UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SILVIA CRISTINA OSAKI

Cryptosporidium spp.: DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS MOLECULARES E IMUNOQUÍMICAS PARA A DETECÇÃO DE OOCISTOS EM ÁGUA E AVALIAÇÃO DA SUA REMOÇÃO PELOS MÉTODOS CONVENCIONAIS DE TRATAMENTO DA ÁGUA

CURITIBA

2009

SILVIA CRISTINA OSAKI

Cryptosporidium spp.: DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS MOLECULARES E IMUNOQUÍMICAS PARA A DETECÇÃO DE OOCISTOS EM ÁGUA E AVALIAÇÃO DA SUA REMOÇÃO PELOS MÉTODOS CONVENCIONAIS DE TRATAMENTO DA ÁGUA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração: Saúde Humana e Animal.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Vanete Thomaz Soccol

Co-orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Adriana Oliveira Costa

CURITIBA

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

O81c Osaki, Silvia Cristina
Cryptosporidium spp: desenvolvimento de técnicas moleculares e imunoquímicas para a detecção de oocistos em água e avaliação da sua remoção pelos métodos convencionais de tratamento da água. Silvia Cristina Osaki – Curitiba, 2009.

174 p.

Orientadora: Profª. Drª.Vanete Thomaz Soccol
Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná

Bibliotecária: Neide O. S. Paula – CRB9- 1477

TERMO DE APROVAÇÃO

Dedico este Trabalho

... Ao meu amor Pinduca, pela paciência, companheirismo, amor e lealdade imensuráveis, que permitiram a realização e conclusão desse trabalho;

...Ao meu amado filhinho Vitor, que sofreu desde pequeno minhas constantes ausências e por tornar meus dias mais felizes.

Agradecimentos Especiais

... Aos meus pais, Kazuo e Hisako, por acreditarem na Educação como um caminho para um mundo melhor.

...À minha irmã Márcia e meu cunhado Adilson, por mostrarem que o trabalho e a honestidade sempre valem a pena.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, por sua competente orientação, visão crítica e construtiva, que permitiram o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos coordenadores do curso de Pós-Graduação, Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol e Professora Dra. Luciana de Souza Vandenberghe pela dedicação e empenho dispensados ao curso.

À minha Co-orientadora, Professora Dra. Adriana O. Costa, pelo auxílio nos experimentos e no preparo dos extratos antigênicos, assim como pelas valorosas sugestões e às Professoras Doutoras: Edilene A. Castro e Rosangela C. Paulino pelo imenso auxílio nos experimentos.

Ao Professor Dr. Silvio Marques Zanata, por permitir o uso de seu laboratório e pelas sugestões sempre bem colocadas.

Ao Corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, pelo estímulo constante da busca e aperfeiçoamento.

À Universidade Federal do Paraná – UFPR, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Á SANEPAR por permitir a realização das coletas nas Estações de Tratamento da Água (ETA Iguaçu, Iraí, Passaúna e Rio Pequeno), e pelas orientações e sugestões preciosas do senhor Carlos Rattmann durante a realização dos experimentos e pelo fornecimento de alguns materiais e equipamentos.

Aos funcionários do TECPAR: Jorge Bacila Agottani, Ludmilla Troiano, Ernesto Krüger e Tânia Penha pelo imenso auxílio na conjugação dos anticorpos.

À Profa. Dra. Marcia Benedita de Oliveira Silva, da Universidade do Triângulo Mineiro, que gentilmente forneceu os oocistos de *Cryptosporidium parvum*.

Às Professoras Doutoras Rosângela C. Paulino e Larissa M. Alvarenga pelas brilhantes críticas e sugestões dadas na qualificação, que com certeza enriqueceram muito este trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica, Juliana Tracz Pereira e Luciane Hennig, pela ajuda sempre dispensada e pela amizade formada durante o período da Pós-Graduação.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular, Nelson Fernandes, Ellen Marques, Juliana Tracz, Lud Troiano, Giovana Boff, Saloê Bispo, Samira Ehlers, Yanê Carvalho, Antônio Procópio, Jessé Trupel, Luciane Hennig, Silvana Alban, Soraia Gilber, Tatiana Gazda, Martha Greca, Magda Costa, Guilherme Garcia, Ricardo Fendrich, André Gonçalves e André Melo pelas risadas, amizade,

carinho, companheirismo e cumplicidade de todos estes anos, que sempre serão lembradas com muitas saudades.

Aos bolsistas de Iniciação Científica Thiago Noleto e Rafaela Veiga por toda ajuda prestada durante o desenvolvimento dessa tese.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação Michele, Daniel, Tânia, Krüger, Wilerson, Katherine, pela agradável convivência e pelas oportunidades de aprendizagem compartilhadas no decorrer do curso.

Ao meu sogro João e minha sogra Leonora, que sempre nos socorreram nos momentos de aperto.

Aos amigos Rebeca, Celso e Rafinha por me acolherem durante esses anos todos em sua casa.

À Giu, Dona Dil, seu Kasecker e Nena por cuidarem do meu filhinho e nos acolher com tanto carinho em sua casa.

Ao meu grande amigo Anderson pela sugestão e empurrão no meu doutorado; à querida amiga Ane Micheli, pelos momentos de descontração e devaneios; e à amiga Sandra, pelos momentos de alegria no nosso trabalho voluntário e pelo notebook, instrumento importantíssimo na finalização dessa tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida na reta final desse trabalho.

Por fim ficam minhas desculpas aqueles que não foram lembrados.

A vida não é regida pela vontade ou determinação. A vida é um conjunto de nervos, fibras e células que se formam lentamente, onde se esconde o pensamento e a paixão sonha seus sonhos."

Oscar Wilde

RESUMO

Cryptosporidium é um patógeno emergente responsável por um grande número de surtos de diarreia em humanos em todo o mundo. Entretanto, a ocorrência de surtos epidêmicos no Brasil é pouco conhecida. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo padronizar técnicas de detecção de *Cryptosporidium* sp. em água e avaliar sua presença em água usada para o abastecimento público da região metropolitana de Curitiba, Paraná. Duas metodologias foram desenvolvidas e/ou padronizadas para atender a esse objetivo. A primeira foi a técnica de PCR, quando foram testadas quatro técnicas de extração de DNA e comparada a eficiência de cinco pares de *primers.* O melhor resultado obtido para a extração de DNA foi o que utilizou o *kit* comercial, associado à *nested* PCR sendo capaz de detectar DNA do parasito em água com apenas dois oocistos. Anticorpos policlonais anti-*Cryptosporidium* sp. foram produzidos em coelhos e conjugados com isotiocianato de fluoresceína para realização da imunofluorescência direta. Os animais tiveram uma boa resposta imune e o conjugado produzido foi utilizado com sucesso, sendo capaz de detectar até cinco oocistos/"poço" que corresponde a uma contaminação de 250 oocistos/mL. Padronizadas as técnicas, foi necessária a realização da contaminação experimental da água em escala laboratorial através do *jar test* para testar essas metodologias. Seis litros de água bruta, provenientes da estação de tratamento de água Iguaçu (ETA Iguaçu) foram contaminados com oocistos de *Cryptosporidium parvum* nas concentrações de 0,1 a 100 oocistos/mL e três coagulantes com diferentes concentrações foram testados nos ensaios. Em todos os experimentos foi possível encontrar oocistos após a filtração, demonstrando uma inabilidade dos processos convencionais de tratamento da água em remover oocistos de *Cryptosporidium*. Após as metodologias serem testados em escala laboratorial, amostras de água e de lodo da água provenientes de quatro estações de tratamento de água da região metropolitana de Curitiba foram colhidas, quinzenalmente, durante dois meses e meio e testadas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium*. Em duas estações e em três coletas diferentes foi possível detectar *Cryptosporidium* sp. pela técnica de PCR. Os resultados desses experimentos mostraram que essas metodologias podem ser utilizadas com segurança na detecção de *Cryptosporidium* em água e apresentam um baixo custo para a sua realização.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* sp. PCR. Nested PCR. Anticorpos Policlonais. Fluoresceína. Água.

ABSTRACT

The present work aimed at standardizing the techniques for detecting *Cryptosporidium* sp. in water and assess its presence in water used for public supply in the metropolitan area of Curitiba - Brazil. Two methodologies were developed and/or standardized to attain that goal. The first one was the PCR technique, with which four methods for DNA extraction were tested, and five pairs of primers were compared. The best result was obtained by using the commercial kit for DNA extraction, coupled with the nested PCR, which was able to detect the parasite's DNA in water with as few as two oocysts. Anti-*Cryptosporidium* sp polyclonal antibodies were produced in rabbits and conjugated with fluorescein isothiocyanate to perform direct immunofluorescence. The animals presented a good immune response and the conjugate produced was used with success, for it was able to detect up to five oocysts/well, which corresponds to a contamination of 250 oocysts/mL. After having standardized the techniques, it was necessary to perform experimental water contamination at laboratory scale by the jar test to assess these methods. Six liters of raw water from the Iguaçu water treatment plant (Iguaçu WTP) were contaminated with *Cryptosporidium parvum* in concentrations from 0.1 to 100 oocysts/mL; and three coagulants in different concentrations were tested in the trials. In all experiments, oocysts could be found after filtration, showing the incapacity of conventional water treatment processes to remove *Cryptosporidium* oocysts. After the methods had been tested at lab scale, water samples were collected from four water treatment plants in the metropolitan area of Curitiba every two weeks for two and a half months, and tested to detect the presence of *Cryptosporidium* oocysts. In two plants and in three different collections it was possible to detect *Cryptosporidium* sp. by the PCR technique. The results of these experiments showed that these methodologies can be used safely for detecting *Cryptosporidium* oocysts, and proved to have a low implementation cost.

Keywords: PCR; Polyclonal Antibodies; Fluorescein; *Cryptosporidium* sp.; Water.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

FIGURA 1- MECANISMO DE TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA DO *Cryptosporidium hominis* E *C. parvum* 34

CAPÍTULO II

FIGURA 1- POSIÇÕES DOS PARES DE *PRIMERS* ESPECÍFICOS PARA *Cryptosporidium* spp. ACESSO NO GENBANK (COWP Z22537; SSU rRNA AF093489)..... 78

FIGURA 2- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE *Cryptosporidium* spp. POR PCR COM *OS PRIMERS* XIAF/XIAR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (1325PB). MM: MARCADOR MOLECULAR, CN: CONTROLE NEGATIVO..... 81

FIGURA 3- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE *Cryptosporidium* spp. POR nPCR COM OS *PRIMERS* XIA2F/XIA2R. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (826-864PB). MM: MARCADOR MOLECULAR, CN: CONTROLE NEGATIVO..... 81

FIGURA 4- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE *Cryptosporidium* spp POR PCR COM *OS PRIMERS* AWA995F/1206R. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (211PB). MM: MARCADOR MOLECULAR, CN: CONTROLE NEGATIVO..... 82

FIGURA 5- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE *Cryptosporidium parvum/C. hominis* POR PCR COM *OS PRIMERS* LAX469F/869R. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO. MM: MARCADOR MOLECULAR, CN: CONTROLE NEGATIVO..... 82

FIGURA 6- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE *Cryptosporidium parvum/C. hominis* POR PCR COM *OS PRIMERS CRY*15F/9R. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO. MM: MARCADOR MOLECULAR, CN: CONTROLE NEGATIVO..... 82

CAPÍTULO III

FIGURA 1- FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO E CONJUGAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Cryptosporidium* COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA..... 96

FIGURA 2- COLUNA DE CROMATOGRAFIA POR FILTRAÇÃO EM GEL UTILIZADA PARA A PURIFICAÇÃO DO CONJUGADO ANTI-*Cryptosporidium*. INÍCIO (A) E FINAL (B) DA PURIFICAÇÃO..... 99

FIGURA 3- COMPARAÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA REAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO, UTILIZANDO O TESTE ELISA, DISTRIBUÍDAS AO LONGO DAS COLHEITAS DE SANGUE, REALIZADAS A CADA 15 DIAS, ENTRE OS ANIMAIS IMUNIZADOS COM OS DOIS EXTRATOS ANTIGÊNICOS (SOLÚVEL E PARTICULADO) DE *Cryptosporidium parvum*..... 102

