); ou por choque térmico congelamento/descongelamento (BLEARS et al., 2002) 3) associação de princípios físicos e químicos (ENEMARK et al., 2002). A maioria dos protocolos usa *kits* como QIAmp tissue purification (MORGAN et al., 1998, WARD et al., 2002), GeneClean Bio101 (SPANIO et al., 1998), *kit* de separação imunomagnética Dynabeads (WU et al., 2000), High Pure Template preparation *kit* (TANRIVERDI et al., 2002). JINAG et al. (2004), avaliaram seis *kits* diagnósticos para extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. e relataram que o uso de *kit* para extração de DNA aumenta a sensibilidade das técnicas

moleculares. Além do uso do *kit*, muitos pesquisadores ainda associam outros componentes como soroalbumina bovina (BSA) e dimetilsulfóxido (DMSO) (ZHOU et al., 2003, JELLISON et al., 2004), testemunho da dificuldade que é a obtenção de DNA purificado para o uso em métodos moleculares.

5.2.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Para o par de iniciadores gênero-específico AWA995F/AWA1206R, que amplificou um fragmento de 211 bp, foram observadas bandas amplificadas de DNA quando se utilizaram amostras com 10^3 e 10^5 oocistos de *C. parvum*.

Para o par de iniciadores espécie-específico LAX469F/LAX869R, que amplificou um fragmento de 451 bp, foram observadas bandas amplificadas de DNA quando se utilizou amostra com 10^5 oocistos de *C. parvum*. Na figura 3 são demonstradas as ampliações para os iniciadores AWA995F/AWA1206R e LAX469F/LAX869R.

Para o par de iniciadores CRY15F/CRY9R, que amplificou um fragmento de 550 bp, foram observadas bandas amplificadas de DNA quando se utilizou amostra com 10^5 e 10^6 oocistos de *C. parvum* (Figura 4).

FIGURA 3 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE *Cryptosporidium parvum*. COLUNA1, PM-PADRÃO DE PESO MOLECULAR 100 BP; COLUNAS 2 A 4, PRIMER AWA (GÊNERO-ESPECÍFICO): 2, (10^3 OOCISTOS); 3, (10^2 OOCISTOS); 4, (10^5 OOCISTOS); COLUNAS 5 A 8, PRIMER LAX (ESPÉCIE-ESPECÍFICO): 5, (10^2 OOCISTOS); 6, (10^3 OOCISTOS); 7, (10^4 OOCISTOS) E 8, (10^5 OOCISTOS)

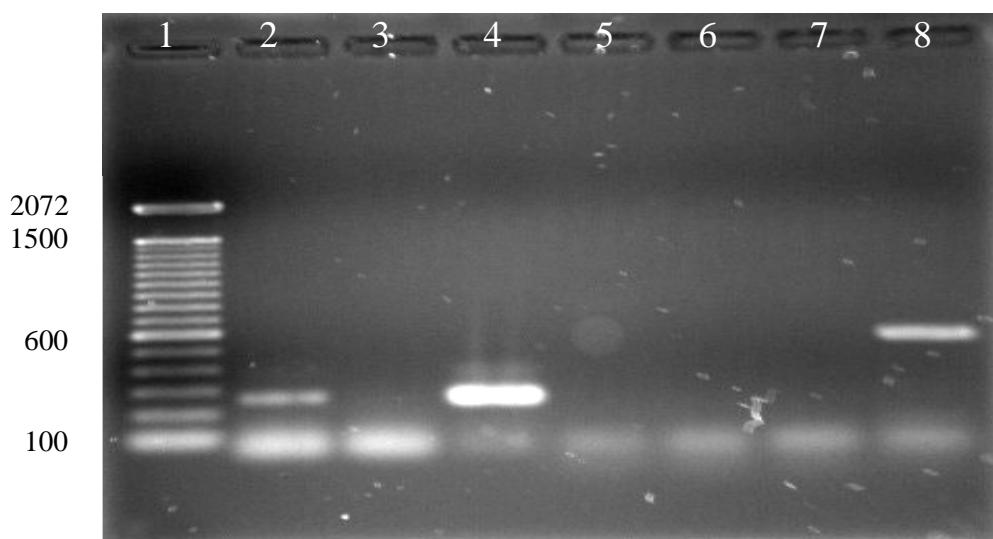
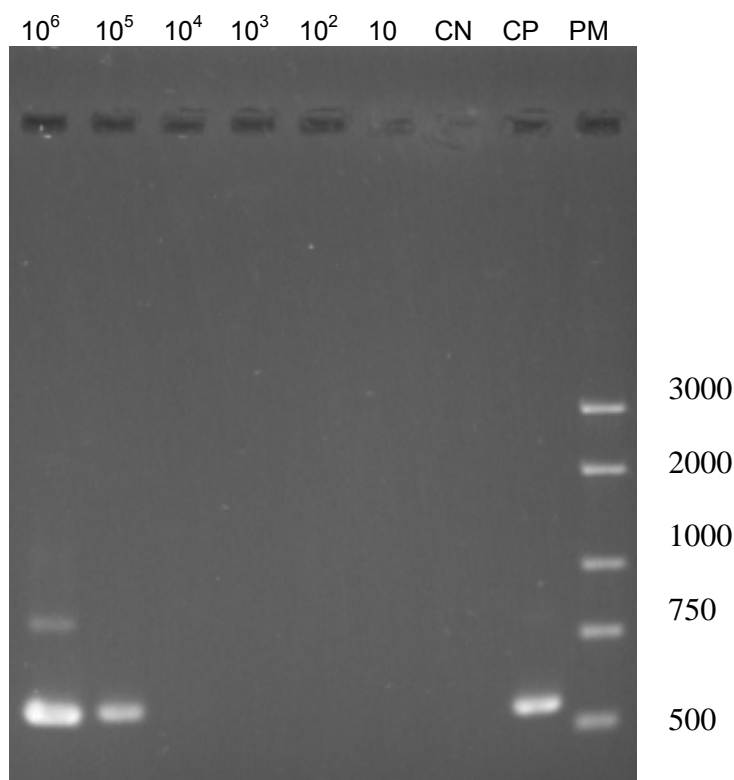
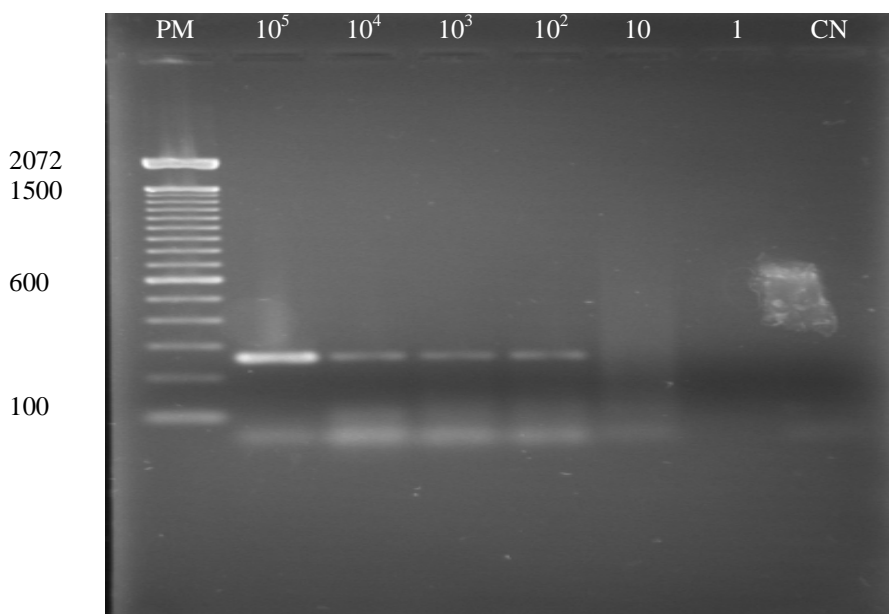


FIGURA 4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO ESPECÍFICO DE *Cryptosporidium parvum* EM AMOSTRAS DE ÁGUA CONTAMINADAS COM DIFERENTES QUANTIDADES DE OOCISTOS. CN, CONTROLE NEGATIVO (SEM DNA); PM, PADRÃO DE PESO MOLECULAR; CP, CONTROLE POSITIVO. O PAR DE INICIADORES USADO PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA FOI CRY15F/CRY9R



A técnica PCR de PCR não melhorou a sensibilidade da PCR simples. Desta maneira passou-se a trabalhar com a técnica de Nested-PCR usando como iniciador, na primeira PCR o par de iniciadores XIAOF/XIAOR e na segunda PCR, o par de iniciadores AWA995F/AWA1206R. A Nested-PCR permitiu melhora na sensibilidade sendo possível detectar até 10² oocistos de *C. parvum* (Figura 5).

FIGURA 5 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO A PARTIR DE NESTED-PCR COM OS PRIMÉRS XIAOF/XIAOR E AWA995F/AWA1206R COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*. PM, PADRÃO DE PESO MOLECULAR 100 BP; CN, CONTROLE NEGATIVO



A sensibilidade das técnicas moleculares é na atualidade a grande preocupação dos pesquisadores, pois somente com técnicas altamente sensíveis e de rápida execução é que se poderá ter melhor controle da água que bebemos. Pode-se aumentar a sensibilidade se aumentarmos o número de amostragens ou de coleta (SAVIOLI et al., 2006). Usar métodos específicos como os imunológicos ou os moleculares isoladamente ou de forma complementar pode melhorar a qualidade do diagnóstico do parasito em água ou solo. Vários são os critérios citados na literatura para obter melhoria na sensibilidade e especificidade. Entre estes, estão o uso de métodos que maximizem a extração de DNA e minimizem os efeitos inibidores na Taq polimerase ou separação imunomagnética (IMS), que aumenta o número de oocistos recuperados e os concentra em um tampão livre de inibidores da Taq polimerase. Porém para *Cryptosporidium* spp. não existe disponível comercialmente um *kit* de IMS espécie-específico para detecção de anticorpos que reconheçam os epítomos de todos os oocistos de *C. parvum* e *C. hominis* que parasitam humanos. Número baixo de oocistos presentes nas amostras requer o uso de métodos como o Nested-PCR ou PCR em tempo real. Água e alimentos contêm muitos outros

organismos que normalmente não são encontrados nas fezes. Apesar de criteriosa escolha de iniciadores e a minimização dos efeitos inibitórios, não pode ser descartada a possibilidade de haver contaminantes que podem ser amplificados por estes iniciadores. Alguns iniciadores de *Cryptosporidium* amplificam DNA genômico de *Eimeria acervulina*, da mesma forma que hibridizam amplicons de *E. acervulina* com DNA de *Giardia duodenalis*. Quando possível, os alvos moleculares para uso em PCR devem ser escolhidos entre aqueles que já foram utilizados com sucesso em estudos epidemiológicos ou taxonômicos e cujas seqüências tenham sido validadas por vários centros de pesquisa (Tabelas 3 e 4). Comparações de métodos publicados são difíceis porque existem métodos não padronizados para extração de DNA e outros que não levam em conta os efeitos inibitórios para Taq polimerase. A inclusão de controles positivos aumenta o nível de confiança obtido quando os resultados são negativos. O uso de iniciadores espécie-específicos (particularmente daqueles de espécies e genótipos conhecidos que infectam humanos) e iniciadores para subgenotipagem, melhora a sensibilidade. Nesse contexto, o uso de microarranjo para determinar todas as espécies, genótipos presentes em ambientes individuais e amostras fecais vem como nova tecnologia (WEISS, 1993, LABERGE et al., 1996, CAMPBELL e SMITH, 1997, KAUCNER e STINNEAR, 1998, NICHOLS et al., 2000, STRAUB et al., 2002, NICHOLS e SMITH, 2003, OURA et al., 2004, JIANG et al., 2005, CACCIÒ et al., 2005, SMITH et al., 2006).

A sensibilidade da técnica de PCR para detecção de DNA de *Cryptosporidium* spp. vem sendo discutida por diferentes autores. ROCHELLE et al. (1997) analisaram os iniciadores LAX469F/869R e AWA995F/1206R e foram capazes de detectar sinais de amplificação (bandas) quando usados 500 e 5.000 oocistos em amostras contaminadas experimentalmente, independente do par de iniciadores empregado. Para melhorar a sensibilidade da técnica os autores propuseram a técnica de *slot blot*. WARD e WANG (2001), ao avaliarem a sensibilidade da técnica, demonstram que ela está relacionada com o método de extração de DNA e que necessita de 10^4 oocistos para ter sinais de amplificação em amostras cujo DNA seja extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Quando usa *spin columns* ou *glass milk* a metodologia é capaz de detectar 100 oocistos. HANNINEN (2006) usando o par de *primers* CRY15F/CRY9R associando a prova de hibridização foram capazes de detectar 125 oocistos em amostras de água.

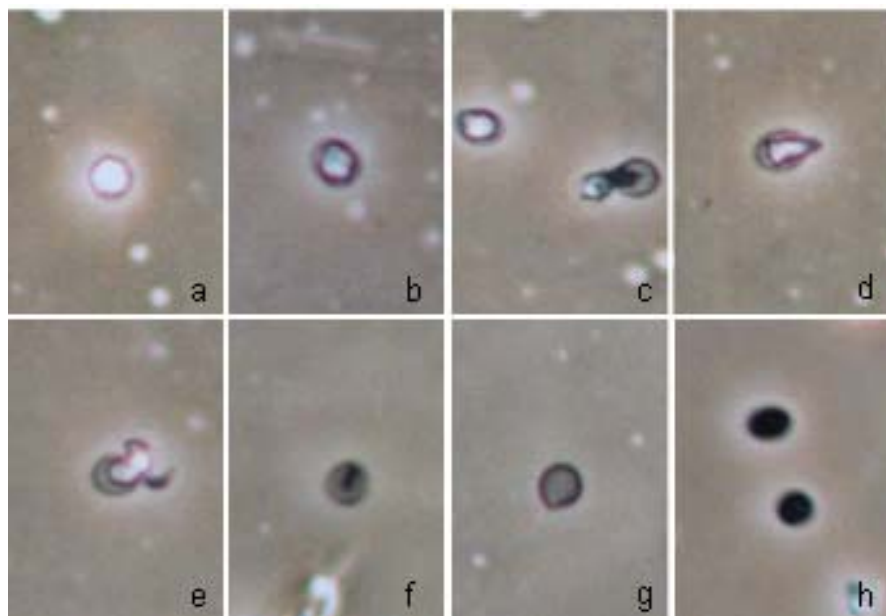
Os diferentes trabalhos com técnicas moleculares apresentam sensibilidades variáveis dependendo dos iniciadores usados ou da técnica de extração de DNA. SCORZA et al. (2003), só obtiveram 100% de sensibilidade em amostras com 10^4 oocistos. Já HIGGINS et al. (2001) relatam sensibilidade para detecção de 200 oocistos e KUHN et al. (2002) referem-se à sensibilidade de 10 oocistos.

A metodologia molecular de detecção de DNA de *C. parvum* padronizada no presente trabalho, pode ser usada para controle de água de superfície e em água tratada, pois o método tem capacidade de detectar 10^2 oocistos. Segundo a literatura consultada a sensibilidade das técnicas de determinação deste protozoário é bastante variável. Nos métodos parasitológicos tradicionais para detectar *Cryptosporidium* spp. são necessários 50.000 a 500.000 oocistos por grama de fezes pela técnica de Ziehl-Neelsen *acid fast* e 1.000 oocistos por grama de fezes na técnica de flutuação em $ZnSO_4$ (VILLENEUVE, 2004). Quanto à imunofluorescência, a sensibilidade é variável sendo que a IF direta tem sensibilidade para detectar 100.000 oocistos/grama de fezes e o método indireto são necessários de 50.000 a 500.000 oocistos por grama de fezes (WEBER et al., 1991). A identificação por imunofluorescência tem a desvantagem de apresentar reatividade cruzada dos anticorpos com algas e outros elementos e pode levar a erros de interpretação (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2002).

5.3 Metodologia de desencistamento para determinação da viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium parvum*

Para verificar a eficiência ou não dos produtos químicos foi necessário utilizar uma metodologia para determinar a viabilidade dos oocistos de *C. parvum*. A técnica para desencistamento usada no presente trabalho foi baseada no protocolo proposto por HOU et al. (2004). Foi possível identificar claramente os oocistos intactos e desencistados (Figura 6).

FIGURA 6 – TESTE DE VIABILIDADE *IN VITRO* PARA *Cryptosporidium parvum* VISTO EM MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE. a-b: OOCISTOS INTACTOS, c-e: OOCISTOS PARCIALMENTE DESENCISTADOS, f-g: OOCISTOS DESENCISTADOS (APENAS A MEMBRANA DO OOCISTO), h: OOCISTOS INTACTOS (COM DESTRUIÇÃO DAS ESTRUTURAS INTERNAS POR EXPOSIÇÃO AO OZÔNIO)



Adicionalmente, observou-se que ocorre variabilidade considerável na viabilidade de diferentes amostras de oocistos, obtendo-se valores de 69 a 95% nos controles. Por este motivo, para cada experimento de desinfecção foi utilizado um controle individual. Tal variação pode estar relacionada a fatores como maturidade dos oocistos e mesmo diferenças biológicas individuais entre as amostras, resultando em graus distintos de desencistamento. Observações semelhantes foram relatadas anteriormente por outros autores (RENNECKER et al., 1999, WARE e SCHAEFER, 2005). Por este motivo, a utilização de mistura de oocistos ou repetições dos experimentos com diferentes amostras pode reproduzir melhor a realidade encontrada nas contaminações naturais, onde oocistos de diferentes hospedeiros podem estar presentes.

As técnicas de desencistamento *in vitro* constituem uma das alternativas para avaliar a viabilidade de protozoários. Algumas publicações têm demonstrado que esta técnica é superior àquelas baseadas no uso de corantes vitais como diacetato de fluoresceína (FDA), DAPI e iodeto de propídio (PI) (SMITH e SMITH, 1989, CAMPBELL et al., 1992, BUKHARI et al., 2000).

Outro método de avaliação de viabilidade que tem sido comparado ao desencistamento é a infecção experimental de animais, com vários autores relatando ser este teste o mais adequado para este fim (LABATIUK et al., 1991, FINCH et al., 1993b, HAYES et al., 2003). Por outro lado, há trabalhos que demonstram haver correspondência entre os dois métodos (RENNECKER et al., 1999; HIRATA et al., 2001). RENNECKER et al. (2000), também encontraram resultados semelhantes de inativação pelos métodos de desencistamento *in vitro* e infecção animal. Algumas discrepâncias podem ocorrer devido à variabilidade analítica.

Existem vários problemas com o uso infecção experimental em animais de laboratório para teste de viabilidade. Entre eles, devem ser levantadas as questões éticas (por exemplo, em relação ao uso de elevado número de animais) e a dificuldade para as companhias de saneamento manter um biotério para testes em série. Desta maneira, uma alternativa para avaliação da viabilidade e eficiência dos desinfetantes sobre oocistos de *C. parvum* é o cultivo celular. JENKINS et al. (2002) e ROCHELLE et al. (2002) descreveram boa correlação entre infecção experimental e ensaios de cultivo celular. Segundo ROCHELLE et al. (2002), infecção experimental e cultivo celular são equivalentes para mostrar curva dose-resposta, sensibilidade e escala de dose infectante.

Na escolha da metodologia de avaliação de viabilidade, devem ser levados em consideração aspectos como a facilidade e rapidez de execução e capacidade de dar resposta que possa representar melhor a realidade, buscando equilibrar as vantagens e desvantagens de cada método.

5.4 Métodos químicos para inativação de *Cryptosporidium parvum* em água

5.4.1 Efeito do ácido hipocloroso sobre a viabilidade de oocistos de *C. parvum*

Os resultados de inativação dos oocistos de *C. parvum* são mostrados na Figura 7 e Tabela 10. Os dados são apresentados como redução da viabilidade (N/No) em função da concentração do desinfetante e o tempo de contato deste com os oocistos do parasito (CT). A utilização de 2 ppm do ácido hipocloroso em água,

aos 15 minutos, apresentou uma redução de 6,71% da viabilidade dos oocistos em relação ao experimento controle. Nos tempos de 30 a 60 minutos a redução foi em média de 37% e aos 120 minutos, de 49%. Para a inativação de 49% dos oocistos obteve-se CT de 240 (Tabela 11). Observou-se baixa eficiência do ácido hipocloroso na inativação de oocistos de *C. parvum*. Os parâmetros temperatura, turbidez e pH também estão descritos na Tabela 11.

FIGURA 7 - REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO HIPOCLOROSO (2 PPM, pH 7,5) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*

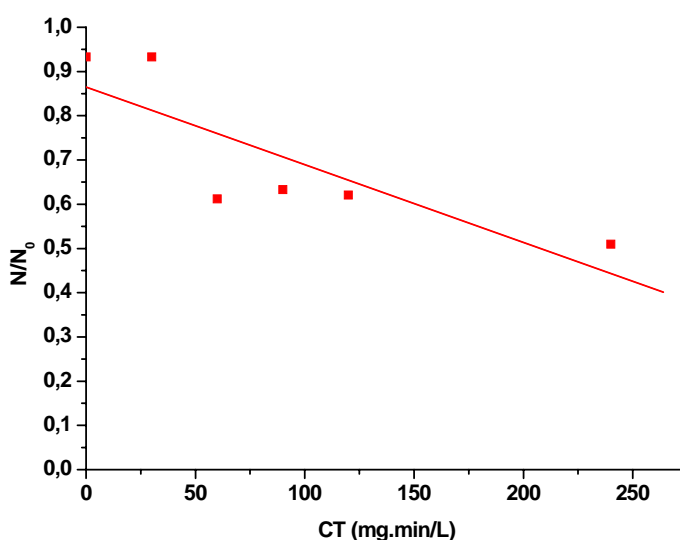


TABELA 10 - DADOS DA REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO HIPOCLOROSO (2 PPM, pH 7,5) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*

Equação da reta: $Y = A + B.X$		
Parâmetros	Valor	Erro
A	0,86489	0,07133
B	-0,00176	6,00687E-4
Coefficiente R	Desvio padrão (SD)	Coefficiente de determinação (R ²)
-0,82538	0,11397	0,84179

Sabe-se que *C. parvum* é bastante resistente ao cloro e diversos trabalhos têm relatado este fato (KORICH et al.,1990; FAYER et al.,1994). Em experimento para avaliação de derivados clorados, KORICH et al. (1990) relataram que foram necessárias concentrações de 80 ppm de cloro livre por 90 minutos para promover a inativação de oocistos de *C. parvum* a 25°C em pH 7,0. O valor de CT para eliminar 1 log foi de 7.200. Nos trabalhos de FAYER et al. (1994), oocistos submetidos à solução de hipoclorito de sódio a 5,25% por um período de 2 horas, ainda foram capazes de infectar animais de laboratório, o que confirma a resistência do parasito ao cloro. KEEGAN et al. (2003), obtiveram menos de 0,1 log de inativação usando cloro a 10 mg/L por uma hora. Com concentração de cloro de 5 mg/L e incubação por 24 horas também não houve inativação significativa.

TABELA 11 – PARÂMETROS ANALISADOS DURANTE O MÉTODO DE INATIVAÇÃO COM ÁCIDO HIPOCLOROSO (2PPM) EM ÁGUA ULTRAPURA (pH 7,5) CONTENDO OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*

Tempo	Temperatura (°C)	Turbidez (UTN)	Cloro* (ppm)	Cor aparente**	pH	CT	Redução de viabilidade (%)
0	20,6	0,11	2,08	B	7,57		0
15	20,1	0,11	2,06	B	7,55		6,71
30	20,0	0,11	2,03	B	7,55		38,81
45	19,9	0,11	1,96	B	7,54		36,72
60	19,9	0,11	1,83	B	7,54		37,92
120	19,9	0,11	1,83	B	7,54	240***	49,04

*Concentração de cloro restituída a 2 ppm com adição de ácido hipocloroso após cada aferição nos tempos determinados. ** Cor aparente: Boa (B). *** Indicado o CT para o maior índice de inativação (49,04%)

Estudos com águas recreativas contaminadas com material fecal mostram que para inativação de oocistos de *C. parvum*, são necessários, pelo menos, exposição a 2 ppm de cloro por 48 horas ou a 10 ppm de cloro por 6 horas. Também observaram que a desinfecção é prejudicada pelo material fecal, aumentando os valores de CT (CARPENTER et al., 1999).

Em estações de tratamento de água, a utilização de concentrações mais elevadas de ácido hipocloroso é inviável e não recomendada pela possibilidade de formação de subprodutos tóxicos como trihalometanos (THMs) (BELLAR et al., 1974, ROOK e EVANS, 1979). Além disso, o tempo de retenção numa estação convencional é de 60 a 120 minutos (SANEPAR, informação pessoal).

Nos experimentos, utilizou-se a concentração de cloro de 2 ppm por ser este o teor máximo de cloro residual livre recomendado pela Portaria MS nº 518 (Cap. IV, Art. 16, § 2º). A observação que a cloração da água possui baixa eficiência para eliminar protozoários que possuem parede cística como *Cryptosporidium*, já é clássica na literatura mundial (CAMPBELL et al., 1982; SUNDERMANN et al., 1987; SMITH et al., 1988, KORICH et al., 1990, RANSOME et al., 1993, FAYER et al., 1995, FINCH et al., 1997, VENCZEL et al., 1997).

A ineficiência deste produto na inativação de *Cryptosporidium* demanda, portanto, o uso de outras substâncias que possam auxiliar ou agir sinergicamente na desinfecção da água.

5.4.2 Efeito do dióxido de cloro sobre a viabilidade de oocistos de *C. parvum*

Avaliando-se preliminarmente o efeito das concentrações de 0,2 ppm e 0,5 ppm de dióxido de cloro sobre oocistos de *C. parvum*, obteve-se percentual de redução da viabilidade de apenas 30% após 60 minutos de contato. Por este motivo, foram realizados experimentos usando concentrações de 1, 2 e 5 ppm de dióxido de cloro, além de um experimento para comparar o efeito do pH na inativação dos oocistos. Os dados são apresentados como redução da viabilidade (N/No) em função da concentração do desinfetante e o tempo de contato deste com os oocistos do parasito (CT). Os resultados são apresentados nas Figuras 8 e 9 e Tabelas 12, 13 e 14 .