FIGURA 4- OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* DETECTADOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA UTILIZANDO ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*Cryptosporidium* PRODUZIDOS EM COELHOS. AUMENTOS DE 200 X (A) E 400 X (B)..... 103

CAPÍTULO IV

FIGURA 1- ETAPAS DO ENSAIO EM JARTEST® COM ÁGUA CONTAMINADA EXPERIMENTALMENTE COM OOCISTOS DE *Cryptosporidium* E PESQUISA DO PARASITO..... 116

FIGURA 2- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO A PRESENÇA DE DNA DE *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUBMETIDAS AOS ENSAIOS EM JARTEST® QUANDO UTILIZADO O COAGULANTE SULFATO DE ALUMÍNIO E TÉCNICA DE PCR UTILIZANDO OS INICIADORES AWA995F/AWA1206R..... 125

CAPÍTULO V

FIGURA 1A- LOCALIZAÇÃO DAS QUATRO ETAS EM CUJA ÁGUA E LODO DE ÁGUA FOI PESQUISADA A PRESENÇA DE *Cryptosporidium* 138

FIGURA 1B- ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUA – ETA IGUAÇU, LOCAL DE COLETA DE ÁGUA..... 139

FIGURA 1C- ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUA – ETA IGUAÇU- LOCAL DE COLETA DO LODO DE ÁGUA..... 140

FIGURA 2- ETAPAS DO ENSAIO EM JARTEST® COM ÁGUA COLHIDA NAS ETAS E PESQUISA DO PARASITO..... 141

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1- ESPÉCIES DE *Cryptosporidium* E PRINCIPAIS HOSPEDEIROS..... 32

TABELA 2- RESUMO DOS PRINCIPAIS SURTOS DE CRIPTOSPORIDIOSE, ASSOCIADOS AO CONSUMO OU CONTATO COM ÁGUAS CONTAMINADAS, RELATADOS NA LITERATURA NO PERÍODO DE 1983 A 1998 SEGUNDO MILLER, 1999..... 50

TABELA 3- RESUMO DOS PRINCIPAIS SURTOS DE CRIPTOSPORIDIOSE, ASSOCIADOS AO CONSUMO OU CONTATO COM ÁGUAS CONTAMINADAS, RELATADOS NA LITERATURA NO PERÍODO DE 1998 A 2001 SEGUNDO SMITH *et al*. (2006); LIM *et al*. (2004); 52
**CAUSER *et al*. (2006).....

TABELA 4- RESUMO DOS PRINCIPAIS SURTOS DE CRIPTOSPORIDIOSE, ASSOCIADOS AO CONSUMO OU CONTATO COM ÁGUAS CONTAMINADAS, RELATADOS NA LITERATURA NO PERÍODO DE 2002 A 2008..... 53

CAPÍTULO II

TABELA 1- RESULTADOS DAS REAÇÕES DE PCR E nPCR PARA AMPLIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE *Cryptosporidium* spp. ou *C. parvum/C. hominis* EM AMOSTRAS CONTENDO 10^5 A 10 OOCISTOS, QUANDO O DNA FOI EXTRAÍDO PELO MÉTODO DE *SALTING-OUT* MODIFICADO……. 79

TABELA 2- RESULTADOS DAS REAÇÕES DE PCR E nPCR PARA AMPLIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE *Cryptosporidium* spp. ou *C. parvum/C. hominis* EM AMOSTRAS CONTENDO 10^5 A 1 OOCISTOS, QUANDO O DNA FOI EXTRAÍDO PELO KIT CHARGESWITCH..... 80

TABELA 3- PADRONIZAÇÃO DA PCR UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $MgCl_2$, *PRIMERS* E *TAQ* DNA POLIMERASE..... 80

CAPÍTULO III

TABELA 1- RESULTADOS DAS REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS CONTENDO 10^3 A 1 OOCISTOS..... 103

CAPÍTULO IV

TABELA 1- DATAS DAS COLETAS DE ÁGUA BRUTA NA ETA-IGUAÇU E PARÂMETROS DA ÁGUA NO MOMENTO DA COLETA..... 115

TABELA 2- FATOR DE CORREÇÃO PARA DETERMINAR A NECESSIDADE OU NÃO DE UTILIZAÇÃO DE ALCALINIZANTE, DOS DIFERENTES COAGULANTES……. 118

TABELA 3- ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO/ FILTRAÇÃO UTILIZANDO SULFATO DE ALUMÍNIO A 1% COMO COAGULANTE..... 121

TABELA 4- ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO/ FILTRAÇÃO UTILIZANDO POLICLORETO DE ALUMÍNIO (PAC) 1% COMO COAGULANTE..... 122

TABELA 5- ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO/ FILTRAÇÃO UTILIZANDO CLORETO FÉRRICO 1% COMO COAGULANTE..... 123

TABELA 6- DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* PELAS TÉCNICAS DE IFD E PCR QUANDO UTILIZADO O SULFATO DE ALUMÍNIO 1% COMO COAGULANTE..... 124
.

TABELA 7- DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* PELAS TÉCNICAS DE IFD E PCR QUANDO UTILIZADO O POLICLORETO DE ALUMÍNIO (PAC) 1% COMO COAGULANTE..... 125

TABELA 8- DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* PELAS TÉCNICAS DE IFD E PCR QUANDO UTILIZADO O CLORETO FÉRRICO 1% COMO COAGULANTE..... 126

CAPÍTULO V

TABELA 1- CONCENTRAÇÃO DA ÁGUA BRUTA ATRAVÉS DE ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO/ UTILIZANDO SULFATO DE ALUMÍNIO A 1% COMO COAGULANTE..... 143

TABELA 2- DETECÇÃO DO DNA DE *Cryptosporidium* UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR EM AMOSTRAS DE ÁGUA BRUTA E LODO PROVENIENTES DAS ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DA ÁGUA. Y (MÉTODO YANKO), S (SACAROSE), F (FILTRO DE CELULOSE)..... 145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<:	Menor que
µm:	Micrometro
A:	Adenina
AIDS:	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)
$Al_2(SO_4)_3$:	Sulfato de alumínio,
AP-PCR:	*Arbitrarily Primed* PCR
BSA:	Soro albumina bovina (*bovine serum albumin*)
C:	Citosina
$CaCl_2$:	Cloreto de Cálcio
CEEA/UFPR:	Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná
cmHg:	Centrímetros de Mercúrio
CN:	Controle Negativo
COMEC:	Coordenação da Região Metropolitana de Curitiba
COWP:	*Cryptosporidium oocyst wall protein*
D.O:	Densidade Óptica
DAPI:	4´,6-diamidino-2-fenilindol
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
dNTP:	Deoxinucleotídeos Trifosfato
EDTA:	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA:	Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme*-Linked ImmunoSorbent Assay-*ELISA)*
ETA:	Estação de Tratamento da Água
ETOH:	Etanol
F:	Forward
$FeCl_2$:	Cloreto Férrico
FITC:	Isotiocianato de Fluoresceína
g:	Grama
G:	Guanina
H_2O_2:	Peróxido de Hidrogênio
H_2SO_4:	Ácido Sulfúrico
IFD:	Imunofluorescência Direta
IgG:	Imunoglobulinas G
IgM:	Imunoglobulinas M
IMS:	Separação Imunomagnética
KDa:	Quilodalton
km^2:	Quilômetros quadrados
L:	Litro
Log:	Logaritmo
M:	Molar
mg/L:	Miligramas por Litro
$MgCl_2$:	Cloreto de Magnésio
Min:	Minutos
mL:	Mililitros
mM:	Milimolar
mRNA:	RNA mensageiro
ND:	Não Detectado

ng:	*Nanograma*
nm:	Nanômetro
nPCR:	*Nested* PCR
ºC:	Graus Celsius
OPD:	Ortofenilenodiamino
p^{32}:	Fósforo Radioativo
PAC:	Policloreto de Alumínio
PB:	Pares de Base
PBS:	Solução Salina Tamponada (*Phosphate Buffer Saline*)
PBST:	Solução Salina Tamponada + Tween 20 (*Phosphate Buffer Saline + Tween 20*)
PCR:	Reação em Cadeia pela Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)
PCR-RFLP:	*Restriction Fragment Length Polymorphism*
pH:	Potencial de Hidrogênio
PM:	Peso Molecular
ppm :	Parte por Milhão
Primer:	Oligonucleotídeos iniciadores
R:	Reverse
RAPD:	Amplificação Randômica do DNA Polimórfico
RNA:	Ácido Ribonucléico
RNAse:	Ribonuclease
Rpm:	Rotações por minuto
rRNA:	RNA ribossômico
RT-PCR:	PCR por Transcriptase Reversa
SANEPAR:	Companhia de Saneamento do Paraná
SAS:	Sulfato de Amônio Saturado
SDS:	Dodecil Sulfato de Sódio
SSR:	*Simple Sequence Repeat*
SSU rRNA:	Menor Subunidade do DNA ribossômico (*Small Subunit Ribosomic DNA*)
T:	Timina
TECPAR:	Instituto de Tecnologia do Paraná
TEM:	Tris-EDTA-NaCl
UFPR:	Universidade Federal do Paraná
UI/mL:	Unidades Internacionais por mililitros
USEPA:	*United States Environmental Protection Agency*
UT:	Unidade de turbidez
UV:	Ultravioleta
v/v:	Volume/Volume
xg:	Gravidade

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**22**
	OBJETIVO GERAL	**25**
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	**25**
2	**REFERÊNCIAS**	**27**
	CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	**29**
1.	**ASPECTOS HISTÓRICOS E TAXONOMIA DO *Cryptosporidium* spp**	**30**
2	**CICLO DE VIDA E TRANSMISSÃO**	**33**
3	**PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS DA CRIPTOSPORIDIOSE**	**36**
4	**TRATAMENTO DA CRIPTOSPORIDIOSE**	**37**
5	**DIAGNÓSTICO DA CRIPTOSPORIDIOSE**	**38**
5.1	MICROSCOPIA E ENSAIO IMUNOLÓGICO	38
5.2	HISTOLOGIA	39
5.3	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	39
6	**DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS (PCR)**	**40**
6.1	TÉCNICAS DE CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARA A DETECÇÃO DE OOCISTOS EM ÁGUA	41
6.2	MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DO DNA DO PARASITO	42
6.2.1	Hibridização de Sondas de DNA	42
6.2.2	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	43
6.2.3	*Real Time* PCR (PCR em Tempo Real)	43
6.2.4	*Random Amplified Polymorphic* DNA (RAPD)	44
6.2.5	Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)	44
6.2.6	Microssatélites	45
6.3	MÉTODOS IMUNOLÓGICOS	45
7	**DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E DA INFECTIVIDADE**	**46**
8	**EPIDEMIOLOGIA E PREVENÇÃO**	**47**
9	**TRATAMENTO CONVENCIONAL DA ÁGUA**	**54**
10	**REFERÊNCIAS**	**57**

CAPÍTULO II –AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) E DA NESTED-PCR (nPCR) PARA A DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp PRESENTES EM ÁGUA..... 71

RESUMO..... 72

ABSTRACT..... 73

1 INTRODUÇÃO..... 74

2 MATERIAL E MÉTODOS..... 75

2.1 AMOSTRAS DE PARASITOS..... 75

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA..... 75

2.2.1 Método Clássico Segundo SAMBROOK *et al.* (1989)..... 75

2.2.2 Protocolo Descrito por WEISS (1993) Modificado..... 76

2.2.3 Protocolo de MILLER *et al.* (1988), com Modificações..... 76

2.2.4 Kit Comercial: ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit..... 76

2.3 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) E NESTED PCR (nPCR)..... 77

2.3.1 *Primers* XIAF/ XIAR..... 77

2.3.2 *Primers* AWA995F/ AWA1206R..... 77

2.3.3 *Primers* CRY15F/CRY9R..... 77

2.3.4 *Primers* LAX469F/LAX869R..... 78

2.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE..... 78

3 RESULTADOS..... 79

4 DISCUSSÃO..... 83

5 CONCLUSÃO..... 86

6 REFERÊNCIAS..... 87

CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*Cryptosporidium* E PADRONIZAÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA DETECÇÃO DE OOCISTOS EM ÁGUA..... 90

RESUMO..... 91

ABSTRACT..... 92

1 INTRODUÇÃO..... 93

2 MATERIAL E MÉTODOS..... 94

2.1 PREPARO DO EXTRATO ANTIGÊNICO..... 94

2.2 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS..... 94

2.3 OBTENÇÃO DO SORO HIPERIMUNE..... 95

2.4 TITULAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS..... 95

2.5 CONJUGAÇÃO DOS ANTICORPOS COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA..... 96

2.5.1 Extração de Glicoproteínas..... 96

2.5.2 Precipitação das Imunoglobulinas com Sulfato de Amônio Saturado..... 97

2.5.3 Diálise..... 97

2.5.4 Conjugação do Anticorpo Policlonal com FITC e Preparo do Conjugado para Testes de Imunofluorescência Direta..... 97

2.6 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)..... 99

3 RESULTADOS..... 101

3.1 CONCENTRAÇÃO PROTEICA DO EXTRATO ANTIGÊNICO E IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS..... 101

3.2 TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS..... 101

3.3 CONJUGAÇÃO DOS ANTICORPOS COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA (FITC) E REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)..... 102

4 DISCUSSÃO..... 104

5 CONCLUSOES..... 106

6 REFERÊNCIAS..... 107

CAPÍTULO IV - MÉTODOS CONVENCIONAIS DE TRATAMENTO DA ÁGUA: EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. AVALIADA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), NESTED-PCR (nPCR) E POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)..... 109

RESUMO..... 110

ABSTRACT..... 111

1 INTRODUÇÃO..... 112

2 MATERIAL E MÉTODOS..... 114

2.1 AMOSTRA DE PARASITOS..... 114

2.2 ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO..... 114

2.3 FILTRAÇÃO DA ÁGUA EM COLUNA DE AREIA..... 118

2.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Cryptosporidium* NO MATERIAL DECANTADO..... 118

2.5 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Cryptosporidium* NO MATERIAL FLOCULADO..... 119

2.6 EXTRAÇÃO DE DNA DE *CRYPTOSPORIDIUM* UTILIZANDO O KIT COMERCIAL: *CHARGESWITCH® GDNA MINI TISSUE KIT*..... 119

2.7 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) E nPCR 119

2.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE..... 119

2.9 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)..... 120

3 RESULTADOS..... 121

3.1 ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO/ FILTRAÇÃO..... 121

3.2 DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* NAS DIFERENTES ETAPAS DO TRATAMENTO DA ÁGUA..... 123

4 DISCUSSÃO..... 127

5 CONCLUSÃO..... 130

6 REFERÊNCIAS..... 131

CAPÍTULO V – PESQUISA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* EM ÁGUA BRUTA PROVENIENTE DE QUATRO ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DA ÁGUA DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ..... 133

RESUMO..... 134

ABSTRACT..... 135

1 INTRODUÇÃO..... 136

2 MATERIAL E MÉTODOS..... 138

2.1 LOCAIS DAS COLETAS DE ÁGUA E LODO DE ÁGUA..... 138

2.2 COLETAS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS..... 139

2.2.1 Coleta das Amostras..... 139

2.2.2 Ensaios de Coagulação/Floculação/Sedimentação..... 140

2.2.3 Método de Yanko (1992)..... 142

3 RESULTADOS..... 143

3.1 CONCENTRAÇÃO DA ÁGUA BRUTA..... 143

3.2 PESQUISA DE *Cryptosporidium* NO MATERIAL FLOCULADO..... 144

3.3 PESQUISA DE *Cryptosporidium* NO MATERIAL RETIDO NA MEMBRANA DE CELULOSE APÓS FILTRAÇÃO..... 144

3.4 PESQUISA DE *Cryptosporidium* NO LODO DE ÁGUA..... 144

3.5 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) E nPCR..... 144

3.6 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)..... 145

4 DISCUSSÃO..... 146

5 CONCLUSÃO..... 149

6 REFERÊNCIAS..... 150

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 154

PERSPECTIVAS..... 157

ANEXOS..... 158

1. INTRODUÇÃO

Cryptosporidium spp. são parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa que habitam as microvilosidades do epitélio gastrintestinal de mamíferos e aves. Inicialmente conhecido como patógeno de animais jovens (bezerros, cordeiros e leitões), hoje se encontra na lista das doenças negligenciadas como importante agente causador de enterocolite, diarreia e colangiopatia em humanos (XIAO *et al*., 2004).

Várias espécies do protozoário parasitam o homem, animais domésticos e animais silvestres (SAVIOLI et al., 2006; FAYER, 2009). Algumas são espécie-específica dos seres humanos e outras apresentam potencial zoonótico, ou seja, podem infectar uma grande gama de hospedeiros, incluindo o homem. Vinte e uma espécies são conhecidas e destas, sete foram encontradas parasitando o homem (*C. hominis, C. parvum, C. meleagridis, C. felis, C. canis, C. suis* e *C. muris*) e duas não nominadas (genótipos cervídeo e macaco) infectam humanos imunocompetentes e imunocomprometidos, mas *C. hominis* e *C. parvum* (SMITH *et al*., 2006) e *C. meleagridis* (CONNELLY *et al*., 2008) são os mais comumente encontrados.

A duração da infecção e a patogenia da criptosporidiose dependem do estado imune do hospedeiro, variando de uma grave, mas autolimitante diarreia em indivíduos imunocompetentes, a uma diarreia crônica e prolongada em pacientes imunocomprometidos, que dependendo da gravidade do quadro clínico pode resultar em óbito (ABRAHAMSEN *et al*., 2004).

Os oocistos de *Cryptosporidium* são resistentes às adversidades encontradas no meio ambiente, podendo contaminar a água, solo e alimentos. Duas rotas de transmissão oro-fecal incluem contato direto com pessoas infectadas (transmissão antroponótica) ou animais (transmissão zoonótica), e consumo de água ou alimentos contaminados, sendo estas consideradas as principais vias de transmissão do *Cryptosporidium* em áreas endêmicas (XIAO *et al*., 2004). Os animais infectados servem de fonte de infecção para os humanos pela liberação de oocistos que são resistentes na água (DURANTI *et al*., 2008).

Vários surtos da doença vem sendo atribuídos ao consumo de água contaminada, seja ela bruta ou tratada. Um dos problemas para controlar a infecção é a escassez de dados sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* em águas superficiais

destinadas ao consumo público, levando a uma subestimação de casos de criptosporidiose e muitas vezes a associação de surtos seguidos de óbito com outros patógenos, particularmente o agente etiológico da cólera e de algumas viroses.

Diferentes métodos de diagnóstico tem sido desenvolvidos para a detecção de *Cryptosporidium* em amostras de água, cada qual com suas vantagens e desvantagens, porém, ainda não há um método universalmente aceito (CARVALHO, 2009).

A sensibilidade dos métodos para a detecção do agente, quando são utilizadas técnicas moleculares, pode variar de um a 10 oocistos, uma vez que vários fatores podem interferir, tais como: natureza da amostra, número de oocistos na amostra, método e substância utilizada para a concentração de oocistos na amostra, integridade do oocisto durante a análise e/ou presença de fatores inibidores de reação (LIMA *et al*., 2001). Essa variação na detecção pode levar a uma subestimação de dados de ocorrência do parasito de acordo com a metodologia usada. Apesar disso, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) possui vantagens sobre outros métodos não moleculares como rapidez, sensibilidade e especificidade (KAUCNER e STINEAR, 1998).

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* em águas superficiais tem sido associada ao grau de turbidez e à presença de coliformes fecais, parâmetros avaliados rotineiramente para a mensuração da qualidade da água. No entanto, não é sempre que há correlação positiva entre esses parâmetros e a ocorrência de *Cryptosporidium* (LeCHEVALLIER *et al*., 1991).

A escolha de um método a ser empregado em análise de rotina depende de alguns fatores, dentre eles o custo-benefício associado às recomendações previstas em normas oficiais para o padrão de ausência de *Cryptosporidium* spp.

No Brasil, apesar de não existir uma legislação que obrigue a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* na água, a portaria 518 recomenda, entre outros, a inclusão de pesquisa de agentes causadores de doenças, como *Giardia* e *Cryptosporidium* para atingir o padrão de potabildade da água (BRASIL, 2004). Porém, se a portaria 518 na sua revisão obrigar as companhias de Saneamento a monitorar *Cryptosporidium* haverá um aumento no custo de produção da água potável, pois os insumos para a execução das metodologias são importados e extremamente caros. Dessa forma é necessário que se desenvolvam técnicas

economicamente viáveis para a realidade do país visando à detecção de *Cryptosporidium* em água.

OBJETIVO GERAL:

- ✓ Produzir insumos e desenvolver técnicas para serem utilizadas na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água, avaliar a eficiência da remoção de oocistos e pesquisar a presença desse parasito na água utilizada para o abastecimento público da Região Metropolitana de Curitiba, Paraná.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Padronizar a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e nested PCR para detecção de DNA de *Cryptosporidium* em água;

- ✓ Produzir anticorpos policlonais anti-*Cryptosporidium* para a realização da imunofluorescência direta (IFD) de amostras de água;

- ✓ Realizar ensaios de coagulação, floculação, sedimentação e filtração em colunas de areia, em escala laboratorial, para verificar a eficiência do método convencional de tratamento da água na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp.;

- ✓ Pesquisar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* na água utilizada para o abastecimento público na Região Metropolitana de Curitiba.

Para melhor compreensão das etapas realizadas e atingir os objetivos propostos, o presente trabalho será apresentado na forma de capítulos:

- CAPÍTULO I: Revisão de Literatura

- CAPÍTULO II: Avaliação de diferentes métodos de extração de DNA e padronização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e da nested-PCR (nPCR) para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp presentes em água.

- CAPÍTULO III: Produção de anticorpos policlonais anti-*Cryptosporidium* e padronização da imunofluorescência direta para detecção de oocistos em água.

- CAPÍTULO IV: Métodos convencionais de tratamento da água: eficiência da remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp avaliada por reação em cadeia pela polimerase (PCR), nested-PCR (nPCR) e por imunofluorescência direta (IFD).

- CAPÍTULO V: Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em água bruta proveniente de quatro estações de tratamento da água da região metropolitana de Curitiba, Paraná.

2. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, M.S.; TEMPLETON, T.J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J.E.; ZHU, G. *et al*. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum.* **Science,** v. 304, p. 441-445, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 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**, 141(59), p. 266.

CARVALHO, T.T.R. Estado atual do conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. **Revista de Patologia Tropical,** v. 38 (1), p. 1-16, 2009.

CONNELLY, J.T.; NUGEN, S.R.; BOREJSZA-WYSOCKI, W.; DURST, R.A.; MONTAGUA, R.A; BAEUMNER, A.J. Human pathogenic *Cryptosporidium* species bioanalytical detection method with single oocyst detection capability. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 391, p. 487-495, 2008.

DURANTI, A.; CACCIÒ, S.M.; POZIO, E.; EGIDIO, A.D.; DE CURTIS, M.; BATTISTI, A.; SCARAMOZZINO, P. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in cattle. **Zoonoses and Public Health,** v. 56 (4), p. 176-182, 2008.

FAYER R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology,** 2009. doi:10.1016/j.exppara.2009.03.005

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

LeCHEVALLIER,M.W.; NORTON, W.D.; Lee, R.G. Ocurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 57 (9), p. 2610-2616, 1991.

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

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

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**, v. 22, p. 161-167, 2006.

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

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

1. ASPECTOS HISTÓRICOS E TAXONOMIA DO *Cryptosporidium* spp.

No ano de 1907 o parasitologista americano, Ernest Edward Tyzzer, descreveu pela primeira vez um protozoário que encontrou em glândulas gástricas de camundongos. Três anos mais tarde, nominou-o como novo gênero e espécie: *Cryptosporidium muris* (TYZZER, 1910 apud DUBEY et al., 1990). Em 1912, esse mesmo pesquisador descreveu nova espécie, *Cryptosporidium parvum*, encontrado no intestino delgado de camundongos.