FIGURA 8 - REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO (1 PPM, 2 PPM E 5 PPM, pH 7,0 A 19°C) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*

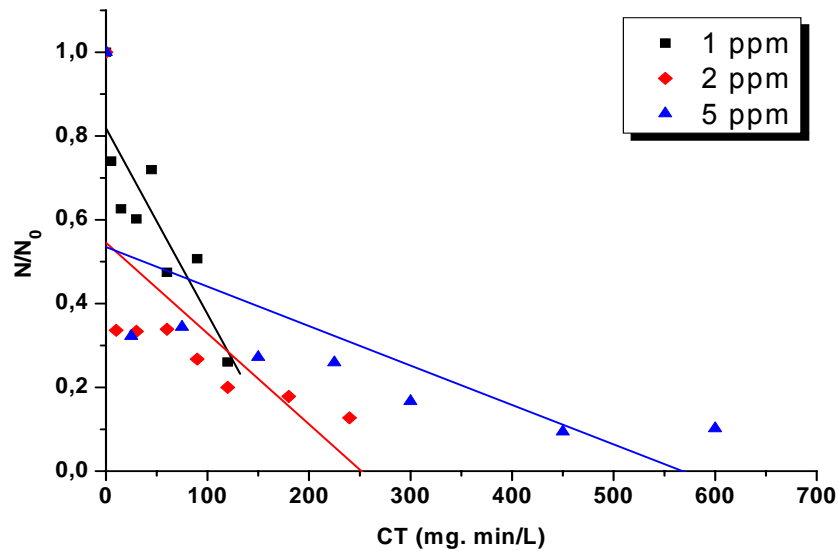


TABELA 12 - DADOS DA REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO (1 PPM, 2 PPM E 5 PPM, pH 7,0 A 19°C) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum*

Equação da reta: $Y = A + B.X$		
Parâmetros	Valor	Erro
A	0,81872	0,06354
B	-0,00444	0,00105
Coefficiente R	Desvio padrão (SD)	Coefficiente de determinação (R^2)
-0,86526	0,118	0,75708

FIGURA 9 - REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO pH (7,0 E 8,0 A 19°C) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* COM DIÓXIDO DE CLORO (2 PPM)

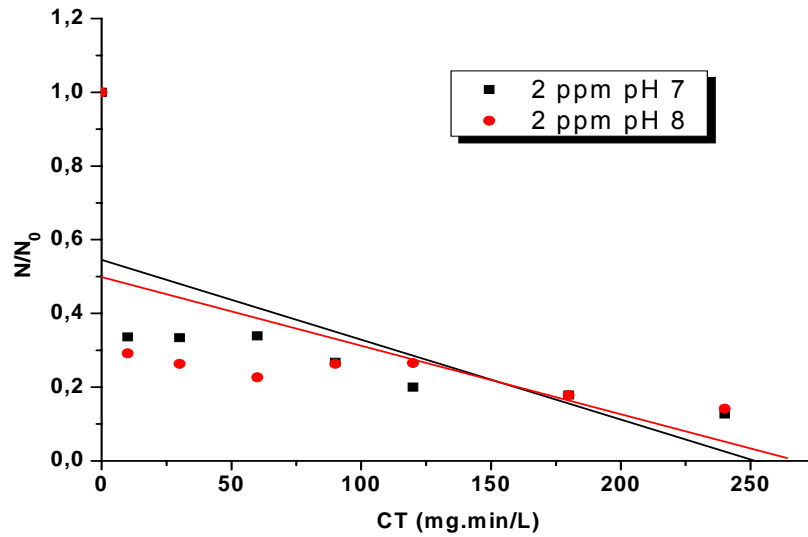


TABELA 13 - DADOS DA REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO pH (7,0 E 8,0 A 19°C) NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* COM DIÓXIDO DE CLORO (2 PPM)

Equação da reta: $Y = A + B.X$		
Parâmetros	Valor	Erro
A	0,54544	0,11926
B	-0,00217	9,85736E-4
Coefficiente R	Desvio padrão (SD)	Coefficiente de determinação (R^2)
-0,66779	0,22149	0,93026

TABELA 14 - EFICIÊNCIA DO DIÓXIDO DE CLORO NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* (10^4 /mL) EM ÁGUA ULTRAPURA (pH 7,0 A 19°C)

Tempo	Dióxido de cloro (ppm)			Redução de viabilidade (%)			CT
	1	2	5	1	2	5	
0	1,10	2,01	5,02	0	0	0	450*
5	1,05	1,96	4,95	25,97	66,40	67,76	
15	0,99	1,90	4,78	37,42	66,60	65,63	
30	0,96	1,85	4,62	39,83	66,12	72,83	
45	0,93	1,93	4,76	28,04	73,28	74,09	
60	0,90	1,78	4,68	52,55	79,98	83,30	
90	0,87	1,74	4,52	49,32	82,15	90,56	
120	0,85	1,66	4,46	73,97	87,25	89,78	

* Indicado o CT para o maior índice de inativação (90,56%)

No presente trabalho a maior eficiência do dióxido de cloro foi alcançada trabalhando-se com 5 ppm por 90 minutos, em pH 7,0 a 19°C. Assim, o CT obtido foi de 450. Porém se comparados os valores percentuais de redução de viabilidade, pode-se perceber que não há diferenças significativas entre os resultados com 2 ppm e com 5 ppm. De tal maneira que o dióxido de cloro a 2 ppm pode ser empregado na desinfecção da água com bons resultados e sem alcançar níveis tóxicos. O experimento para avaliar a influência do pH mostrou que não houve diferença nos resultados de inativação utilizando-se pH 7,0 ou 8,0. É reconhecido que as diferenças nos valores de CT dependem de aspectos como pH, temperatura e a linhagem do microrganismo. CHAURET et al. (2001), em experimento para determinar a inativação de oocistos de *C. parvum* com dióxido de cloro (pH 7,0; 21°C), mostraram as variações dos resultados de acordo com a origem das cepas. A avaliação da viabilidade foi feita por cultivo celular e desencistamento *in vitro*. Foram usadas três cepas diferentes e houve variação nos resultados de CT entre os métodos e dentro de um mesmo método. Pelo método de cultivo celular a variação entre as cepas foi de aproximadamente 300 CT, resultado semelhante ao método de desencistamento *in vitro*. Porém os valores de CT deste último foram um pouco maiores para a inativação da mesma cepa. Para *C. parvum*, a cinética de inativação

não se mostrou linear para experimentos realizados em pH 7,0 e temperatura de 21°C.

Os trabalhos de KORICH et al. (1990) mostraram um valor CT de 78 trabalhando com 1,3 ppm por 60 minutos, em pH 7,0 a 25°C. RANSOME et al. (1993), avaliaram o efeito do dióxido de cloro em oocistos de *C. parvum* e mostraram uma eficiência em torno de 90%. Já LIYANAGE (1998), mostrou que o efeito do dióxido de cloro é dependente de pH e temperatura e que sua eficiência é maior a 25°C e pH 11,0 chegando a inativar 1 log (90%) de oocistos de *C. parvum* com um tempo de contato de 70 minutos. RUFFELL et al. (2000), propõem valores mínimos de CT para 1 log de inativação de 71,2 a 20°C para inativação de oocistos de *C. parvum* com dióxido de cloro. Também foi observada variação em função da temperatura. Para cada 10°C diminuídos na temperatura, o CT aumentou num fator de aproximadamente 3,4. O pH na faixa de 6,0 a 8,0 não apresentou diferenças na taxa de inativação, mas em pH 10,0 a inativação foi mais rápida, necessitando de CT 20 a 30% menor que em pH 6,0 a 8,0. CHAURET et al. (2001), obtiveram CT de 1.000 para inativação de oocistos de *C. parvum* trabalhando com pH 8,0 a 21°C.

Os diferentes trabalhos que citam a grande interferência de pH e temperatura são mostrados na Tabela 15.

TABELA 15 – RESUMO DE DADOS DE INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* USANDO DIÓXIDO DE CLORO E COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS DO PRESENTE ESTUDO (ADAPTADO DE CHAURET ET AL., 2001)

Dados experimentais ^a	CT (mgmin/ litro)	Log ₁₀ inativação ^c	Medida de viabilidade ou infectividade	Referências ^d
1 <i>C. parvum</i> , temp. ambiente, 0,43 mg of ClO ₂ /litro no início, 0,22 mg of ClO ₂ /litro no final, 30 min de contato	12,9 ^b	1,24(1,0)	Infectividade em camundongo	Peeters et al., 1989
2 <i>C. parvum</i> , 0,01 M tampão fosfato pH 7 em água, 25°C, 1,3 mg de ClO ₂ /litro no início, 0,4 mg de ClO ₂ /litro no final, 60 min de contato	78 ^e	1,0 (2,0)	Infectividade em camundongo	Korich et al., 1990
3 <i>C. parvum</i> , demanda de oxidante livre 0,05 M tampão fosfato pH 8 em água, 22 ± 1°C, 2,0 mg de ClO ₂ /liter no início, 30 min de contato	60 ^e	0,99	Infectividade em camundongo	Liyanage et al., 1997
4 O mesmo do expt. 3 mas com tempo de contato de 61 min	122 ^e	1,57	Infectividade em camundongo	Liyanage et al., 1997
5 O mesmo do expt 3 mas com 3,3 mg de ClO ₂ /litro no início e 116 min de contato	383 ^e	>3,22	Infectividade em camundongo	Liyanage et al., 1997
6 <i>C. parvum</i> , 0,05 M tampão fosfato pH 6 em água, 22°C, duas repetições	120	1,8 e 2,1	Infectividade em camundongo	Finch et al., 1999
7 <i>C. parvum</i> (isolado de um bovino de Iowa, genotipo 2 [C], Universidade do Arizona), 0,01 M tampão fosfato pH 8 em ddH ₂ O, 20°C	150	2,0 ^e	Desencistamento <i>in vitro</i> modificado	Ruffell et al., 2000
8 <i>C. parvum</i> (cepa de Iowa de PHF), ddH ₂ O ajustado ao pH 8, 21°C	1.000	2,0 ^e	Cultura em célula MPN	Chauret et al., 2001
9 <i>C. parvum</i> (cepa de Iowa de PHF), ddH ₂ O, pH 8, 21°C	1.000	0,5 ^e	Desencistamento <i>in vitro</i>	Chauret et al., 2001
10 <i>C. parvum</i> (cepa de Iowa de Sterling), ddH ₂ O, pH 8, 21°C	550	2,0 ^e	Cultura em célula MPN	Chauret et al., 2001
11 <i>C. parvum</i> (cepa de Iowa, da Universidade de Alberta), ddH ₂ O, pH 8, 21°C	75	2,0 ^e	Cultura em célula MPN	Chauret et al., 2001
12 <i>C. parvum</i> 0,01M tampão fosfato pH 7, em água ultrapura, 19°C	450	1,0 ^e	Desencistamento <i>in vitro</i>	Neste estudo

^addH₂O, água deionizada e destilada, PHF, Pleasant Hill Farm - procedência da cepa de *C. parvum*. ^bO valor de CT é o máximo teórico CT, calculado pela multiplicação da dose inicial de desinfetante pelo tempo de exposição. Notar que Liyanage et al., 1997 fornece dados para valores iniciais e finais residuais de dióxido de cloro para os experimentos de inativação de oocistos de *C. parvum*, e, em todos os casos, o valor residual final foi 60% ou menos que o valor inicial. ^cValores em parênteses foram recalculados por Finch et al., 1999. ^dSomente dados selecionados de cada referência foram apresentados. ^eValor aproximado.

5.4.3 Efeito do ozônio sobre a viabilidade de oocistos de *C. parvum*

Para avaliar a eficiência do ozônio na inativação dos oocistos de *C. parvum* foram realizados dois experimentos. O primeiro foi realizado em sistema aberto e avaliaram-se aplicações de 0,1; 0,45 e 0,7 mg/L. Os dados são apresentados como redução da viabilidade (N/No) em função da concentração do desinfetante (mg/L) (Figura 10 e Tabela 16). O percentual de redução da viabilidade é mostrado na Tabela 17.