Até 1955 o *Cryptosporidium* não despertara interesse dos cientistas quando uma nova espécie, *C. meleagridis* foi descrita e associada a infecções que causavam a morte em perus. Maior interesse veterinário surgiu em 1971 quando o *Cryptosporidium* foi associado à diarreia bovina (ALMEIDA, 2004).

Os primeiros registros de criptosporidiose em humanos foram descritos em 1976 nos Estados Unidos da América quando NIME *et al*. relataram a ocorrência da doença em uma criança imunocompetente com três anos de idade e MEISEL *et al.* descreveram um paciente submetido à terapia imunossupressora que apresentava um quadro de criptosporidiose. A partir da década de 1980, com o surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida os casos de criptosporidiose em humanos aumentaram significativamente e o *Cryptosporidium* mostrou-se como um importante patógeno oportunista. Porém esse agente é importante também para pessoas imunocompetentes, já que o número de surtos envolvendo esses indivíduos tem se tornado cada vez mais frequente (NASCIMENTO *et al*, 2009).

O primeiro relato sobre surto de criptosporidiose em humanos devido ao abastecimento de água ocorreu em San Antonio, no Texas, em 1984, concomitantemente a um surto de vírus Norwalk (D´ANTONIO *et al*., 1985). Porém, o maior deles ocorreu em Milwaukee, em 1993, EUA, com mais de 400 mil casos, demonstrando a importância desse protozoário veiculado pela água (MACKENZIE *et al*., 1994).

Após os surtos de criptosporidiose ocorridos no Texas (1985) e na Geórgia (1987), a Agência Norte Americana de Proteção Ambiental - USEPA (United States Environmental Protection Agency) inclui a pesquisa de *Cryptosporidium* na lista de

prioridade para avaliação da água potável (HACHICH, 2002). Em 1994 a criptosporidiose tornou-se doença de notificação compulsória no Canadá (ISSAC-RENTON, 1999). Mais tarde isso também aconteceu nos países da União Europeia (SEMENZA e NICHOLS, 2007).

No Brasil, o Ministério da Saúde publicou a Portaria n° 518, em 25 de março de 2004 que recomenda a inclusão de pesquisa de organismos patogênicos em águas de consumo humano, visando o padrão de ausência, dentre outros, de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

O *Cryptosporidium* spp. é classificado como organismo Protista, pertencente ao FILO Apicomplexa, CLASSE Esporozoasida, SUBCLASSE Coccidiasina, ORDEM Eucoccidiorida, SUBORDEM Eimeriorina, FAMÍLIA Cryptosporiidae, GÊNERO *Cryptosporidium* (LEVINE, 1984). Os membros pertencentes ao filo Apicomplexa possuem um aparato apical secretor relacionado com a invasão tecidual e seu ciclo resulta na formação de oocistos que são eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados (ABRAHAMSEN *et al.,* 2004).

O recente uso de métodos moleculares na caracterização do *Cryptosporidium* tem auxiliado na padronização da taxonomia desse gênero. Esses métodos, utilizados conjuntamente com estudos morfológicos, biológicos ou de especificidade de hospedeiros resultaram na validação de muitas espécies descritas (XIAO e CAMA, 2006). Atualmente o gênero *Cryptosporidium* tem 21 espécies e aproximadamente 40 genótipos. Numerosos vertebrados tais como mamíferos, aves, répteis, peixes e anfíbios são hospedeiros (XIAO e FAYER, 2008; FAYER, 2009; FAYER e SANTÍN, 2009) (Tabela 1).

TABELA 01 - ESPÉCIES DE *Cryptosporidium* E PRINCIPAIS HOSPEDEIROS

ESPÉCIES DE *Cryptosporidium*	PRINCIPAIS HOSPEDEIROS
Cryptosporidium andersoni	Bovinos, camelos (LINDSAY *et al*., 2000)
Cryptosporidium baileyi	Aves (CURRENT *et al*., 1986)
Cryptosporidium bovis	Bovinos (FAYER *et al*., 2005)
Cryptosporidium canis	Cães (FAYER *et al*., 2001)
Cryptosporidium fayeri	Canguru vermelho (RYAN *et al*., 2008)
Cryptosporidium fragile	Anfíbios (JIRKU *et al*., 2008)
Cryptosporidium felis	Gatos (ISEKI, 1979)
Cryptosporidium galli	Aves (PAVLASEK, 1999)
Cryptosporidium hominis	Humanos, macacos (MORGAN-RYAN *et al*., 2002)
Cryptosporidium macropodum	Canguru cinza (POWER e RYAN, 2008)
Cryptosporidium meleagridis	Perus, humanos (SLAVIN, 1955)
Cryptosporidium molnari	Peixes (ALVAREZ-PELLITERO e SITJÀ-BOBADILLA, 2002)
Cryptosporidium muris	Roedores (TYZZER, 1910)
Cryptosporidium parvum	Bovinos, outros ruminantes, humanos (TYZZER, 1912)
Cryptosporidium ryanae	Bovinos (FAYER *et al*., 2008)
Cryptosporidium scophthalmi	Peixes (ALVAREZ-PELLITERO *et al*., 2004)
Cryptosporidium serpentis	Serpentes (LEVINE, 1980) (BROWNSTEIN *et al*., 1977)
Cryptosporidium suis	Suínos (RYAN *et al.*,2004)
Cryptosporidium varanii	Lagarto monitor (PAVLASEK *et al*., 1995)
Cryptosporidium xiaoi	Ovinos (FAYER e SANTÍN, 2009)
Cryptosporidium wrairi	Porquinho da Índia (VETTERLING *et al*., 1971)

FONTE: FAYER (2009); FAYER e SANTÍN (2009)

2. CICLO DE VIDA E TRANSMISSÃO

Cryptosporidium são protozoários intracelulares e extracitoplasmáticos obrigatórios, com ciclo biológico complexo que culmina com a formação de oocistos que são eliminados juntamente com as fezes (FAYER *et al*., 2000). Ao contrário da maioria dos coccídios, os oocistos de *Cryptosporidium* são eliminados no meio ambiente já infectantes (esporulados). Sua infectividade está relacionada à resistência no meio ambiente (KHAN, 2008), à longa sobrevivência em meios aquáticos (MEDEMA & SCHIJVEN, 2001) e à resistência às concentrações usualmente utilizadas de cloro. Entretanto, são sensíveis à dessecação (duas horas ou mais), ao congelamento (KHAN, 2008) e às altas temperaturas: 55ºC/30 segundos ou 60ºC/15 segundos ou 70ºC/5 segundos (FUJINO *et al*, 2002).

Quando os oocistos de *Cryptosporidium* são introduzidos em um curso d´água através da contaminação fecal oriunda de humanos ou animais, estes podem sedimentar e permanecer neste ambiente por longos períodos sendo suspensos somente após chuvas fortes. A manutenção de oocistos em temperaturas mais amenas pode preservar a infectividade, porém a influência ambiental e o tempo em que os oocistos permanecem no ambiente podem influenciar na susceptibilidade destes aos processos de tratamento de água (KEEGAN *et al.,* 2008).

A disseminação de oocistos de *Cryptosporidium* é particularmente facilitada pelas características do protozoário, como sua capacidade de resistência ao cloro, sobrevivência longa, especialmente em ambientes aquáticos, tamanho reduzido, baixa dose infectante, natureza esporulada infecciosa logo após eliminação (DILLINGHAM *et al.,* 2002).

Este parasito é transmitido pela via fecal-oral e a infecção pode ser adquirida por diversas vias como: água contaminada (a via mais relatada nos surtos); contato com fezes de animais, particularmente cordeiros e bezerros; contato com pessoas (antroponótico), especialmente em crianças (creches, escolas); ingestão de alimentos crus contaminados (KHAN, 2008).

O ciclo de vida desse parasito é similar ao de outros coccídios (Figura 1).

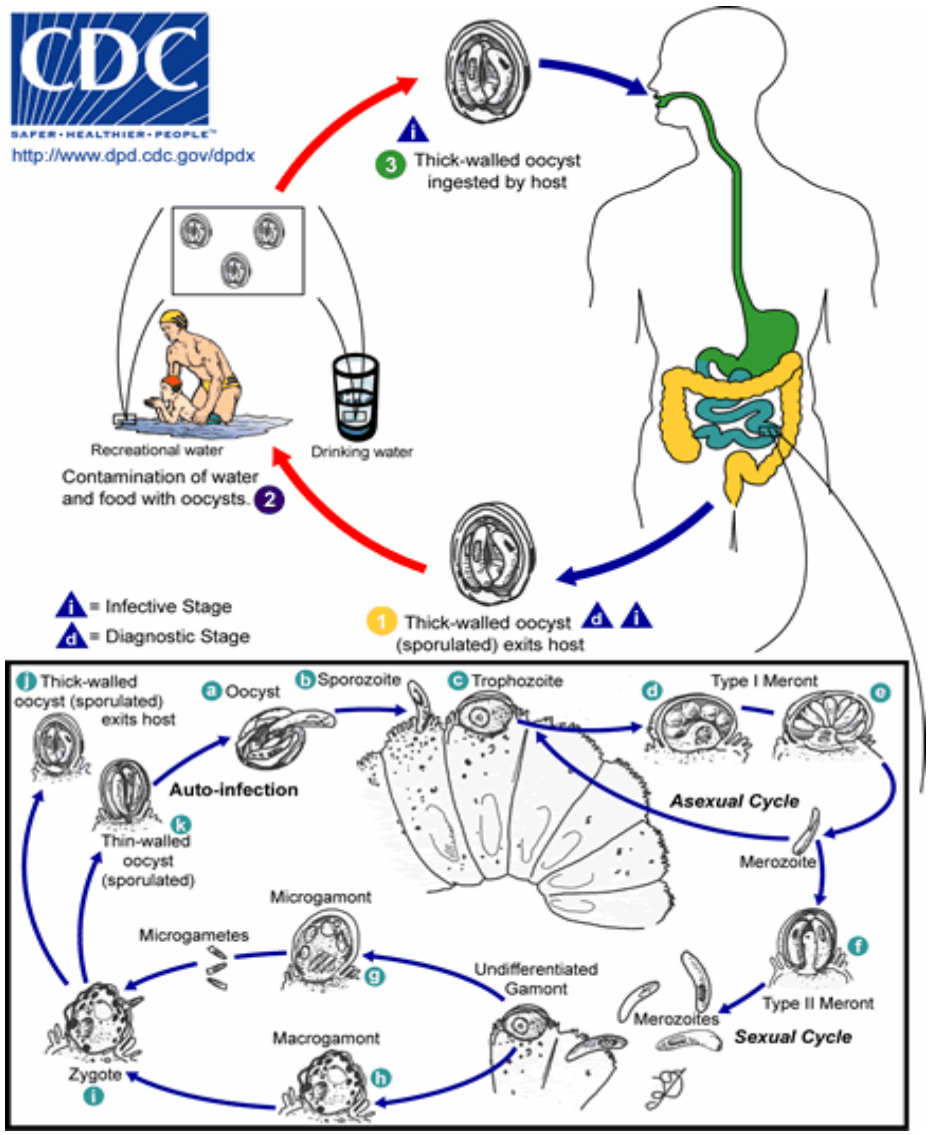

FIGURA 01- MECANISMO DE TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA DO *Cryptosporidium hominis* E *C. parvum.* Após a liberação do esporozoíto (a) que ocorre no lúmen do intestino, estes penetram (b) nas células hospedeiras e se desenvolvem em trofozoítos (merontes uninucleares) (c) formando um vacúolo parasitóforo nas microvilosidades do epitélio intestinal. Em seguida se inicia a merogonia (divisão assexuada) (d, e) para formar os merozoítos. Após o surgimento dos merontes tipo I, os merozoítos invadem células adjacentes para formar merontes tipo I adicionais (reciclagem de merontes tipo I) ou para formar merontes tipo II (f). Merontes tipo II não se reciclam, mas entram nas células para formar os estágios sexuados, micro (g) e macrogametas (h). Aproximadamente 80% dos zigotos (i) formados após a fertilização darão origem a oocistos com parede espessa (j) que sofrem esporogonia, ou seja, os oocistos esporulados (k) contendo quatro esporozoítos. Oocistos esporulados liberados nas fezes são a forma de resistência ao meio ambiente e a forma responsável pela transmissão da doença para outros hospedeiros. Cerca de 20% dos oocistos não formam uma parede espessa, eles apenas possuem uma membrana delgada contendo os quatro esporozoítos e são os responsáveis pela autoinfecção (k). FONTE: www.cdc.gov.