FIGURA 10 – REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM OZÔNIO NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* (SISTEMA ABERTO)

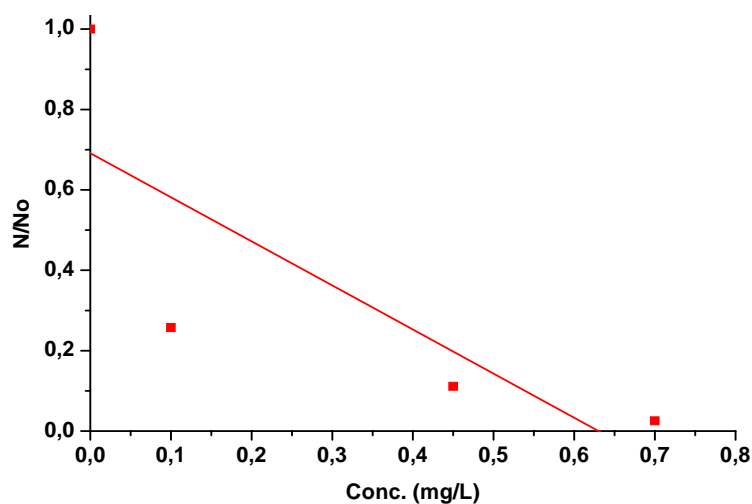


TABELA 16 – DADOS DA REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM OZÔNIO NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* (SISTEMA ABERTO)

Equação da reta: $Y = A + B.X$		
Parâmetros	Valor	Erro
A	0,69136	0,24782
B	-1,09699	0,59135
Coeficiente R	Desvio padrão (SD)	Coeficiente de determinação (R^2)
-0,79526	0,33024	0,98613

TABELA 17 - EFICIÊNCIA DO OZÔNIO NA REDUÇÃO DA VIABILIDADE DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* UTILIZANDO SISTEMA ABERTO

Concentração de ozônio (mg/L)	Redução de viabilidade (%)
0,10	74,25
0,45	88,85
0,70	97,48

Neste tipo de sistema, o maior percentual de redução da viabilidade foi de 97,48% após a aplicação de 0,7 mg/L. A cinética de inativação de *C. parvum* por ozônio vem sendo investigada por muitos autores em diferentes países (PEETERS et al., 1989; PERRINE et al., 1990; KORICH et al., 1989, 1990, FINCH et al., 1993a; LIYANAGE et al., 1998, RENNECKER et al., 1999; CORONA-VASQUEZ et al., 2003). PEETERS et al. (1989), conseguiram inativação de 2 log (99%) com CT de 4,1 a 4,6 mg. min/L. PERRINE et al. (1990), obtiveram inativação de 2 log com CT de 2,6 mg. min/L. No entanto, a utilização de um sistema de ozonização contínuo subestimou a dose de ozônio. O mesmo ocorreu para os resultados apresentados por KORICH et al. (1990), que apresentaram um CT de 5 mg. min/L para 2 log de inativação. FINCH et al. (1993), observaram inativação de 2 log com CT na faixa de 2 a 8 mg. min/L a 22°C e CT de 5 a 10 mg. min/L a 7°C. Para inativação de 3 log (99,9%) o CT foi entre 3 e 15 mg. min/L a 22°C e CT entre 8 e 16 mg. min/L a 7°C. ROCHELLE et al. (2002), obtiveram inativação de 2,2 log (99,4%) pelo método de cultura celular e 2,5 log (99,7%) pelo método de infecção experimental, utilizando CT de 16 mg. min/L de ozônio, enquanto KEEGAN et al. (2003), obtiveram 2,19 log (99,35%) de inativação de oocistos de *C. parvum* expostos ao ozônio na concentração de 2,0 mg/L durante 10 minutos.

Considerando a baixa eficiência de inativação obtida no experimento do presente trabalho, em relação aos dados da literatura, procurou-se repetir o experimento em sistema fechado, simulando um reator. Nesta condição foram avaliadas as aplicações de 0,18; 0,24; 0,36; 0,48 e 1,44 mg/L. Os dados são apresentados como redução da viabilidade (N/No) em função da concentração do

desinfetante (mg/L) (Figura 11 e Tabela 18). O percentual de redução da viabilidade é mostrado na Tabela 19.

FIGURA 11 - REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM OZÔNIO NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* (SISTEMA FECHADO)

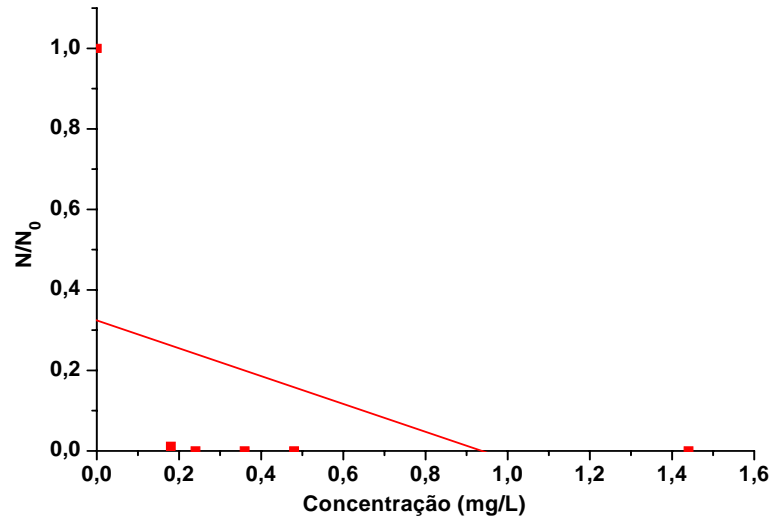


TABELA 18 - DADOS DA REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO COM OZÔNIO NA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* (SISTEMA FECHADO)

Equação da reta: $Y = A + B.X$		
Parâmetros	Valor	Erro
A	0,32434	0,23252
B	-0,34621	0,35852
Coefficiente R	Desvio padrão (SD)	Coefficiente de determinação (R^2)
-0,4348	0,41013	0,99999

TABELA 19 - EFICIÊNCIA DO OZÔNIO NA REDUÇÃO DA VIABILIDADE DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* UTILIZANDO SISTEMA FECHADO

Concentração de ozônio (mg/L)	Redução de viabilidade (%)
0,18	98,87
0,24	100
0,36	100
0,48	100
1,44	100

A inativação foi de 100% a partir da concentração de 0,24 mg/L. A relação CT é diferente de um trabalho para outro e muitas variáveis podem interferir neste valor. Entre elas podem ser citadas a temperatura (Tabela 20), o pH, a concentração de matéria orgânica encontrada na água *in natura* do manancial onde ela é captada e adicionalmente, as linhagens do parasito. Estudos sobre inativação de oocistos de *C. parvum* com 1 mg/L de ozônio em pH 8,0 mostram valores < 1 log na época do inverno e 2 log no período do verão (USEPA, 2003). RENNECKER et al. (1999), obtiveram inativação de 5 log com 1 mg/L de ozônio, no período do verão. Com doses de 0,5 mg/L de ozônio, obtiveram inativação \leq 1 log no período do verão e não obtiveram inativação na época chuvosa ou de inverno. Segundo os autores, a diferença sazonal se deve à alta energia de ativação para inativar o *C. parvum*. O método de desencistamento *in vitro* pode apresentar resultados discrepantes, uma vez que pode haver dificuldade na diferenciação de formas desencistadas dos oocistos intactos, após o processo de ozonização. Isso foi verificado por RENNECKER et al. (1999). Também foi observado que oocistos intactos, quando expostos a altas concentrações de ozônio, perdem sua refratibilidade, sendo classificado erroneamente como desencistado e superestimando o resultado de desencistamento. Uma alternativa para minimizar esse erro seria avaliar a viabilidade por meio da contagem de esporozoítos desencistados e utilizar equações para corrigir o número de esporozoítos presentes na amostra antes do processo de desinfecção (denominada “branco”) e para normalizar o controle. Outra observação verificada por diversos autores é que pode haver aumento do desencistamento a uma exposição relativamente baixa a agentes oxidantes (REDUKER e SPEER, 1985, RENNECKER et al., 1999, RUFFELL et al., 2000). Esse artefato da técnica de

desencistamento faz com que as amostras submetidas aos desinfetantes apresentem maior taxa de desencistamento que o controle.

Na última década, *Cryptosporidium* spp. passou a representar um importante problema para saúde pública por ter causado grandes epidemias de veiculação hídrica, com o maior número de casos notificados principalmente em países desenvolvidos (MACKENZIE et al., 1994, BETANCOURT e ROSE, 2004, SAVIOLI et al., 2006; SMITH et al., 2006). Em Surrey, no Canadá, piscinas que eram tratadas com sistema de filtração com areia, ozonização e cloração foram responsáveis por um surto de criptosporidiose (LOUIE et al., 2004).

Mesmo estabelecidos os processos de tratamento adequados e uma correta operacionalização sabe-se que há passagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água de beber (SMITH et al., 2006). Processos de desinfecção de água utilizando o dióxido de cloro e o ozônio têm sido foco de vários estudos. O ozônio tem a vantagem de ser bastante eficaz para vários microrganismos sob doses menores, mas é considerado mais dispendioso que o cloro (BETANCOURT e ROSE, 2004). Outro fator a ser considerado é que o ozônio não produz residual para o sistema de distribuição (MEYER, 1994).

TABELA 20 – VALORES DE CT PARA INATIVAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* EMPREGANDO OZÔNIO COMO DESINFETANTE

Inativação [-log ₁₀ (N/No)]	CT (mg.min/L)						
	0,5°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
0,5	20.1	11.3	6.08	3.34	1.87	1.07	0.62
1,0	32.7	18.4	9.88	5.43	3.05	1.74	1.01
1,5	45.3	25.4	13.7	7.52	4.22	2.41	1.40
2,0	57.9	32.5	17.5	9.60	5.39	3.08	1.79
2,5	70.4	39.5	21.3	11.7	6.56	3.75	2.18
3,0	83.0	46.6	25.1	13.8	7.73	4.42	2.57
3,5	95.6	53.7	28.9	15.9	8.90	5.09	2.96
4,0	108.0	60.7	32.7	18.0	10.1	5.76	3.35
4,5	121.0	67.8	36.5	20.0	11.2	6.43	3.74
5,0	133.0	74.8	40.3	22.1	12.4	7.10	4.13
5,5	146.0	81.9	44.0	24.2	13.6	7.77	4.52
6,0	158.0	88.9	47.8	26.3	14.8	8.44	4.91

FONTE: Adaptado de Rennecker et al. (1999).

Apesar do custo, o ozônio vem sendo usado como desinfetante em muitas estações de tratamento de água em diferentes partes do mundo. Ele mostrou-se uma excelente alternativa como desinfetante no pré ou pós-tratamento de água por ser altamente eficiente e por agir em doses baixas (MEUNIER et al., 2006). Pesquisas recentes têm mostrado que a aplicação seqüencial de diferentes desinfetantes é mais eficiente que o efeito de cada um individualmente, pois efeitos sinérgicos aumentam a eficiência da desinfecção (DIBERNARDO e DANTAS, 2005, RENNECKER et al., 1999). RENNECKER et al. (2000), sugerem que a utilização do ozônio como desinfetante primário e um outro desinfetante secundário com tempo suficiente de contato podem prover bons resultados na inativação de oocistos de *C. parvum*. Além disso, o pré-tratamento com ozônio diminui o CT para o desinfetante secundário.

5.5 Medidas importantes para garantir a qualidade da água

No Brasil, pouco se sabe a respeito da real eficiência de outros desinfetantes, além do cloro. Pelo presente trabalho, percebe-se que existem alternativas capazes de melhorar as taxas de inativação de oocistos de *Cryptosporidium parvum* presentes na água, tornando os sistemas de tratamento de água mais eficientes. Como *Cryptosporidium* spp. vem sendo encontrado em diferentes regiões do Brasil, uma questão que pode ser levantada é se existe variabilidade genética intra-específica para *Cryptosporidium* spp. e se este fato poderia se refletir no comportamento das linhagens frente aos desinfetantes.

Os resultados de inativação com dióxido de cloro mostram que sua eficiência sofre grande interferência das características químicas e físicas da água. Por isto, no caso do Brasil, é necessária uma avaliação nas diferentes regiões, pois sendo um país de dimensão continental, possui água com qualidade variável. Se a variação ocorre dentro de um mesmo estado, ocorre ainda mais de um estado para outro, o que dificulta o controle das variáveis acima referidas nas estações de tratamento de água existentes no país.

Os valores de inativação de oocistos de *C. parvum* obtidos com o ozônio, em sistema fechado, são os melhores resultados em relação aos três desinfetantes testados. O ozônio também tem sua eficiência afetada por fatores como pH e

temperatura, mas é a alternativa mais promissora para o tratamento da água. O fato de ser possível a associação dos desinfetantes, melhora ainda mais as perspectivas. Nesse contexto, o ozônio se mostra como uma ótima opção de desinfetante no pré ou pós-tratamento de água.

Para se garantir a eficiência dos desinfetantes alternativos reforça-se a condição de adaptação constante dos valores de CT. Como o país apresenta regiões com características peculiares de solo e clima, ocorre grande variação na qualidade da água, pois esta é influenciada pelo solo e pela sazonalidade. Desta maneira, as estações de tratamento de água devem fazer avaliações periódicas das características da água a ser tratada a fim de garantir um CT ótimo para cada local.

Sabendo-se que apesar da implementação e padronização dos processos de tratamento, os oocistos de *C. parvum* são capazes de passar filtros convencionais, fazem-se necessárias barreiras eficientes para este protozoário. Se forem utilizadas barreiras que evitem ao máximo a passagem de oocistos, haverá menor demanda dos desinfetantes.