Os mananciais podem ser contaminados por águas superficiais ou por efluentes de esgoto contendo oocistos e que não foram tratados adequadamente. Outra importante via de transmissão, também relacionada com a água, são as águas

de recreação, que podem ser contaminadas por crianças ou indivíduos com incontinência fecal ou com diarreia (FAYER *et al.,* 2000).

O aumento da demanda de alimentos no mundo, associado à globalização e necessidade de transportes rápidos aumenta a possibilidade de contaminação de alimentos com oocistos de *Cryptosporidium* e sua sobrevivência. A baixa dose infectante, a falta de higienização e tratamento térmico dos alimentos permitem a ingestão de parasitos viáveis e seu desenvolvimento no interior do organismo de animais e humanos. Aproximadamente 10% dos casos de criptosporidiose nos EUA são decorrentes da ingestão de alimentos contaminados. A contaminação de frutas, vegetais e frutos do mar com oocistos de *Cryptosporidium* é extremamente importante uma vez que estes alimentos são consumidos crus (SMITH *et al.*, 2006). ROBERTSON e GJERDE (2001a) avaliaram a presença de oocistos em verduras e encontraram 19 positivas das 475 amostras (4%) analisadas, sendo a maior parte encontrada em broto de feijão (74%) e alface (26%).

As ostras, assim como outros moluscos, possuem a capacidade de acumular contaminantes de água, portanto, a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nestes alimentos é uma importante questão de Saúde Pública (TAMBURRINI e POZIO, 1999; DOWNEY e GRACZYK, 2007).

SMITH *et al*. (2009) realizaram um estudo de caso controle para verificar a capacidade dos animais de estimação servirem de fonte de infecção para a criptosporidiose humana. As fezes dos animais de estimação dos pacientes diagnosticados com criptosporidiose e dos controles (indivíduos negativos para a doença) foram analisadas para presença de oocistos de *Cryptosporidium.* No entanto, não verificaram diferença significativa entre os grupos, ou seja, observaram que 21,1% dos animais pertencentes aos pacientes e 19,3% dos animais pertencentes aos controles apresentaram oocistos nas suas fezes. Porém, a presença de espécies de *Cryptosporidium* potencialmente zoonóticas (*C. parvum*) nesses animais sugerem a sua importância na transmissão.

3. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS DA CRIPTOSPORIDIOSE

A patogenia causada por *Cryptosporidium* resulta da invasão e destruição dos enterócitos pelos parasitos, levando à atrofia das vilosidades em graus variados, hiperplasia das células da cripta intestinal, infiltração de células inflamatórias na lâmina própria e diminuição das microvilosidades (CLARK e SEARS, 1996).

A criptosporidiose normalmente é uma doença de remissão espontânea em adultos sadios, mas, extremamente grave, em grupos mais vulneráveis, como crianças, idosos e imunodeprimidos, ou seja, pacientes submetidos a transplantes, sob tratamento para certos tipos de câncer e principalmente aqueles portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), com o agravante de não se conhecer tratamento efetivo (HACHICH *et al*., 2000).

O sintoma mais comum da doença, tanto em indivíduos imunocompetentes como em imunocomprometidos, é a diarreia aquosa e abundante, com coloração esverdeada ou incolor, sem muco ou sangue, frequentemente associado à diminuição do peso corporal. Outros sintomas que podem ocorrer são cólicas abdominais, náusea, vômitos, dor de cabeça, febre baixa, dores musculares, indisposição, fraqueza, fadiga, anorexia, perda de peso e uma variedade de problemas respiratórios (CURRENT e GARCIA*,* 1991).

Os animais domésticos geralmente se infectam entre a primeira e quarta semanas de vida e a duração da infecção é pequena, ao redor de duas semanas e os sinais clínicos predominantes tanto nos animais de estimação quanto nos animais de produção é uma diarreia profusa, que pode levar à morte (OLSON *et al.,*2004).

4. TRATAMENTO DA CRIPTOSPORIDIOSE

Nos últimos 25 anos, desde que a criptosporidiose foi reconhecida como uma importante doença, especialmente em indivíduos com HIV/SIDA ou com outras imunodeficiências, poucos progressos foram conseguidos no desenvolvimento de tratamentos efetivos (TZIPORI e WIDMER, 2008).

A maioria das pessoas imunocompetentes se recupera sem a necessidade de se implantar um tratamento. Terapia de suporte como ingestão de líquidos para prevenir a desidratação deve ser feita assim que os sintomas iniciarem. A nitazoxanida tem sido indicada para o tratamento da diarreia causada pelo *Cryptosporidium* em pessoas imunocompetentes com idade igual ou superior a um ano. Esta droga não está indicada, até o momento, para pacientes imunodeficientes porque não demonstrou maior eficiência quando comparada ao placebo (CDC, 2009)

Em pacientes com HIV/SIDA, os sintomas são mais graves e a resposta ao tratamento é menos eficiente devido à falha na resposta imune. A ocorrência de doenças oporunistas nesses pacientes, especialmente a criptosporidiose, está normalmente relacionada a uma diminuição da imunidade celular. GAUTAM *et al.* (2009) avaliaram a correlação dos níveis de CD4 e número de partículas virais em pacientes com HIV/SIDA e a ocorrência de doenças oportunistas. *Cryptosporidium* foi encontrado em 17,4% dos pacientes e foi encontrado um OR (*odds ratio)* de 1,8 em pacientes com níveis de CD4 < 100/mm^3.

As terapias que utilizam medicamentos antirretrovirais tem sido utilizadas com sucesso. BRADY *et al.* (2010) acompanharam 3553 crianças com HIV/SIDA durante cinco anos com o objetivo de avaliar os fatores de risco na morte desses pacientes e verificaram a influência dos antirretrovirais na diminuição dessas mortes, causadas especialmente por agentes oportunistas.

5. DIAGNÓSTICO DA CRIPTOSPORIDIOSE

5.1. MICROSCOPIA E ENSAIO IMUNOLÓGICO

O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose pode ser feito pela demonstração de oocistos nas fezes, após métodos de concentração baseados em princípios de flutuação ou centrífugo-sedimentação. Técnicas de concentração de oocistos presentes em fezes incluem flutuação destes em solução saturada de açúcar (Sheather) ou sulfato de zinco ou cloreto de sódio saturado, e sedimentação utilizando solução de éter-formalina e acetato-formalina (CURRENT e GARCIA, 1991). Originalmente descrito em 1981, o método de coloração ácido resistente continua sendo o método mais utilizado no diagnóstico da criptosporidiose na maioria dos laboratórios (FAHEY 2003), especialmente em países em desenvolvimento por ser de baixo custo, fácil execução, utilização de microscópio óptico comum e a possibilidade de detecção simultânea de outros protozoários como *Isospora* e *Cyclospora*. Duas técnicas e coloração especiais são mais utilizadas: Kinyoun e Ziehl-Neelsen (XIAO e CAMA, 2006). Os fatores limitantes dessas técnicas são o tamanho reduzido dos oocistos (4-8μm), que podem ser confundidos com matérias orgânicas coradas, demonstrando assim, a importância de um técnico treinado, além da eliminação dos oocistos serem intermitentes, podendo levar a um grande número de falso-negativos (FAHEY, 2003), demonstrando uma baixa sensibilidade.

Métodos imunológicos podem oferecer algumas vantagens sobre a microscopia óptica para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. A técnica de imunofluorescência direta (IFD), que utiliza anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína que reconhecem epitopos específicos presentes na superfície dos oocistos, tem sido bastante utilizada, uma vez que apresenta uma alta especificidade (96 a 100%) e sensibilidade (98,5 a 100%) na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. presentes nas fezes ou em amostras ambientais (JEX *et al.,* 2008). Comparada com a técnica de coloração ácido resistente, a IFD apresenta uma maior sensibilidade e especificidade (ARROWOOD e STERLING, 1989). Entretanto tem o mesmo inconveniente de depender do número de oocistos na amostra, levando a um grande número de falsos-negativos.

5.2. HISTOLOGIA

No início dos anos 1980 a criptosporidiose humana era diagnosticada histologicamente pela observação de organismos pequenos e esféricos que correspondiam aos estágios de desenvolvimento do *Cryptosporidium* encontrados nas microvilosidades da mucosa intestinal, obtidos por biópsia ou tecidos provenientes de necropsia. Esses tecidos eram corados pela hematoxilina e eosina e o parasito aparecia como um corpo basofílico pequeno e esférico (2 a 5µm dependendo do estágio do ciclo de vida) dentro das microvilosidades da mucosa intestinal. A localização desse parasito tem sido descrita como intracelular e extracitoplasmática: intracelular porque ele reside dentro de um vacúolo parasitóforo, sendo envolvido apenas pela membrana cioplasmática das células hospedeiras, extracitoplasmática porque está confinado na região das microvilosidades das células hospedeiras (CURRENT e GARCIA, 1991).

5.3. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Técnicas de sorodiagnóstico para monitorar a exposição ao *Cryptosporidium* spp. tem sido utilizadas em um número limitado de laboratórios. Anticorpos específicos tem sido detectados pela imunofluorescência indireta nos soros de pessoas que se recuperaram da doença para confirmar o agente causador. Imunoglobulinas M e G (IgG e IgM) anti-*Cryptosporidium* específicas podem ser detectadas pelo método imunoenzimático (ELISA) (CURRENT e GARCIA, 1991). Este método pode ter grande importância em estudos epidemiológicos (FAHEY, 2003), uma vez que a maioria dos casos é assintomática, e desta forma, esses casos poderiam ser identificados. Entretanto são pouco eficazes em diagnóstico da infecção patente, pois não distinguem infecções passadas e recentes.

6. DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Como a maioria dos agentes veiculados por água, o *Cryptosporidium* é difícil de ser detectado e enumerado com acurácia pelas técnicas empregadas na rotina. Este problema decorre, particularmente, das baixas concentrações das formas infectantes encontradas na água e pelos altos custos das técnicas utilizadas (LEMARCHAND e LEBARON, 2002).

Para melhorar o monitoramento de oocistos de *Cryptosporidium* em água, a United States Environmental Protection Agency (USEPA) desenvolveu os métodos 1622 (USEPA, 1997) e 1623 (USEPA, 1999) que consistem em filtração, concentração, separação imunomagnética (IMS), anticorpos fluorescentes, coloração com DAPI (4´,6-diamidino-2-fenilindol), e detecção e enumeração por meio da microscopia. O método 1622 é empregado na detecção e enumeração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, enquanto que o método 1623 também permite a detecção e enumeração de cistos de *Giardia*. Segundo esses métodos, a turbidez causada por partículas orgânicas e inorgânicas, pode interferir na concentração, separação e exame das amostras para oocistos de *Cryptosporidium.*

Nessas técnicas são utilizados anticorpos que não são espécie-específicos e, portanto, são incapazes de distinguir as espécies de *Cryptosporidium* que infectam animais de outras que não apresentam prejuízos à saúde. Como consequência, uma variedade da técnica de PCR tem sido desenvolvida para detectar *Cryptosporidium* em água (MONIS e SAINT, 2001; SOBA *et al*., 2006; SOLDAN, *et al*., 2006; TROTZ-WILLIAMS, 2006).

As técnicas de detecção de oocistos presentes na água são bastante trabalhosas e compreendem três estágios. No primeiro estágio é feita a concentração da amostra, a partir de um grande volume de água, uma vez que os oocistos de *Cryptosporidium* são frequentemente encontrados no ambiente em baixas concentrações. Em seguida ocorre a purificação, onde os oocistos são separados de outros debris e por fim, os oocistos são identificados (HSU *et al.*, 2000).

6.1. TÉCNICAS DE CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARA A DETECÇÃO DE OOCISTOS EM ÁGUA

O procedimento mais comum para a concentração de oocistos tem sido a filtração da amostra em filtros de polipropileno (JAKUBOWSKI *et al.,* 1996).

Os primeiros métodos para a concentração das amostras foram a filtração em cartucho e a filtração em membrana, que eram usadas para a recuperação de oocistos de amostras de água. Os oocistos eram então diferenciados de outros organismos como protozoários de vida livre, bactérias e algas por imunofluorescência direta (QUINTERO-BETANCOURT *et al.,* 2002).

As técnicas de flutuação e centrífugo-flutuação pela sacarose são métodos comumente utilizados para a detecção de *Cryptosporidium* uma vez que os oocistos, quando submersos em soluções contendo açúcar, apresentam uma mudança na coloração, tornando a sua detecção mais fácil. FUJINO *et al.* (2006) compararam essas duas técnicas para a detecção de amostras contendo baixas quantidades de oocistos (6,0 x 10^2 e 1,0 x 10^3/mL) e o primeiro método foi considerado mais sensível para a detecção de amostras com poucos oocistos.

A separação imunomagnética (IMS) é uma técnica de purificação que utiliza pérolas magnéticas adsorvidas com anticorpos capazes de capturar os oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* 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). Esse método é importante para retirar substâncias que induzem a exames falsos positivos, quando se utiliza para imunofluorescência direta ou, a uma inibição de amplificação no caso de PCR. BERINO (2004) analisando água de quatro rios de abastecimento público e utilizando a técnica de separação imunomagnética verificou que essa técnica apresenta melhores resultados em águas ambientais mais limpas, uma vez que nos dois rios onde foram detectadas as maiores quantidades de oocistos de *Cryptosporidium* foram os rios com menores cargas poluentes.

6.2. MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DO DNA DO PARASITO

Os métodos moleculares foram desenvolvidos para detecção do DNA do parasito, visando superar as dificuldades encontradas nos métodos microscópicos. Assim, esses métodos são importantes no monitoramento da contaminação ambiental, porque permitem identificar espécies presentes, uma vez que existem espécies com predileção de hospedeiros. Dessa maneira torna-se possível identificar a fonte da contaminação e promover um manejo adequado para evitar a entrada desses agentes nos cursos d´água, em especial, aqueles destinados ao consumo humano ou animal.

Além da detecção do parasito, essas metodologias também são aplicadas no estudo da sistemática e ecologia dos parasitos, em particular sua taxonomia, evolução biológica, genética de populações, estrutura de comunidades, epidemiologia e interação com seus hospedeiros (ALMEIDA, 2004).

Na sequência descreveremos resumidamente as técnicas moleculares mais utilizadas na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

6.2.1. Hibridização de Sondas de DNA

A sonda de DNA, que pode ser espécie-específica ou gênero-específica, reconhece e hibridiza com a sequência alvo e sua visualização é feita graças à marcação. As primeiras sondas eram marcadas com P^{32} e detectadas pela exposição em filmes de raios-X. Posteriormente as sondas passaram a ser marcadas com biotina e detectadas pela avidina ou estreptoavidina conjugadas às enzimas como fosfatase alcalina. As sondas também podem ser ligadas diretamente à enzima, sendo sua presença detectada com um substrato cromogênico, o qual a enzima converte em produtos corados insolúveis (SINGH, 1997).

Essa metodologia tem sido utilizada para demonstrar o parasito em tecido do trato gastrintestinal (RICHTER *et al.,* 2008a; RICHTER *et al.,* 2008b), em amostras de água, através da detecção em membranas filtrantes (TAGUCHI *et al.,* 2006) e determinação da viabilidade de oocistos presentes em fezes (LEMOS *et al.*, 2005).

6.2.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica que amplifica milhares de vezes uma sequência específica do DNA de interesse através da utilização de uma enzima, apresentando dessa forma, uma alta sensibilidade. Durante a PCR, um segmento específico de DNA de fita dupla ou de fita simples pode ser amplificado, através de sucessivos ciclos. Com a utilização da transcriptase reversa o ácido ribonucleico (RNA) também pode ser amplificado.

Uma variação da PCR é a PCR-multiplex, onde são utilizados dois ou mais pares de iniciadores, para identificação de espécies ou gêneros diferentes de organismos presentes em uma única amostra, realizando apenas uma única reação de PCR.

A nested-PCR (nPCR) é um método sensível de PCR no qual o produto amplificado (*amplicon)* é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a sequências internas do segmento já amplificado. Este procedimento torna a reação da PCR mais específica e sensível. Geralmente, na primeira PCR é utilizado um iniciador gênero-específico, e na segunda PCR um iniciador espécie-específico do parasito em estudo (ALMEIDA, 2004).

Diversos autores utilizaram essas ferramentas para a detecção de oocistos em fezes de humanos e animais (ONG, *et al.,* 2002; KESHAVARZ *et al.,* 2009; DOY, 2009); para a determinação das espécies encontradas em água ou esgoto (JIANG *et al.,* 2005a; JIANG *et al.,* 2005b; CAREY *et al.,* 2006; HASHIMOTO *et al.,* 2006; PILAI, 2009); para o reconhecimento de novas espécies, quando associadas ao sequenciamento (FAYER *et al.,* 2008; FAYER e SANTÍN, 2009); para a diferenciação das espécies e genótipos (SATOH e NAKAI, 2007)

6.2.3. *Real Time* PCR (PCR em tempo real)

O *Real-time* PCR apresenta uma grande vantagem em relação à simples PCR que é a capacidade de quantificação das cópias de DNA formadas. Ela é capaz de coletar os dados enquanto a PCR ocorre, dessa forma, a amplificação e a quantificação da amplificação são mensuradas simultaneamente. Isto é alcançado

usando uma variedade de diferentes substâncias químicas fluorescentes que correlaciona a concentração dos produtos da PCR e a intensidade de fluorescência. Existem muitos benefícios em usar *real-time* PCR quando comparado a outros métodos de quantificação da expressão gênica. Esse método pode produzir dados quantitativos com um alcance dinâmico na ordem de 7 a 8 log e não requer manipulação após a amplificação (WONG e MEDRANO, 2005).

Essa técnica pode ser utilizada para a quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras clínicas ou ambientais (HAQUE *et al.,* 2007; PARR *et al.,* 2007; TEM-HOVE *et al.,* 2007; MINAROVICOVÁ *et al.,* 2009; BRUIJNESTEIJN VAN COPPENRAET *et al.,* 2009; GARCÉS-SANCHEZ *et al.,* 2009).

6.2.4. *Random Amplified Polymorphic* DNA (RAPD)

A amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD) também conhecida como AP-PCR (*Arbitrarily Primed* PCR) tem sido bastante utilizada para o delineamento de cepas em estudos epidemiológicos (MORGAN *et al.*, 1995; MORGAN, *et al.,* 1996; DENG e CLIVER, 1998; SHIANNA *et al.,* 1998; MORGAN *et al.*, 1999a; MORGAN *et al.*, 1999b; ONG *et al*., 1999), porém para amostras ambientais não é indicada devido à grande quantidade de outros agentes presentes nessas amostras. Para se realizar essa técnica não é necessário conhecer a sequência de DNA, já que faz uso de amplificações randômicas do genoma. Os fragmentos são separados em gel de eletroforese e o padrão de bandas resultantes é usado como perfil genômico (*fingerprint*) para comparação das cepas (MONIS e ANDREWS, 1998).

6.2.5. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP)

A PCR-RFLP é um método utilizado para detectar mínimas variações num gene onde uma única substituição de base pode criar um sítio que pode ser digerido pela enzima de restrição endonuclease, ou abolir o sítio de restrição. Na PCR-RFLP, a PCR é usada para amplificar a região do gene de interesse e os produtos da amplificação (*amplicons*) são digeridos por enzimas e analisados em gel de agarose

ou de poliacrilamida por eletroforese. Essa técnica tem sido bastante utilizada para a detecção e diferenciação de espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* (XIAO *et al*, 1999; GUYOT *et al.,* 2002; ARAÚJO *et al.,* 2008; PIRESTANI *et al.,* 2008; QUÍLEZ *et al.,* 2008a; LUPO *et al.,* 2008; ZAVVAR *et al.,* 2008; LEONE *et al.,* 2009; WALDRON *et al.,* 2009; ZINTL *et al.,* 2009). A maioria dessas técnicas se baseiam no gene SSU rRNA e algumas utilizam o gene COWP (AMAR *et al.,* 2004)

6.2.6. Microssatélites

Muitas ferramentas tem sido desenvolvidas para caracterizar a diversidade dentro das espécies *C. parvum* ou *C. hominis.* Uma das técnicas mais comumente utilizada é a análise por microssatélites, bastante útil em detectar as variações entre indivíduos. Os *loci* hipervariáveis também são úteis como ferramentas de *fingerprint*, para fornecer marcadores para identificação de cepas. Os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*), de dois a quatro nucleotídeos de tamanho, estão dispersos através do genoma da maioria dos organismos, estando presentes em todos os organismos eucariotos. Embora a caracterização inicial de oito microssatélites tenha sido identificada, esses identificavam apenas a diversidade genética de *C. parvum* (CACCIÒ *et al.,* 2000; CACCIÒ *et al.,* 2001; LEONI *et al.,* 2007; MATTSSON et al., 2007) e *C. hominis* (GONÇALVES *et al.,* 2006), estudos mais recentes tem identificado muitas sequências de microssatélites que tem se apresentado com mais variações.

6.3. MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

A reação de imunofluorescência direta (IFD) com anticorpos monoclonais específicos para *Cryptosporidium* spp. é um método imunológico bastante utilizado, e é o princípio básico dos métodos 1622 e 1623 conforme descrito no item 6.

7. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E DA INFECTIVIDADE

A definição da viabilidade é a habilidade de um organismo se reproduzir, metabolizar enquanto que a infectividade é a capacidade de infectar o hospedeiro.

O método de desencistamento *in vitro* é uma boa alternativa para avaliar a viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Este método possibilita a diferenciação de oocistos desencistados e intactos, além de apresentar as vantagens de fácil reprodutibilidade, custo acessível e dispensa do manuseio de animais (PEREIRA *et al.,* 2008). Porém, para se determinar a infectividade é necessária a demonstração da infecção em animais suscetíveis como camundongos (CHEN *et al.,* 2007) ou *in vitro* pela inoculação em cultivo celular (SCHETS *et al.,* 2005).

A inclusão ou exclusão de corantes vitais tem sido usada como marcadores de membranas intactas dos oocistos de *Cryptosporidium* e como um indicador da presença de estruturas internas como o núcleo. Um corante fluorogênico bastante utilizado para esta finalidade é o 4´,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (QUINTERO-BETANCOURT *et al*., 2002).

A viabilidade pode também ser determinada utilizando a técnica molecular de RT-PCR, que se baseia na amplificação do mRNA. Este método envolve etapas como o isolamento do RNA dos oocistos, purificação do RNA, transcrição reversa para formar o DNA complementar, amplificação e visualização do produto amplificado (QUINTERO-BETANCOURT *et al.*, 2002).

CONNELLY *et al*. (2008) avaliaram a viabilidade de oocistos de *C. parvum, C. hominis* e *C. meleagridis*, presentes em água, através da extração de mRNA seguido de hibridização. Essa técnica foi capaz de identificar apenas um oocisto em 10mL de amostra, além de ser realizada em um período de tempo curto, de apenas 4,5h.

CHEN *et al*. (2007) compararam a viabilidade e a infectividade de oocistos de *C. parvum* conservados em solução de dicromato de potássio a 2,5% e em água a 4°C. A viabilidade foi realizada *in vitro* pela diferenciação de oocistos desencistados e intactos enquanto que a infectividade foi avaliada pela inoculação em camundongos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos e oocistos viáveis e infectantes foram observados até 13 e 16 meses de armazenamento em dicromato de potássio e água respectivamente.

8. EPIDEMIOLOGIA E PREVENÇÃO

A contaminação dos recursos hídricos proveniente dos resíduos agropecuários, industriais e domésticos por este coccídio vem despertando atenção em diversos países (LeCHEVALLIER *et al.,* 1991). Vários surtos causados pelo *Cryptosporidium parvum* com envolvimento hídrico tem sido relatados em pessoas imunocompetentes em várias partes do mundo (TABELAS 02, 03 e 04).