Como o método de desinfecção utilizado no Brasil ainda é somente o cloro e sua eficiência na inativação de oocistos de *C. parvum* é sabidamente baixa, o país não tem estrutura para enfrentar uma eventual epidemia de criptosporidiose.

Programas de saneamento básico e educação sanitária continuam sendo de fundamental importância para evitar a contaminação ambiental e da população. Sabendo-se do potencial risco de contaminação por animais, devem ser tomadas medidas para que estes não eliminem seus excrementos próximos às áreas de mananciais.

Se o ambiente estiver livre de contaminação, não haverá necessidade da utilização de produtos químicos em altas doses. A água deve estar livre de microrganismos patogênicos, mas também de produtos e subprodutos químicos em concentrações capazes de levar a outras doenças por sua toxicidade. A principal barreira deve ser feita nos mananciais para que sua preservação seja assegurada.

6. CONCLUSÕES

A técnica molecular (PCR) para *Cryptosporidium parvum*, mostrou-se sensível para 10^2 oocistos. Foi possível melhorar a sensibilidade por meio da técnica de Nested-PCR. Os melhores resultados de extração de DNA foram obtidos utilizando-se o método que emprega ultra-som e enzimas. Ainda são necessários ajustes visando o aumento da sensibilidade da técnica para uso em amostras ambientais.

O método de desencistamento *in vitro* mostrou-se como boa alternativa para avaliação da viabilidade de oocistos de *C. parvum*. Este método possibilitou a diferenciação de oocistos desencistados e intactos, além de apresentar as vantagens de fácil reprodutibilidade, custo acessível e dispensa do manuseio de animais.

O tratamento convencional de água utilizando cloração mostra que oocistos de *C. parvum* foram detectados e permaneceram viáveis. O ácido hipocloroso a 2 ppm inativou apenas 49% dos oocistos de *C. parvum*, após tempo de contato de 120 minutos.

O tratamento com dióxido de cloro apresentou valores de CT (concentração x tempo de contato do desinfetante) de 450, considerados altos. Na concentração de 5 ppm por 90 minutos, inativou 90% dos oocistos de *C. parvum*.

O tratamento com ozônio promoveu 98,87% de inativação na concentração de 0,18 mg/L e 100% de inativação ocorreu quando usado 0,24 mg/L do produto, em sistema fechado. Em sistema aberto, a redução da viabilidade foi de 97,48% após a aplicação de 0,7 mg/L de ozônio. O ozônio representa uma excelente opção de desinfetante.

REFERÊNCIAS

ADJEI, A. A.; ARMAH, H.; RODRIGUES, O.; RENNER, L.; BORKETEY, P.; AYEH-KUMI, P.; ADIKU, T.; SIFAH, E.; LARTEY, M. *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea among children at the Korle-Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokio, v. 57, p. 216-219, 2004.

AGNEW, D. G.; LIMA, A. A. M.; NEWMAM, R. D.; WUHIB, T.; MOORE, R.D.; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increases diarrhea morbidity. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 177, n. 3, p. 754-760, 1998.

AKIYOSHI, D. E.; DILO, J.; PEARSON, C.; CHAPMAN, S.; TUMWINE, J.; TZIPORI, S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 4, p. 1828-1832, 2003.

ALDOM, E.; CHAGLA, A. H. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Letters in Applied Microbiology**, Bradford, v. 20, p. 86-187, 1995.

ALVES, M.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A. A.; MATOS, O.; ANTUNES, F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 2744-2747, 2003.

AMARAL, L. A.; NADER-FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O. D. Influência da precipitação pluviométrica nas características físicas, química e higiênico-sanitária da água de três mananciais de abastecimento público. **Revista Latino-Americana de Microbiologia**, Cuernavaca, v. 36, p. 33-38, 1994.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Annual Book of ASTM Standards 11.01**. Philadelphia, 1991. p. 925-935.

AMIN, O. M. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 66, n. 6, p. 799-803, 2002.

ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182 p.

APHA - American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20. ed. Washington : APHA, AWWA, WEF, 1999.

APELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - current status end future needs. **Trends in Parasitology**, London, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.

AWAD-EL-KARIEM, F. A.; WARHURST, D. C.; MCDONALD, V. Detection of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction. **Parasitology**, Cambridge, v. 109, n. 1, p. 19-22, 1994.

BAKER, J. R. Systematics of parasitic protozoa. In: J.P. KREIER (ed.), **Parasitic Protozoa**. v. 1. New York: Academic Press, 1977. p. 35-56.

BARUFFALDI, R.; PENNA, T. C. V.; MACHOSHVILI, I. A.; ABE, L. E. Tratamento químico de hortaliças poluídas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 18, p.225-34, 1984.

BELLAR, T. A.; LICHTENBERG, J. J.; KRONER, R. C. The occurrence of organohalides in chlorinated drinking water. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 66, p. 703-706, 1974.

BETANCOURT, W. Q.; ROSE, J. B. Drinking water treatment process for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 219-234, 2004.

BLACK, E. K.; FINCH, G. R.; TAGHI-KILANI, R.; BELOSEVIC, M. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 135, p. 187-189, 1996.

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). **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 4, p. 838-841, 2000.

BORCHARDT, M. A.; SPENCER, S. K. Recovery of *Cryptosporidium* and *Giardia* from environmental samples using a blood cell separator. In: PROCEEDINGS OF THE AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE, 1997, Boston. **Anais...** Denver, CO: American Water Works Association, 1997.

BRASIL. Portaria MS n. 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 141, n. 59, 25 mar. 2004. Seção1, p. 266-270.

BUFFLE, M.; GALLI, S.; VON GUNTEN, U. Enhanced bromate control during ozonation: the chlorine-ammonia process. **Environmental Science and Technology**, Iowa city, v. 38, n. 19, p. 5187-5195, 2004.

BUGG, R. J.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; THOMPSON, R. C. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. **The Veterinary Journal**, London, v. 157, p. 295-301, 1999.

BUKHARI, Z.; SMITH, H. V.; SYKES, N.; HUMPHREYS, S. W.; PATON, C. A.; GIRDWOOD, R. W. A.; FRICKER, C. R. Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* spp cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. **Water Science and Technology**, London, v. 35, nos. 11-12, p. 385-390, 1997.

BUKHARI, Z.; MARSHALL, M. M.; KORICH, D. G. ; FRICKER, C. R.; SMITH, H. V.; ROSEN, J.; CLANCY, J. L. Comparison of *Cryptosporidium parvum* viability and infectivity assays following ozone treatment of oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 7, p. 2972-2980, 2000.

CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. A.; McLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, London, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005.

CAMPBELL, A. T.; ROBERTSON, L. J.; SMITH, H. V. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 11, p. 3488-3493, 1992.

CAMPBELL, A. T.; SMITH, H. V. Immunomagnetically separable separation of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples. **Water Science and Technology**, London, v. 35, p. 397-401, 1997.

CAMPBELL, I.; TZIPORI, S.; HUTCHISON, G.; ANGUS, K. W. Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. **The Veterinary Record**, London, v. 111, p. 414-415, 1982.

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

CARPENTER, C.; FAYER, R.; TROUT, J.; BEACH, M. J. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 4, p. 579-584, 1999.

CARVALHO-ALMEIDA, T. T.; PINTO, P. L. S.; QUADROS, C. M. S.; TORRES, D. M. A. G. V.; KANAMURA, H. Y.; CASIMIRO, A. M. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 27-32, 2006.

CASEMORE, D. P. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 104, p. 1-28, 1990.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. Water-related disease out-breaks, annual summary, 1983. Department of Health and Human Services Publication (CDC) 84-8385. **Center for Disease Control**, Atlanta, 1984.

CHACÍN-BONILLA, L.; SÁNCHEZ-CHÁVEZ, Y. Intestinal parasitic infections, with a special emphasis on cryptosporidiosis, in Amerindians from western Venezuela. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 62, n. 3, p. 347-352, 2000.

CHAURET, C. P.; CHEN, P.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Effect of environmental stressors on the survival of *Cryptosporidium* oocysts. In: PROCEEDINGS OF THE AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE, 1995, New Orleans. **Anais...** New Orleans: American Water Works Association, 1995. p. 1567-1585.

CHAURET, C. P.; RADZIMINSKI, C. Z.; LEPUIL, M.; CREASON, R.; ANDREWS, R. C. Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2993-3001, 2001.

CHEN, X. M.; O'HARA, S. P.; HUANG, B. Q.; NELSON, J. B.; LIN, J. J. C.; ZHU, G.; WARD, H. D.; LARUSSO, N. F. Apical organelle discharge by *Cryptosporidium parvum* is temperature, cytoskeleton, and intracellular calcium dependent and required for host cell invasion. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 12, p. 6806-6816, 2004.

CHUNG, E.; ALDOM, J. E.; CARRENO, R. A.; CHAGLA, A. H.; KOSTRZYNSKA, M.; LEE, H.; PALMATEER, G.; TREVORS, J. T.; UNGER, S.; XU, R.; DE GRANDIS, S. A. PCR-based quantification of *Cryptosporidium parvum* in municipal water samples. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v. 38, n. 2, p. 119-130, 1999.

COMPAGNON, B.; ROBERT, C.; MENNECART, V.; DE ROUBIN, M. R.; CERVANTES, P.; JORET, J. C. Improved detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by flow cytometry. In: PROCEEDINGS WATER QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE, 1997, Philadelphia. **Anais...** Denver CO: American Water Works Association, 1997.

CORNWELL, D. A.; MACPHEE, M. J.; BROWN, R. A.; VIA, S. H. Demonstrating *Cryptosporidium* removal using spore monitoring at lime-softening plants. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 95, p. 24-33, 2003.

CORONA-VASQUEZ, B.; SAMUELSON, A.; RENNECKER, J. L.; MARINAS, B. J. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. **Water Research**, Lyngby, v. 36, p. 4053-4063, 2002.

CRAIK, S. A.; WELDON, D.; FINCH, G. R.; BOLTON, J. R.; BELOSEVIC, M. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation. **Water Research**, Lyngby, v. 35, n. 6, p. 1387-1398, 2001.

CRAUN, G. F.; HUBBS, S. A.; FROST, F.; CALDERON, R. L.; VIA, S. H. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 90, p. 81-91, 1998.

CURRENT, W. *Cryptosporidium parvum*: household transmission. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 120, n. 6, p. 518-519, 1994.

D'ANTONIO, R. G.; WINN, R. E.; TAYLOR, J. P.; GUSTAFSON, T. L.; CURRENT, W. L.; RHODES, M. M.; GARY, G. W.; ZAJAC, R. A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 103, p. 886-888, 1985.

DENG, M. Q.; PETERSON, R. P.; CLIVER, D. O. First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California sea lions (*Zalophus californianus*). **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 3, p. 490 - 494, 2000.

DESPOMMIER, D. D.; GWADZ R. W.; HERTZ, P. J. **Parasitic Diseases**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 333p.

DI BERNARDO L., DANTAS, A. D. **Métodos e técnicas de tratamento da água**. 2. ed. São Paulo: Rima, 2005. 792p.

DI GIORGIO, C. L.; GONZALEZ, D. A.; HUITT, C. C. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using environmental protection agency method 1623. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 12, p. 5952-5955, 2002.

DOBELL, C. Vilem Lambl (1824-1895), A portrait and a biographical note. **Parasitology**, Cambridge, v. 32, p.122-125, 1940.

EDERLI, B. B.; CARVALHO, C. B. de; SALES, L. G. Ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* em bezerros na microrregião de Campos dos Goytacazes no norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 45-48, 2004.

ENEMARK, H. L.; AHRENS, P.; JUEL, C. D.; PETERSEN, E.; PETERSEN, R. F.; ANDERSEN, J. S.; LIND, P.; THAMSBORG, S. M. Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. **Parasitology**, Cambridge, v. 125(Pt 4), p. 331-341, 2002.

ESTEBAN, J. G. ; AGUIRRE, C. ; FLORES, A. ; STRAUSS, W. ; ANGLES, R; MASCOMA, S. High *Cryptosporidium* prevalences in healthy Aymara children from the northern bolivian altiplano. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 58, n.1, p. 50-55, 1998.

FAIRLEY, R.; SINCLAIR, M. I.; RIZAK, S. Monitoring not the answer to *Cryptosporidium* in water. **The Lancet**, New York, v. 354, p. 967-968, 1999.

FARIZAWATI, S.; LIM, Y. A. L; AHMAD, R. A.; FATIMAH, C. T. N. I; SITI-NOR, Y. Contribution of cattle farms towards river contamination with *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Sungai Langat Basin. **Tropical Biomedicine**, Jalan Pahang, v. 22, n. 2, p. 89-98, 2005.

FAYER, R. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 8, p. 2732-2735. 1994.

FAYER, R. Effect of sodium hypochlorite exposure on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts for neonatal BALB/c mice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 2, p. 844-846, 1995.

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

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

FEITOSA, F. L. F.; SHIMAMURA, G. M.; ROBERTO, T.; MEIRELES, M. V.; NUNES, C. M.; CIARLINI, P. C.; BORGES, A. S. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 189-193, 2004.