LEMARCHAND e LEBARON (2002) analisaram esgoto não tratado e tratado de nove estações de tratamento, na França, encontrando uma positividade de 78% e 52% respectivamente. Na Itália, pesquisas demonstram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em águas superficiais podendo chegar até 100% de detecção em amostras testadas (CARRARO *et al.,* 2000; BRIANCESCO e BONADONNA, 2005; DI BENEDETTO *et al.,* 2005 *apud* GIANGASPERO *et al.,* 2007). Trabalho realizado na Espanha por CASTRO-HERMIDA *et al.* (2008) avaliou o esgoto bruto e tratado de 12 estações de tratamento de esgoto na região de Galícia, noroeste do país, região conhecida pela grande quantidade de áreas recreacionais e praias fluviais, sendo que todo o esgoto tratado é jogado nesses rios. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram encontrados em todas as amostras testadas, mesmo após tratamento, demonstrando um risco alto para as pessoas que frequentam esses rios. A água bruta da Noruega foi avaliada através da coleta de 147 pontos diferentes, num total de 408 amostras. Dessas, 55 (13,5%) foram positivas para *Cryptosporidium* (ROBERTSON e GJERDE, 2001b). Um estudo feito para avaliar a contaminação de rios utilizados para abastecimento público na região de Paris demonstrou uma positividade de 93,8% das amostras analisadas (MONS *et al.*, 2009).

No Irã, trabalho realizado com 272 amostras de fezes de bovinos demonstrou positividade 18,8% utilizando a técnica de PCR. Do total, 72,6% era *C. parvum*, 17,7% *C. andersoni, 7,8%, C. bovis e 1,9%* era um novo genótipo do *C. parvum* (KESHAVARZ *et al.,* 2008). Trabalho semelhante foi realizado por QUILEZ *et al.* (2008b) na Espanha que encontraram 76,8% das fazendas e 57,8% dos bovinos positivos, e do total de amostras positivas sequenciadas, 98% eram *C. parvum* e 2% *C. bovis*.

KVÁC *et al.* (2008) realizaram uma pesquisa em suínos na República Tcheca. De um total de 413 amostras fecais, 21,1% foram positivas, sendo 63,8% *C. suis*, 33,3% *Cryptosporidium* suíno genótipo II e 2,9% *C. muris*.

No Brasil, o cenário atual é caracterizado pela progressiva contaminação das águas superficiais e subterrâneas devido à deficiente infraestrutura do sistema de esgotamento sanitário. De acordo com o Ministério das Cidades, o índice de atendimento total de água no Brasil varia de 49,9% na região Norte a 88,0% no Sudeste. O estado do Paraná conta com 89,4% da população atendida com água tratada. Já o índice de atendimento total de esgoto beneficia uma população bem menor, contribuindo para a contaminação de rios, lençóis freáticos e o mar. Esse serviço atinge apenas 3,7% na região Norte e a região Sudeste, que dispõe de uma maior rede de esgoto, é de 55,9%. No Paraná o sistema de rede de esgoto atinge menos da metade da população (46,4%). Porém, desse total de esgoto canalizado, o Paraná consegue tratar 95,9% (BRASIL, 2007).

Apesar de escassos, vários trabalhos foram realizados no Brasil com o objetivo de demonstrar a contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* spp., em águas superficiais bruta ou tratada (HACHICH *et al.,* 2000; FRANCO *et al.*, 2001; HELLER *et al.,* 2004; NISHI *et al.,* 2009) água mineral (FRANCO e CARTUSIO-NETO, 2002), em poços artesianos (GAMBA *et al.,* 2000; BRANCO, 2006), esgotos tratados ou não (FARIAS *et al.*, 2002; HELLER *et al.,* 2004*;* IACOVSKI *et al.,* 2004), águas marinhas e estuarinas (BORGES *et al.,* 2007b).

Trabalho realizado por HACHICH *et al.* (2000) no Estado de São Paulo avaliou água bruta utilizada para o abastecimento público e demonstraram que 31,5% das amostras apresentavam oocistos de *Cryptosporidium*, correspondendo a 29% dos mananciais pesquisados. Apesar de a água subterrânea ser passível de contaminação, em menor extensão que a água superficial, BRANCO (2006) encontrou 25% de positividade das fontes pesquisadas em Campos do Jordão. BORGES *et al.* (2007b) fizeram o primeiro relato da presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas marinhas costeiras no Brasil, utilizadas para a criação de peixes-boi marinhos. Além da preocupação com esses animais e seus tratadores, a presença desse coccídio em locais utilizados para atividades recreativas demonstra a importância para a saúde pública. Esses mesmos autores pesquisaram a água utilizada para o consumo dos peixes-bois e água mineral utilizada pelos tratadores e funcionários, porém não foram encontrados oocistos desse protozoário.

BORGES *et al.* (2007a) avaliaram a relação entre a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) e em

funcionários envolvidos na manutenção destes animais em cativeiro. Foram encontrados 23,21% de positividade nas amostras dos peixes-boi marinhos e 23,8% nas amostras provenientes dos funcionários.

Crianças compreendem um grupo de risco importante devido à deficiência de hábitos higiênicos e imaturidade imunológica. Como a transmissão ocorre pela via fecal-oral, locais onde ocorre a aglomeração de crianças, especialmente em creches, essa transmissão é facilitada. Estudos realizados com crianças com diarreia sugerem que a criptosporidiose é endêmica nos países em desenvolvimento, com a identificação desse agente em cerca de 30% de crianças com sintomatologia clínica (MILLER *et al.*, 1994).

NEWMAN *et al.* (1999) avaliaram crianças do nordeste brasileiro que apresentavam diarreia persistente e encontraram oocistos de *Cryptosporidium* em 7,4% das amostras de fezes avaliadas. Esses oocistos foram mais frequentemente observados em crianças que apresentavam diarreia persistente (16,5%) do que naquelas que apresentavam diarreia aguda (8,4%) ou não apresentavam diarreia (4,0%). NASCIMENTO *et al.* (2009) analisaram a frequência de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de crianças, com idade variando de um a 14 anos de uma creche pública localizada em uma comunidade carente de Recife, Pernambuco. Das 182 fezes analisadas, 59 (32,4%) foram positivas, sendo a faixa etária de três a cinco anos de idade a mais acometida, representando 54,2%.

Trabalho realizado no Rio de Janeiro por CARVALHO-COSTA *et al.* (2007) encontrou uma frequência de 9,3% de *Cryptosporidium* nas fezes de crianças internadas com diarreia e desidratação em um hospital pediátrico.

Indivíduos imunossuprimidos representam um grupo de risco ao desenvolvimento de quadros mais severos da criptosporidiose. De OLIVEIRA-SILVA *et al.* (2007) analisaram as fezes de 359 pacientes com HIV/SIDA no período de 1993 a 2003, na região do Triângulo Mineiro e encontraram 8,6% de positividade para oocistos de *Cryptosporidium* spp. Este trabalho mostrou que pacientes com diarreia e níveis de linfócitos $CD4^{+} \leq 200$ células/mm^3 apresentaram maior frequência para este protozoário, demonstrando o caráter oportunista deste agente. Trabalho semelhante realizado por SILVA *et al.* (2005) avaliou a ocorrência de parasitos intestinais em pacientes com HIV/SIDA em um hospital na cidade de Uberlândia. Das 100 amostras fecais analisadas, 4% foram positivas para *Cryptosporidium.* RIBEIRO *et al.* (2004) analisaram as fezes de 75 pacientes com HIV/SIDA em um

hospital de Nova Iguaçu, e encontraram 9,33% de positividade para *Cryptosporidium.*

TABELA 02: RESUMO DOS PRINCIPAIS SURTOS DE CRIPTOSPORIDIOSE, ASSOCIADOS AO CONSUMO OU CONTATO COM ÁGUAS CONTAMINADAS, RELATADOS NA LITERATURA NO PERÍODO DE 1983 A 1998.

ANO	LOCAL	N° ESTIMADO DE CASOS	TIPO DE ÁGUA	TIPO DE TRATAMENTO	POSSÍVEL CAUSA
1983	Cobham, UK	16	Superficial	Cloração	ND
1984	Braun Station, EUA	2.006	Subterrânea	Cloração	Contaminação por esgoto
1984	Bexar, EUA	79	Subterrânea	ND	Contaminação por esgoto
1986	Sheffield, UK	537	Superficial	ND	Chuvas intensas provocaram escoamento; contaminação fecal (gado)
1987	Carrolton, EUA	12.960	Superficial	Convencional	Falhas no sistema operacional de tratamento
1988	Ayshire, UK	Centenas	Superficial	Convencional	Água do sistema de distribuição contaminada com fezes de gado
1988	Yorkshire, UK	67	Piscina	ND	Contaminação por esgoto
1988	Los Angeles, EUA	44	Piscina	ND	ND
1989	Swindon, UK	516	Superficial	Convencional	Água de lavagem dos filtros reciclada, contaminação fecal (gado)
1989	Loch Lomond, UK	442	Superficial	Microfiltragem e cloração	ND
1989	Humberside, UK	477	Superficial	Filtração rápida e lenta	ND
1990	Ilha de Thanet, UK	47	Superficial	Convencional	Falhas no sistema operacional de tratamento, contaminação fecal (gado) por escoamento
1991	Londres, UK	44	Sistema de distribuição	ND	Falhas no sistema operacional
1991	Pennsylvania, EUA	551	Subterrânea	Cloração	Tratamento ineficiente; contaminação por água de superfície
1992	Torbay, UK	108	Subterrânea e superficial	Filtração	Falhas no sistema operacional; água subterrânea contaminada
1992	Jackson, EUA	15.000	Superficial	Cloração	Tratamento ineficiente
1992	Yorkshire, UK	125	Sistema de distribuição	Filtração	Contaminação dos reservatórios (afluentes); chuvas intensas
1992	Mersey, UK	47	Sistema de distribuição	ND	ND
1992	Warrington, UK	1840	Subterrânea	ND	Chuvas intensas; contaminação por esgoto; escoamento de excretas de animais
1993	Milwaukee, EUA	403.000	Superficial	Convencional	Contaminação por esgoto/resíduos de atividades agrícolas; falhas no sistema operacional

Continua página 51

Continuação página 50

1993	Yakima, EUA	7	Subterrânea	ND	Contaminação por água de superfície; contaminação fecal (gado
1993	Wessex, UK	40	Subterrânea	ND	Oocistos detectados no reservatório do sistema de distribuição, mas a fonte é desconhecida
1993	Cook, EUA	27	Superficial	Filtração	Contaminação por refluxo de tanques sépticos de esgoto
1994	Clarck, EUA	103	Superficial	Filtração	Nenhuma falha operacional notada
1994	Missouri, EUA	101	Piscina	ND	ND
1994	Kanagawa, Japão	461	Sistema de distribuição	ND	Contaminação pós-tratamento: conexão cruzada seguida do mau-funcionamento da bomba de esgoto
1994	Sydney, Austrália	70	Piscina	ND	ND
1994	Walla Walla, EUA	134	Subterrânea	Não tratada/cloração	Infiltração de esgoto tratado
1994	SW Thames, UK	229	Sistema de distribuição	ND	ND
1994	Trent area, UK	33	Sistema de distribuição	ND	ND
1995	Alachua, EUA	72	Sistema de distribuição	ND	Inadequado sistema de prevenção de contrafluxo do lixo, contaminando água da rede de um camping
1995	Devon (Torbay), UK	575	Superfície	ND	Alta concentração de oocistos em esgoto descarregada no rio – oocistos detectados na água tratada e não tratada
1995	Itália	294	Sistema de distribuição	ND	Falhas no sistema operacional de tratamento
1996	Ft. Lauderdale,	22	Piscina	ND	ND
1996	Clovis, EUA	500	Água do parque	ND	ND
1996	Eagle Harbor, EUA	16	Água de consumo	ND	ND
1996	Kelowna, BC	100 (4.000)	Superfície	ND	Contaminação fecal (gado) da água não filtrada
1996	Cranbrook, BC	2000	Superfície	ND	Contaminação fecal (gado) da água não filtrada
1996	Ogose, Japão	8705	Sistema distribuição	ND	Oocistos detectados na água tratada e não tratada
1996	Inglaterra	226	Sistema distribuição	ND	ND
1996	Collingwood, Ontario	150	Superficial/sistema distribuição	ND	Água superficial não filtrada com turbidez>1,0 unt; coliformes não detectados na água após desinfecção
1997	Shoal Lake, Ontario	100	Sistema distribuição	ND	ND
1997	Inglaterra	366	Superficial	ND	ND
1997	Austrália	1200	Piscinas	ND	ND
1997	Nova Zelândia	300	Piscinas	ND	ND
1998	Brushy Creek, EUA	32	Subterrânea	ND	Contaminação por esgoto
1998	Sellwood, Oregon	51	Piscina	ND	ND

ND – não determinado
FONTE: Muller, 1999

TABELA 03: RESUMO DOS PRINCIPAIS SURTOS DE CRIPTOSPORIDIOSE, ASSOCIADOS AO CONSUMO OU CONTATO COM ÁGUAS CONTAMINADAS, RELATADOS NA LITERATURA NO PERÍODO DE 1998 A 2001.