FIGUEIREDO, R. F.; PARDO, S. D. A.; CORAUCCI FILHO, B. Fatores que influenciam a formação de trihalometanos em águas de abastecimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA AMBIENTAL, 20., 1999, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária Ambiental, 1999. p. 1362-1368.

FINCH, G. R.; BLACK, E. K.; GYÜRÉK, L.; BELOSEVIC, M. Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by in vitro excystation and animal infectivity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 12, p. 4203-4210, 1993(a).

FINCH, G. R., DANIELS, C. W.; BLACK, E. K.; SCHAEFER, F. W.; BELOSEVIC, M. Dose-response of *Cryptosporidium parvum* in outbred, neonatal CD- 1 mice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 11, p. 3661-3665, 1993(b).

FINCH, G. R.; GYÜRÉK, L. L.; LIYANAGE, L. R. J.; BELOSEVIC, M. **Effect of various disinfection methods on the inactivation of *Cryptosporidium***. Final report. Denver, CO: AWWARF, 1997.

FORD, T. E.; COLWELL, R. A global decline in microbiological safety of water: a call for action. **The American Academy of Microbiology**, 1995. Disponível em: <<http://www.asm.org/academy/index.asp>> Acesso em: 26 out. 2006.

FOX, K. R.; LYTLE, D. A. Milwaukee's crypto outbreak: investigation and recommendations. **Journal of American Water Works Association**, Denver, v. 88, p. 87-94, 1996.

FRANCO, R. M.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 2, p.109-11, 2001.

FRANCO, R. M. B.; CORDEIRO, N. S. Giardose e criptosporidiose em creches no Município de Campinas, S.P. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 29, p. 531-661, 1996.

GALLARD, H.; VON GUNTEN, U. Chlorination of natural organic matter: kinetics of chlorination and of THM formation. **Water Research**, Lyngby, v. 36, n. 1, p. 65-74, 2002.

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

GARCIA, A. M.; LIMA, J. D. Frequência de *Cryptosporidium* em bezerros lactentes de rebanhos leiteiros de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 45, n. 2, p. 193-198, 1993.

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

GATEI, W.; GREENSILL, J.; ASHFORD, R. W.; CUEVAS, L. E.; PARRY, C. M.; CUNLIFFE, N. A.; BEECHING, N. J.; HART, C. A. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 4, p. 1458-1462, 2003.

GENNARI CARDOSO, M. L.; COSTA CRUZ, J. M.; CASTRO, E. de; LIMA, L. M.; PRUDENTE, D. V. *Cryptosporidium* sp. in children suffering from acute diarrhea at Uberlândia City, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 911, n. 5, p. 551-554, 1996.

GERBA, C. P.; JOHNSON, D. C.; HASAN, M. N. Efficacy of iodine water purification tablets against *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. **Wilderness and Environmental Medicine**, Colorado Springs, v. 8, n. 2, p. 96-100, 1997.

GIBSON, C. J.; HAAS, C. N.; ROSE, J. B. Risk assessment of waterborn protozoa: current status and future trends. **Parasitology**, Cambridge, v. 117, p. 5205-5212, 1998.

GOBET, P.; TOZE, S. Relevance of *Cryptosporidium parvum* hsp70 mRNA amplification as a tool to discriminate between viable and dead oocysts. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, p. 226-229, 2001b.

GOH, S. ; REACHER, M.; CASEMORE, D.P. ; VERLANDER, N.Q. ; CHALMERS, R.; KNOWLES, M. ; WILLIAMS, J. ; OSBORN, K. ; RICHARDS, S. Sporadic cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996–2000. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 6, p. 1007-1015, 2004.

GONÇALVES, E. M. do N.; SILVA, A. J. da; EDUARDO, M. B. de P.; UEMURA, I. H.; MOURA, I. N. S.; CASTILHO, V. L. P.; CORBETT, C. E. P. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics**, São Paulo, v. 61, n. 2, p. 119-126, 2006.

GRACZYK, K.; CRANFIELD, M. R.; FAYER, R. *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from water by the membrane filter dissolution method retain their infectivity. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, p. 111-114, 1997.

GRACZYK, T. K.; SCHWAB, K. J. Foodborne infections vectored by molluscan shellfish. **Currents Gastroenterology Reports**, Cleveland, v. 2, p. 305-309, 2000.

GRIFFITHS, J. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. **Advances in Parasitology**, Orlando, v. 40, p. 37-50, 1998.

GUY, R. A.; PAYMENT, P.; KRULL, U. J.; HORGAN, P. A. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5178-5185, 2003.

HALLIER-SOULIER, S.; GUILLOT, E. An immunomagnetic separation polymerase chain reaction assay for rapid and ultra-sensitive detection of *Cryptosporidium parvum* in drinking water. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 176, n. 2, p. 285-289, 1999.

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

HAYES, E. B.; MATTE, T. D.; O'BRIEN, T. R.; MCKINLEY, T. W.; LOGSDON, G. S.; ROSE, J. B.; UNGAR, B. L.; WORD, D. M.; PINSKY, P. F.; CUMMINGS, M. L. Large community outbreak of cryptosporidiosis due the contamination of a filtered public water supply. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 320, p. 1372-1376, 1989.

HAYES, S. L.; RICE, E. W.; WARE, M. W.; SCHAEFER III, F. W. Low pressure ultraviolet studies for inactivation of *Giardia muris* cysts. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 94, p. 54-59, 2003.

HEITMAN, T. L.; FREDERICK, L. M.; VISTE, J. R.; GUSELLE, N. J.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C.; OLSON, M. E. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 530-541, 2002.

HELLER, L.; BASTOS, R. K. X.; VIEIRA, M. B. C. M. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 79-92, 2004.

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

HIGGINS, J.A.; TROUT, J. M.; FAYER, R.; SHELTON, D.; JENKINS M. C. Recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples using continuous flow centrifugation. **Water Research**, Lyngby, v. 37, n. 15, p. 3551-3560, 2003.

HIRATA, T.; SHIMURA, A.; MORITA, S.; SUZUKI, M.; MOTOYAMA, N.; HOSHIKAWA, H.; MONIWA, T.; KANEKO, M. The effect of temperature on the efficacy of ozonation for inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Water Science and Technology**, London, v. 43, n.12, p. 163-166, 2001.

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

HOU, L.; LI, X.; DUNBAR, L.; MOELLER, R.; PALERMO, B.; ATWILL, E. R. Neonatal-mouse infectivity of intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after optimized in vitro excystation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 642-646, 2004.

HUETINK, R. E.; VAN DER GIESSEN, J. W.; NOORDHUIZEN, J. P.; PLOEGER, H. W. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, p. 53-67, 2001.

JAKUBOWSKI, W.; BOUTROS, S.; FABER, W.; FAYER, R.; GHIORSE, W.; LECHEVALLIER, M.; ROSE, J.; SCHAUB, S.; SINGH, A.; STEWART, M. Environmental methods for *Cryptosporidium*. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 88, n. 9, p. 107-121, 1996.

JELLISON, K. L.; DISTEL, D. L.; HEMOND, H. F.; SCHAUER, D. B. Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n.1, p. 452-458, 2004.

JENKINS, M.; TROUT, J. M.; HIGGINS, J.; DORSCH, M.; VEAL, D.; FAYER, R. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 89, p. 1-5, 2002.

JIANG, J.; ALDERISIO, A. A.; SINGH, A.; XIAO, L. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1135-1141, 2005.

JIANG, J.; XIAO, L. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, University of Guelph, v. 50, p. 542-547, 2003.

JOHNSON, D. C. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marineswaters. **Water Science and Technology**, London, v. 5, p. 439-442, 1995.

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**, Washington, v. 64, p. 4627, 1998.

KEEGAN, A. R.; FANOK, S.; MONIS, P. T.; SAINT, C. P. Cell culture-Taqman PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* disinfection. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2505-2511, 2003.

KORICH, D. G.; MEAD, J. R.; MADORE, M. S.; SINCLAIR, N. A.; STERLING, C. R. Chlorine and ozone inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. In: PROCEEDINGS WATER QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE, 1989, Philadelphia. **Anais...** Denver CO: American Water Works Association, 1989. p. 681-693.

KORICH, D. G.; MEAD, J. R.; MADORE, M. S.; SINCLAIR, N. A.; STERLING, C.R. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cyptosporidium parvum* oocyst viability. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 56, n. 5, p. 1423-1428, 1990.

KUHN, R. C.; ROCK, C. M.; OSHIMA, K. H. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild ducks along the Rio Grande River valley in southern New Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 1, p. 161-165, 2002.

LABATIUK, C. W.; SCHAEFER, F. W.; FINCH, G. R.; BELOSEVIC, M. Comparison of animal infectivity, excystation and fluorogenic dye as measures of *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3187-3192, 1991.

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**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3259-3264, 1996.

LALLO, M. A.; BONDAN, E. F. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in institutionalized dogs in the city of São Paulo, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, p. 120-125, 2006.

LAUBACH, H. E.; BENTLEY, C. Z.; GINTER, E. L.; SPALTER, J. S.; JENSEN, L. A. A study of risk factors associated with the prevalence of *Cryptosporidium* in villages around Lake Atitlan, Guatemala. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 8, n. 4, p. 319-323, 2004.

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 Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 45, p. 688-694, 1991.

LECHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D. Examining relationships between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium* and turbidity. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 84, n. 12, p. 54-60, 1992.

LECHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D. *Giardia* and *Cryptosporidium* in raw and finished drinking water. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, 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**, Washington, v. 57, p. 2610-2616, 1991.

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

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Critical Reviews in Microbiology**, Louisville, v. 28, p. 371-409, 2002.

LEE, J. K.; SONG, H. J.; YU, J. R. Prevalence of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* in non- HIV patients in Jeollanam-do, Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 43, n. 3, p. 111-114, 2005.

LEMARCHAND, K.; LEBARON, P. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 218, p. 203-209, 2003.

LEVINE, N. D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 66, n. 5, p. 830-834, 1980.

LI, H.; FINCH, G. R.; NEUMANN, N.; BELOSEVIC, M. Inactivation of *Cryptosporidium* by chlorine dioxide at 1°C. In: PROCEEDINGS OF THE AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE, 1998, San Diego. **Anais...** Denver, CO: American Water Works Association, 1998.

LINDO, J. F.; LEVY, V. A.; BAUM, M. K.; PALMER, C. J. Epidemiology of giardiasis and cryptosporidiosis in Jamaica. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 59, n. 5, p. 717-721, 1998.

LIYANAGE, L. R. J. **Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water**. Edmonton, Alberta, 1998. 190 f. Tese (Doctorate in Environmental Engineering) - University of Alberta, Canadá.

LIYANAGE, L. R. J.; FINCH, G. R.; BELOSEVIC, M. Synergistic effects of sequential exposure of *Cryptosporidium* oocysts to chemical disinfectants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON WATERBORNE *CRYPTOSPORIDIUM*, 1997, Newport Beach. **Anais...** Denver, CO: American Water Works Association, 1997. p. 41-51.

LOUIE, K.; GUSTAFSON, L.; FYFE, M.; GILL, I.; MACDOUGALL, L.; TOM, L.; WONG, Q.; ISAAC-RENTON, J. An outbreak of *Cryptosporidium parvum* in a Surrey pool with detection in pool water sampling. **Canada Communicable Disease Report**, Ottawa, v. 30, n. 7, p. 61-66, 2004.

LOUREIRO, E. C., LINHARES, A. C.; MATA, L. Cryptosporidiosis in children from 1 to 2 years of age, with acute diarrhea in Belém, Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, p.117-122, 1990.

LOWERY, C. J.; MOORE, J. E.; MILLAR, B. C.; MCCORRY, K. A.; XU, J.; ROONEY, P. J.; DOOLEY, J. S. Occurrence and molecular genotyping of *Cryptosporidium* spp. in surface waters in Northern Ireland. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 91, n. 5, p. 774-779, 2001.

LUNA, S.; REYES, L.; CHINCHILLA, M.; CATARINELLA, G. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en aguas superficiales en Costa Rica. **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago, v. 57, n. 1-2, p. 63-65, 2002.

MACÊDO, J. A. B. **Determinação de trihalometanos em águas de abastecimento público e indústria de alimento**. Viçosa, 1997. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.

MACÊDO, J. A. B. O processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados em função do pH e a Portaria 518/ 2004 do Ministério da Saúde. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 44., 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Associação Brasileira de Química, 2004. 11p.

MACÊDO, J. A. B.; BARRA, M. M. Processos de desinfecção com derivados clorados orgânicos em água para abastecimento público. In: ENCONTRO MINEIRO DE ENSINO DE QUÍMICA, 3., 2003, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2003. p. 1-22.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIE, K. A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERRCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B.; DAVIS, J. P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 3, p. 161-167, 1994.

MAIA, A. A. M.; OGASSAWARA, S.; PENA, H. F. de J.; HOGE, A. Y. A. Oocistos de *Cryptosporidium* spp nas fezes de bovinos em Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 47, n. 5, p. 717-719, 1995.

MARTINO, P.; GENTILE, G.; CAPRIOLI, A.; BALDASSARI, L.; DONELLI, G.; ARCESE, W.; FENU, S.; MICOZZI, A.; VENDITTI, M.; MANDELLI, F. Hospital acquired cryptosporidiosis in a bone marrow transplantation unit. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 158, p. 647-648, 1988.

MATHIEU, E.; LEVY, D. A.; VEVERKA, F.; PARRISH, M. K.; SARISKY, J. et al. Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 71, n. 5, p. 582-589, 2004.

McALLISTER, T. A.; OLSON, M. E.; FLETCH, A.; WETZSTEIN, M.; ENTZ, T. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 46, p. 47-55, 2005.

McCUIN, R. M.; BUKHARI, Z.; SOBRINHO, J.; CLANCY, J. L. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v. 45, n. 2, p. 69-76, 2001.

McGLADE, T. R.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; READ, C.; THOMPSON, R. C. Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, p. 251-262, 2003.

McGUIGAN, C. *Cryptosporidium* outbreak after a visit to a wildlife centre in northeast Scotland: 62 confirmed cases. **EuroSurveillance**, Paris, v. 10, n. 4, E050428.2, 2005.

McLAUHLIN, J.; PEDRAZA-DIAZ, S.; AMAR-HOETZENEDER, C.; NICHOLS, G.L. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3153-3158, 1999.

MEDEIROS, M. I. C.; NEME, S. N.; SILVA, P.; CAPUANO, D. M.; ERRERA, M. C.; FERNANDES, S. A.; VALLE, G. R.; AVILA, F. A. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto -SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 21-24, 2001.

MEUNIER, L.; CANONICA, S.; VON GUNTEN, U. Implications of sequential use of UV and ozone for drinking water quality. **Water Research**, Lyngby, v. 40, p. 1864-1876, 2006.

- MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 99-110, 1994.
- MIESEL, J. L.; PERERA, D. R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 70, p. 1156-1160, 1976.
- MILLARD, P. S.; GENSHEIMER, K. F.; ADDISS, D. G.; SOSIN, D. M.; BECKETT, G. A.; HOUCK-JANOSKI, A.; HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 272, p. 592-253, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **IDB – Indicadores e dados básicos – Brasil 2005**. Disponível em: <<http://www.tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2005/>> Acesso em: 16 nov. 2006.
- MOHANDAS, K.; SEHGAL, R.; SUD, A.; MALLA, N. Prevalence of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive individuals in Northern India. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tóquio, v. 55, p. 83-84, 2002.
- MOITINHO, M. L. R.; ROBERTO, A. C. B. S.; MARTINS, M. R. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em fezes diarreicas de crianças do município de Maringá-PR. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 29, p. 168-170, 1997.
- MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; SAINT, C. P. Molecular biology techniques in parasite ecology. **International Journal for Parasitology**, Parkville, v. 3, p. 551-562, 2002.
- MONIS, P. T.; SAINT, C. P. Development of a nested-PCR assay for the detection of *Cryptosporidium parvum* in finished water. **Water Research**, Lyngby, v. 35, n. 7, p. 1641-1648, 2001.
- MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, Bangkok, v. 3, p. 233-244, 2003.
- MORGAN-RYAN, U. M.; FALL, A.; WARD, L. A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I. M.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E.; LAL, A. A.; XIAO L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, University of Guelph, v. 49, n. 6, p. 433-440, 2002.
- MORGAN, U. M.; PALLANT, L.; DWYER, B. W.; FORBES, D. A.; RICH, G.; THOMPSON, R. C. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 4, p. 995-998, 1998.
- MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. PCR detection of *Cryptosporidium*: The way forward? **Parasitology Today**, London, v. 14, p. 241-245, 1998.

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

MOURA, H.; OLIVEIRA, L. M. *Cryptosporidium*: parasita de imunocomprometidos. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, Rio de Janeiro, v.21, p. 198- 202, 1985.

MUSIAL, C. E.; ARROWOOD, M. J.; STERLING, C. R.; GERBA, C. P. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water using polypropylene cartridge filters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 687-692, 1987.

NASCIMENTO, M. S.; SILVA, M.; CATANOZI, M. P. L. M. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização da uva. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 63-68, 2002.

NEWMAN, R. D.; ZU, S. X.; WUHIB, T.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in urban community in northeast Brazil. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 120, p. 500-505, 1994.

NICHOLS, R. A. B.; PATON, C. A.; CAMPBELL, B. M.; WASTLING, J.; SMITH, H. V. A sensitive, semi-quantitative direct PCR-RFLP assay for simultaneous detection of five *Cryptosporidium* species in treated drinking waters and mineral waters. **Water Science and Technology: Water Supply**, Lund University, v. 2, n. 3, p. 9-15, 2000.

NICHOLS, R. A. B.; SMITH, H. V. Optimization of DNA extraction and molecular detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural mineral water sources. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 3, p. 524-532, 2003.

NIME, F. A.; BUREK, J. D.; PAGE, D. L.; HOLSCHER, M. A.; YERDLEY, J. H. Acute enterocolitis in an human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 70, p. 592-598, 1976.

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

O'HANDLEY, R. M.; COCKWILL, C.; MCALLISTER, T. A.; JELINSKI, M.; MORCK, D. W.; OLSON, M. E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 214, p. 391-396, 1999.

OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L.; CRABB, J. H.; STERLING, C. R.; DUPONT, H. L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 180, n. 4, p. 1275-1281, 1999.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R.; RALSTON, B.; HOMPSON, R. C. A. Emerging issues of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, London, v. 20, p. 185-191, 2004.

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

OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde). **Brasil – O perfil do sistema de serviços de saúde**. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://www.opas.org.br>> Acesso em: 30 nov. 2006.

OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde). **Health in the Américas**. Washington: Scientific publication nº 569, 1998.

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

ORTEGA-MORA, L. M.; TRONCOSO, J. M.; ROJO-VAZQUEZ, F. A.; GOMEZ-BAUTISTA, M. Cross-reactivity of polyclonal serum antibodies generated against *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 8, p. 3442-3445, 1992.

OSHIRO, E. T ; DORVAL, M. E. C. ; NUNES, V. L. B.; SILVA, M. A. A. ; SAID, L. A. M. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 3, p. 277-280, 2000.

OURA, C. A. L.; BISHOP, R. P.; WAMPANDE, E. M.; LUBEGA, G. W.; TAIT, A. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. **International Journal for Parasitology**, Parkville, v. 34, n. 5, p. 603-613, 2004.

OWENS. J. H.; MILTNER, R. J.; SCHAEFER III, F. W.; RICE, E. W. Pilot-scale ozone inactivation of *Cryptosporidium*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, University of Guelph, v. 41, n. 5, p. S56-S57. 1994.

PANCIERA, R. J.; THOMASSEN, R. W.; GARNER, F. M. Cryptosporidiosis in a calf. **Veterinary Pathology**, Auburn, v. 8, p. 479-484, 1971.

PASCHOALATO, C. F. P. R.; DI BERNARDO, L.; FERREIRA, J. F. Demanda de cloro e permanganato de potássio para oxidação de substâncias húmicas e avaliação da formação de trihalometanos em água. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville. **Anais...** Joinville: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária Ambiental, 2003.

PAYMENT, P.; PLANTE, R.; EJKA, P. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 7, p. 188-193, 2001.

PEETERS, J. E.; MAZÁS, E. A.; MASSCHELEIN, W. J.; MARTINEZ DE MATURANA, I. V.; DEBACKER, E. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 6, p. 1519-1522, 1989.

PEREIRA, M. G. C.; ATWILL, E. R.; BARBOSA, A. P.; SILVA, S. A.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 66, n. 6, p. 787-793, 2002.

PERRINE, D.; GEORGES, P.; LANGLAIS, B. Efficacité de l'ozonization des eaux sur l'inactivation des oocysts de *Cryptosporidium*. **Bulletin de L' Academie National de Médecine**, Paris, v. 174, n. 6, p. 845-851, 1990.

POZIO, E.; REZZA, G.; BOSCHINI, A.; PEZZOTTI, P.; TAMBURRINI, A.; ROSSI, P.; DI FINE, M.; SMACCHIA, C.; SCHIESARI, A.; GATTEI, E.; ZUCCONI, R.; BALLARINI, P. Clinical cryptosporidiosis and human immunodeficiency virus (HIV)-induced immunosuppression: findings from a longitudinal study of HIVpositive and HIV-negative former injection drug users. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v.176, p. 969-975. 1997.

QUADROS, R. M. de. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. (TYZZER, 1907) detectada pelo método de imunofluorescência através da técnica de coloração da auramina em bovinos de propriedades rurais do município de Lages (SC), Brasil.** Porto Alegre, 2002. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Especialidade: Parasitologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; OLSON, M. E. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 114, p.113-122, 2003.

RANSOME, M. E.; WHITMORE, T. N.; CARRINGTON, E. G. Effect of disinfectants on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Water Science and Technology: Water Supply**, Lund University, v. 11, p. 75-89, 1993.

REDLINGER, T.; CORELLA-BARUD, V.; GRAHAM, J.; GALINDO, A.; AVITIA, R.; CARDENAS, V. Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States-Mexico border. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 66, n. 6, p. 794-798, 2002.

REDUKER, D. W.; SPEER, C. A. Factors influencing excystation in *Cryptosporidium* oocysts from cattle. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 71, n. 1, p. 112-115, 1985.

RENNECKER, J. L.; MARIÑAS, B. J.; OWENS, J. H.; RICE, E. W. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone. **Water Research**, Lyngby, v. 33, n. 11, p. 2481-2488, 1999.

RIMHANEN-FINNE, R.; HÖRMAN, A.; RONKAINEN, P.; HÄNNINEN, M. L. An IC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface waters in Finland. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v. 50, p. 299-303, 2002.

ROBERTSON, L. J.; GJERDE, B. Effect of sample holding time on recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p.1724-1725, 2000(a).

ROBERTSON, L. J.; GJERDE, B. Isolation and enumeration of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *Ascaris* eggs from fruits and vegetables. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, p. 775-778, 2000(b).

ROBERTSON, L. J.; FORBERG, T. ; HERMANSEN, L. ; GJERDE, B. K.; ALVSVAG, J. O.; LANGELAND, N. *Cryptosporidium parvum* infections in Bergen, Norway, during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in autumn and winter 2004. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 2218-2220, 2006.

ROCHELLE, P. A.; DE LEON, R.; STEWART, M. H.; WOLFE, R. L. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* in water. **Applied and Environmental Microbiology** , Washington, v. 63, n. 1, p.106-114, 1997.

ROCHELLE, P. A.; MARSHALL, M. M.; MEAD, J. R.; JOHNSON, A. M.; KORICH, D. G.; ROSEN, J. S.; DE LEON, R. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 3809-3817, 2002.

ROOK, J.; EVANS, S. Renoval of trihalomethane precursores from surface waters using weak base resins. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 9, n. 71, p. 520-524, 1979.

ROY, S. L.; DELONG, S. M.; STENZEL, S. A.; SHIFERAW, B.; ROBERTS, J. M.; KHALAKDINA, A.; MARCUS, R.; SEGLER, S. D.; SHAH, D. D.; THOMAS, S.; VUGIA, D. J.; ZANSKY, S. M.; DIETZ, V.; BEACH, M. J. Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 7, p. 2944-2951, 2004.

RUFFELL, K. M.; RENNECKER, J. L.; MARIÑAS, B. J. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide. **Water Research**, Lyngby, v. 34, n. 3, p. 868-876, 2000.

RUSNAK, J.; HADFIELD, T. L.; RHODES, M. M.; GAINES, J. K. Detection of *Cryptosporidium* oocyst in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, p. 135-1136, 1989.

RYAN, U. M.; BATH, C.; ROBERTSON, I.; READ, C.; ELLIOT, A.; MCINNES, L.; TRAUB, R.; BESIÉ, B. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4992-4997, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

SANFORD, S. E. Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1981-1985). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 6, p. 695-698, 1987.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "neglected diseases initiative". **Trends in Parasitology**, London, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.

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

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

SILVA, M. B. O. **Infecção natural e experimental de *Cryptosporidium parvum* em caprinos**: avaliação clínica, parasitológica e da resposta humoral. Belo Horizonte, 2000. 131 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

SIMMONS III, O. D.; SOBSEY, M. D.; HEANEY, C. D.; CHAEFER III, F. W.; FRANCOY, D. S. Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by Method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1123-1127, 2001.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 65, p. 262-266, 1955.

SLIFKO, T. R.; SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Emerging parasite zoonosis associated with water and food. **International Journal of Parasitology**, Parkville, v.30 nos. 12-13, p. 1379-1393, 2000.

SMITH, H. V. Detection of parasites in the environment. **Parasitology**, Cambridge, v. 117, p. 5113-5114, 1998.

SMITH, A. L.; SMITH, H. V. A comparison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and in vitro excystation for determining *Giardia intestinalis* cyst viability. **Parasitology**, Cambridge, v. 99, n. 3, p. 329-331, 1989.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; TAIT, A.; McLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, London, v. 22, n. 4, p.160-167, 2006.

SMITH, H. V.; ROBERTSON, L. J.; ONGERTH, J. E. Cryptosporidiosis and giardiasis: the impact of waterborne transmission. **Journal of Water Supply: Research and Technology – Aqua**, London, v. 44, n. 6, p. 258-274, 1995.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne cryptosporidiosis and the need for legislation. Reply. **Parasitology Today**, London, v. 14, p. 501-502, 2000.

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

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; CRISANTI, A.; SALLICANDRO, P.; MORGAN, U. M.; LE BLANCQ, S. M.; TCHACK, L.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 11, p. 3255-3259, 1998.

SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds – a review. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 87, p. 261-279, 2000.

STIBSS, H. H.; ONGERTH, J. E. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 24, p. 517-521, 1986.

STRAUB, T. M.; DALY, D. S.; WUNSHEL, S.; ROCHELLE, P. A.; DELEON, R.; CHANDLER, D. P. Genotyping *Cryptosporidium parvum* with an hsp70 single-nucleotide polymorphism microarray. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p.1817-1826, 2002.

STURBAUM, G. D.; REED, C.; HOOVER, P. J.; JOST, B. H.; MARSHALL, M. M.; STERLING, C. R. Species-specific, nested PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2665-2668, 2001.

SUNDERMANN, C. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBUM, B. L. Evaluation of disinfectants for ability to kill avian *Cryptosporidium* oocysts. **Companion Animal Practice**, Smyrna, v. 2, p. 36-39, 1987.

TAMBURRINI, A.; TOSINI, F.; LA ROSA, G.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. Identification and characterization of three antigenic proteins from *Cryptosporidium parvum* sporozoites using a DNA library expressing poly-histidine tagged peptides. **International Journal for Parasitology**, Parkville, v. 29, n. 12, p. 1925-1933, 1999.

TANRIVERDI, S.; TANYELI, A.; BASLAMISLI, F.; KOKSAL, F.; KILINC, Y.; FENG, X.; BATZER, G.; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real-time PCR and melting curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 9, p. 3237-3244, 2002.

THOMPSON, R. C. A.; O'BRIEN, P. A.; MELONI, B. P.; O'DONOGHUE, P.; CONSTANTINE, C. C.; MORGAN, U. M.; Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 52, n. 6, p. 559-564, 1995.

THURMAN, R.; FAULKNER, B.; VEAL, D.; CRAMER, G.; MEIKLEJOHN, M. Water quality in rural Australia. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 84, p. 627-632, 1998.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; WATT, P.; DOWD, S. E.; ENRIQUEZ, R.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, p. 378-382, 2002.

TUMWINE, J. K.; KEKITIINWA, A.; BAKEERA-KITAKA, S.; NDEEZI, G.; DOWNING, R.; FENG, X.; AKIYOSHI, D. E.; TZIPORI, S. Cryptosporidiosis and microsporidiosis in Ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 73, n. 5, p. 921-925, 2005.

TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Dallas, v. 5, p. 12-13, 1907.

TYZZER, E. E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of International Medical Research**, Worthing, v. 18, p. 487-509, 1910.

TZIPORI, S.; CAMPBELL, I.; SHERWOOD, D.; SNODGRASS, D. R.; WHITELAW, A. An outbreak of calf diarrhea attributed to cryptosporidial infection. **The Veterinary Record**, London, v. 107, p. 579-580, 1980.

UNGAR, B. L. P. Cryptosporidiosis in humans. In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC PRESS, 1990. p. 59-82.

UNGAR, B. L.; GILMAN, R. H.; LANATA, C. F.; PEREZ-SCHAEEL, I. Seroepidemiology of *Cryptosporidium* infection in two Latin American populations. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 157, n. 3, p. 551-556, 1988.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **EPA Information Collection Rule microbial laboratory manual**. U.S. EPA 600-R-95-178. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 1996.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA**. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water. EPA 821-R-99-001, 1999.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA**. U.S. EPA 821-R-01-025. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 2001.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Source water monitoring guidance manual for public water systems for the Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule (LT2 Rule)**. U.S. EPA 815-D-03-005. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 2003.

VENCZEL, L. V.; ARROWOOD, M.; HURD, M.; SOBSEY, M. D. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1598-1601, 1997.

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

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

VIEIRA, L. S.; SILVA, M. B. O.; TOLENTINO, A. C. V.; LIMA, J. D.; SILVA, A. C. Outbreak of cryptosporidiosis in dairy goats in Brazil. **The Veterinary Record**, London, v.140, p. 427-428, 1997.

VILLENEUVE, A. **Les zoonoses parasitaires: infection chez les animaux et chez l'homme**. Montréal : Les Presses de l'Université de Montréal, 2004. 499p.

VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water : part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. **Water Research**, Lyngby, v. 37, n. 7, p. 1469-1487, 2003.

WANG, K. X.; LI, C. P.; WANG, J.; PAN, B. R. Epidemiological survey of cryptosporidiosis in Anhui Province China. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 8, n. 2, p. 371-374, 2002.

WARD, L. A.; WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, North Liberty, v. 41, p. 37-42, 2001.

WARD, P. I.; DESPLAZES, P.; REGLI, W.; RINDER, H.; MATHIS, A. Detection on eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. **Parasitology**, Cambridge, v. 124, p. 359-368, 2002.

WARE, M. W.; SCHAEFER, F. W. The effects of time and temperature on flow cytometry enumerated live *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Letters in Applied Microbiology**, Bradford, v. 41, p. 385-389, 2005.

WEBER, R.; BRYAN, R. T.; BISHOP, H. S.; WAHLQUIST, S. P.; SULLIVAN, J. J.; JURANEK, D. D. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 7, p. 1323-1327, 1991.

WEISS, J. B. PCR detection of *Giardia lamblia*. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p. 480-485.

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

WORLD DEVELOPMENT REPORT. **Equity and development**. The World Bank, 2006.

WIEDENMANN, A.; KRÜEGER, P.; BOTZENHART, K. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples (a review of published protocols and current developments). **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Springer Berlin, v. 21, p. 150-166, 1998.

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

XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHECKLEY, W.; CABRERA, L.; GILMAN, R. H.; LAL, A. A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 183, n. 3, p. 492-497, 2001.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I. M.; ESCALANTE, C. C.; MANTALI, R. J. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1578-1583, 1999.

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

XIAO, L.; SULAIMAN, I. M.; RYAN, U. M.; ZHOU, L.; ATWILL, E. R.; TISCHLER, M. L. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, Parkville, v. 32, p.1773-1758, 2002.

ZALI, M. R.; MEHR, A. J.; REZAIAN, M.; MEAMAR, A. R.; VAZIRI, S.; MOHRAZ, M. Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV- positive individuals in Iran. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tóquio, v. 57, p. 268-270, 2004.

ZHOU, L.; SINGH, A.; JIANG, J.; XIAO, L. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw water in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n.11, p. 5254-5257, 2003.

ANEXOS

ANEXO 1 - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO PARA *Cryptosporidium parvum* UTILIZANDO ULTRA-SOM E ENZIMAS

- ✚ Descongelar os oocistos purificados em banho-maria a 65°C por 5 minutos;
- ✚ Colocar 200 µL da suspensão (contagem conhecida) em um tubo de 2,0 mL, acrescentar 1.000 µL de solução fisiológica 0,85% e homogeneizar;
- ✚ Centrifugar a 12.000 g por 5 minutos, em temperatura ambiente;
- ✚ Descartar o sobrenadante;
- ✚ Ressuspender o sedimento em 1.000 µL de solução fisiológica 0,85% (repetir duas ou três vezes, até que o sobrenadante fique claro);
- ✚ Ressuspender o sedimento em tampão de lise (500 µL) contendo β-mercaptoetanol [50 µL de 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) + 50 µL 50 mM EDTA (pH 8,0) + 50 µL SDS 10% + 3,5 µL 70 mM β-mercaptoetanol + 346,5 µL de água ultrapura];
- ✚ Congelar (-196°C) e descongelar (37°C) 3 vezes;
- ✚ Aplicar cinco ciclos de ultra-som (30 segundos a 50 Hz) conservando em banho de gelo;
- ✚ Incubar em banho-maria a 65°C por 1 hora e 30 minutos;
- ✚ Adicionar lisozima (5 µL de uma solução recente a 100 mg/mL);
- ✚ Incubar em banho-maria a 37°C por 60 minutos;
- ✚ Digerir com RNase (10 mg/mL) em banho-maria a 37°C por 60 minutos;
- ✚ Acrescentar 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubar novamente em banho-maria a 55°C por 2 h e 30 minutos ou *over night* ;
- ✚ Parar a reação a 95°C por 10 minutos e deixar em temperatura ambiente por 15 minutos;
- ✚ Acrescentar 500 µL da solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugar a 12.000 g por 15 minutos;
- ✚ Transferir o sobrenadante para um tubo limpo e acrescentar 500 µL de clorofórmio puro e centrifugar a 12.000 g por 15 minutos;

- ✚ Transferir o sobrenadante para um outro tubo limpo e acrescentar 30 μL de acetato de sódio 3 M, e 1.000 μL de etanol puro gelado e centrifugar a 12.000 g por 30 minutos;
- ✚ Descartar o sobrenadante e acrescentar 500 μL de etanol 70°C (gelado) e centrifugar a 12.000 g por 15 minutos;
- ✚ Descartar o sobrenadante, secar o tubo a vácuo por 15 minutos;
- ✚ Eluir o DNA com 100 μL do tampão TE (Tris-EDTA) e armazenar a 4°C.

ANEXO 2 – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA ASSOCIANDO CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO E ENZIMAS (PROTOCOLO DESCRITO POR WEISS, 1993 E MODIFICADO)

- ✚ Ao sedimento de oocistos adicionar 500 μL de tampão TEN (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) esterilizado e suspendê-lo usando agitador mecânico;
- ✚ Congelar a suspensão obtida em nitrogênio líquido a -196°C por 5 minutos e descongelá-la, em banho-maria, a 37°C por 5 minutos;
- ✚ Adicionar 5 μL de solução de lisozima fresca, preparada em tampão TEN e na concentração de 100 mg/mL. Incubar a mistura a 37°C , em banho-maria com agitação, por 1 hora;
- ✚ Adicionar 50 μL de solução de SDS a 5% (preparada em tampão TEN) e misturar;
- ✚ Adicionar 2,5 μL de solução de proteinase K (preparada em água e na concentração de 20 mg/mL) e homogeneizar;
- ✚ Incubar a 55°C , em banho-maria com agitação, por 30 minutos;
- ✚ Congelar e descongelar o material duas vezes de modo idêntico ao descrito no item 2;
- ✚ Aquecer o material a no mínimo 95°C , em banho-maria, por 10 minutos, para inativação da protease;
- ✚ Centrifugar a mistura a 1.000 g por 5 minutos. Transferir o líquido sobrenadante para um tubo novo esterilizado;
- ✚ Adicionar 10 μL de RNase (10 mg/mL). Incubar a mistura a 37°C , em banho-maria com agitação, por 30 minutos;
- ✚ Fazer extração de restos celulares e proteínas com solução saturada de fenol, depois com a mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico nas proporções de 25:24:1, respectivamente, e finalmente com clorofórmio puro:
 - Verificar o volume de líquido presente no tubo que contém a amostra e adicionar, com micropipeta apropriada, quantidade igual de solução de fenol saturada;
 - Misturar, delicadamente, invertendo o tubo 10 vezes;

- Centrifugar a 12.000 g, a 20°C, por 5 minutos. Após a centrifugação, retirar, cuidadosamente, o tubo da centrífuga e observar se há duas camadas;
 - Coletar o líquido da camada superior e transferi-lo para um tubo novo. Repetir o procedimento de extração com fenol até que o líquido da camada superior esteja límpido;
 - Fazer a extração novamente, mas com a mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), de modo idêntico ao descrito para a solução de fenol;
 - Repetir o processo de extração, mas com clorofórmio puro, de modo idêntico ao descrito para a solução de fenol;
- ✚ Terminada a extração com solventes orgânicos, verificar o volume de líquido presente no tubo e adicionar 10% de solução de acetato de sódio 3 M, pH 6,0;
 - ✚ Novamente verificar o volume de líquido presente no tubo e adicionar etanol absoluto gelado, em dobro, para provocar a precipitação do DNA. Inverter o tubo, delicadamente, para homogeneização;
 - ✚ Manter a -20°C por 4 a 12 horas;
 - ✚ Centrifugar a 12.000 g, a 4°C, por 30 minutos. Descartar o líquido sobrenadante;
 - ✚ Lavar o sedimento de DNA adicionando 300 µL de solução de etanol a 70% e suspendê-lo por agitação leve do tubo;
 - ✚ Centrifugar a 12.000 g, a 4°C, por 5 minutos. Após, descartar a solução de etanol. Repetir esta lavagem com etanol 70%;
 - ✚ Secar o sedimento de DNA em estufa, a 37°C, por 15 minutos mantendo o tubo aberto e em posição horizontal;
 - ✚ Após seco o DNA, adicionar 100 µL de tampão TE (Tris-EDTA) e suspendê-lo agitando levemente o tubo com a mão;
 - ✚ Estocar o tubo a 4°C, por 12 horas, para que ocorra a solubilização do DNA. Decorrido este tempo, o DNA estará pronto para ser logo submetido à PCR ou então armazená-lo a -20°C para uso posterior.