ANO	LOCAL	N° DE CASOS	FONTE DE CONTAMINAÇÃO	ESPÉCIES IDENTIFICADAS
1998	Inglaterra	6	Água de tanque	*C. parvum*
1998	Inglaterra	62	Reservatório	*C. parvum*
*1998	Minnesota (EUA)	26	Piscina	ND
1999	Inglaterra	ND	Água de recreação	*C. hominis*
1999	Inglaterra	14	Água de recreação	*C. hominis* *C. parvum*
1999	Inglaterra	11	Água de recreação	*C. parvum*
1999	Inglaterra	16	Água de recreação	*C. hominis* *C. parvum*
1999	Inglaterra	11	Água de recreação	*C. hominis*
1999	Inglaterra	347	Reservatório	*C. hominis* *C. parvum* *C. meleagridis*
2000	Ohio, EUA	700	Água de recreação	*C. hominis* *C. parvum*
2000	Inglaterra	58	Água contaminada com fezes de animais	*C. parvum*
2000	Irlanda do Norte	117	Contaminação da água com esgoto	*C. hominis*
2000	Irlanda do Norte	129	Água de consumo	*C. parvum*
2001	Irlanda do Norte	230	Contaminação com esgoto	*C. hominis* *C. parvum*
2001	França	563	Contaminação de água de abastecimento com esgoto	*C. hominis*
**2001	Illinois	358	Parque aquático	*C. hominis*

ND: Não determinado

FONTE: SMITH et al. (2006); * LIM et al. (2004); **CAUSER et al. (2006)

TABELA 04: RESUMO DOS PRINCIPAIS SURTOS DE CRIPTOSPORIDIOSE, ASSOCIADOS AO CONSUMO OU CONTATO COM ÁGUAS CONTAMINADAS, RELATADOS NA LITERATURA NO PERÍODO DE 2002 A 2008.

ANO	LOCAL	Nº DE CASOS	FONTE DE CONTAMINAÇÃO	ESPÉCIES IDENTIFICADAS	REFERÊNCIA
2002	Suécia	800-1000	Piscina	ND	INSULANDER *et al.* (2005)
2003	Kansas (EUA)	617	Piscina comunitária	*C. hominis*	DZIUBAN *et al.* (2006)
2003	Japão	222	Piscina (competição escolar)	ND	ICHINOHE *et al.* (2005)
2004	Nagano (Japão)	288	Piscina (hotel)	ND	TAKAGI *et al.* (2008)
2004	Califórnia (EUA)	>250	Parque aquático	ND	WHEELER *et al.* (2007)
2005	New York	2307	Água de recreação	*C. hominis*	YODER *et al.* (2008)
2005	Ohio	523	Piscina	*C. hominis*	YODER *et al.* (2008)
2005	Missouri	56	ND	ND	TURABELIDZE *et al.* (2007)
2005	Japão	151	Piscina (competição escolar)	ND	YOKOI *et al.* (2005)
2006	Louisiana (EUA)	35	Parque aquático	ND	ALDEN *et al.* (2007)
2006	Carolina do Sul (EUA)	123	Água de recreação	DN	ALDEN *et al.* (2007)
2006	Inglaterra	35	ND (viagem a uma fazenda)	*C. parvum*	HOEK *et al.* (2008)
2006	Irlanda	29	ND	*C. parvum*	LAZENSKY *et al.* (2008)
2007	Idaho (EUA)	45	Parque aquático	*C. hominis*	JUE *et al.* (2009)
2008	Inglaterra	34		*Cryptosporidium* sp. genótipo de coelho, *C. hominis* e *C. parvum*	CHALMERS *et al*. (2009)
2008	EUA	16	Piscina comunitária	ND	BOEHMER *et al.* (2009)

ND: Não determinado

A prevenção da criptosporidiose deve ser feita evitando-se a contaminação da água pelo despejo de dejetos de humanos e/ou de animais. Um cuidado especial deve ser tomado nos casos de pacientes imunocomprometidos. Nesses casos, é indicado o aquecimento da água (72°C por um minuto ou até a fervura), utilização de filtros com limite de 1µm de porosidade ou filtros com osmose reversa (DILLINGHAM *et al.,* 2002).

Outro ponto importante na prevenção é o cuidado com a utilização do lodo de esgoto na agricultura. Sua crescente utilização levou IACOVSKI *et al*. (2004) a pesquisarem o lodo proveniente da estação de tratamento do esgoto em Florianópolis. Das 27 amostras analisadas, 20 (74,07%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp.

9. TRATAMENTO CONVENCIONAL DA ÁGUA

A contaminação de cursos d´água por *Cryptosporidium* e outros agentes patogênicos se deve principalmente ao despejo de esgoto não tratado de humanos. Porém, uma importante fonte de infecção são os animais domésticos, em especial os bovinos, que apresentam alta concentração de oocistos em suas fezes. Bezerros neonatos são particularmente susceptíveis à infecção e podem excretar cerca de 30 bilhões de oocistos ou mais num período de uma a duas semanas (KUCZYNSKA & SHELTON, 1999). Estas quantidades, no entanto, se dispersam nos grandes volumes de água, dificultando o monitoramento destes organismos.

Para que a população consuma uma água livre de agentes causadores de doenças, em especial os protozoários, é essencial que sejam aprofundados os conhecimentos sobre a distribuição desses parasitos em mananciais de abastecimento, assim como suas fontes de contaminação e ainda, a eficiência da remoção desses organismos pelos processos de tratamento da água (HELLER *et al.,* 2004).

O tratamento convencional da água inclui etapas físicas para a clarificação (coagulação, floculação, decantação e filtração) onde ocorre a retenção e a remoção do material particulado, incluindo os patógenos, e a etapa de desinfecção, com o objetivo de inviabilizar os patógenos remanescentes (BARROS *et al.,* 1995). Essas etapas são resumidamente descritas abaixo:

Na coagulação ocorre a desestabilização dos colóides (partículas sólidas minúsculas) presentes na água, permitindo assim que eles posteriormente se aglutinem, formando flocos, passíveis de serem separados na sedimentação ou na filtração. A reação química do coagulante na água ocorre em poucos segundos e é essa razão pela qual é necessária uma mistura intensa (mistura rápida) no momento da aplicação do coagulante, permitindo a exposição das partículas finas suspensas na água com o coagulante, antes que a reação de coagulação se complete.

Na floculação ocorre a formação de flocos, mediante a introdução de energia na massa líquida, capaz de favorecer o contato entre os colóides desestabilizados e permitir a aglutinação. Esse processo tem por objetivo a remoção da cor e da turbidez presentes na água e também a remoção de micro-organismos e substâncias indesejadas.

Após a floculação, observando-se o aspecto da água, ficam evidentes os flocos formados pela agregação das impurezas. Esta água já com os flocos passa para as grandes bacias de sedimentação ou decantação. Em um decantador a velocidade da água é baixa e o tempo para esta atravessá-lo é grande. Por esse motivo, os flocos com as impurezas neles contidos são precipitados, com redução de 90% das partículas. Os canais de saída de água decantada para os filtros são superficiais, evitando desta forma o arraste de partículas já sedimentadas.

Na filtração ocorre a passagem da água por um leito de material granular, através do qual ocorre a separação das partículas presentes na água. São classificados, em função do sentido do fluxo, em descendentes ou ascendentes, e, em função da velocidade de filtração, em rápidos (120 a 360 $m^3/m^2.d$) ou lentos (3 a 14 $m^3/m^2.d$).

No processo de clarificação, a filtração é uma operação essencial, também denominada de barreira sanitária do tratamento, uma vez que não se pode garantir uma adequada segurança da água não filtrada, com relação à presença de agentes patogênicos. Além disso, dificilmente obtém-se o atendimento ao padrão de turbidez, sem que se submeta a água bruta à filtração.

A desinfecção é o processo de inviabilização de micro-organismos patogênicos e de outros compostos indesejáveis. A ação desinfetante é uma ação de superfície, portanto, deve-se favorecer o encontro entre o desinfetante e o agente que se pretende destruir. Isto só será feito através de uma boa mistura, isto porque, uma mistura imperfeita permite a formação de cloraminas menos ativas do que o cloro livre. Sendo assim, o tempo de contato e o grau de mistura do desinfetante com a água a ser desinfetada são fatores dos quais depende a eficiência da desinfecção. Com a finalidade de modificar a característica química da água o cloro é aplicado como um agente oxidante, na remoção de amônia e seus compostos, compostos orgânicos e inorgânicos oxidáveis. Portanto, em determinadas águas, parte do cloro é consumida na ação oxidante e parte na ação desinfetante.

É frequente a utilização do cloro no início do tratamento (pré-cloração), na água decantada (intercloração) e na água filtrada (pós-cloração). A utilização do cloro pode também auxiliar na redução da cor no processo de coagulação, reduzir gosto e odor da água, reduzir o potencial para criação de condições sépticas do lodo depositado e reduzir e controlar o crescimento de matérias orgânicas no meio filtrante e nas paredes dos decantadores.

Por essas razões, o residual de cloro é mantido ao longo do processo. A pós-cloração tem a finalidade de proteger a água contra possíveis contaminações no sistema de distribuição. Por isso, o cloro residual livre na água tratada é mantido em torno de 1,5ppm (mg/L). Embora, a concentração residual do cloro dependerá da qualidade da água bruta e/ou tratada.

A correção do pH é feita através da utilização de um alcalinizante, sendo o mais utilizado, a cal. Assim como o cloro, a cal pode ser aplicada em três pontos do processo de tratamento: a pré-alcalinização ajusta o pH ideal de alcalinização; a inter-alcalinização auxilia o ajuste do pH final e facilita a remoção de compostos indesejáveis; a pós-alcalinização ajusta o pH da água final para diminuir o ataque da acidez da água nas tubulações do sistema adutor e redes de distribuição, evitando a corrosão.

Outros produtos químicos podem ser utilizados como auxiliares no tratamento de água. O polieletrólito pode ser aplicado na água coagulada com a finalidade de acelerar a floculação, decantação e filtração. O carvão ativado pode ser utilizado para remover presença de sabor e odor na água, devido à poluição e à proliferação de algas na água bruta. O ozônio tem se mostrado como um potencial desinfetante a ser utilizado no tratamento da água. PEREIRA *et al.* (2008) compararam o efeito do ácido hipocloroso, dióxido de cloro e ozônio na inativação de oocistos de *Cryptosporidium.* Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou o ozônio, chegando a 100% de inatividade quando utilizado na concentração de 0,24mg/L em sistema fechado.

10. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, M.S.; TEMPLETON, T.J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J.E.; ZHU, G. *et al*. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum.* **Science,** v. 304, p. 441-445, 2004.

ALDEN, N.B.; GHOSH, T.S.; VOGT, R.L.; ANDREASEN, M.S.; BULLER-FENTON, S.; DAVIS, J.; HENRY, S.A.; RATARD, R.; ROACH, A.; DROCIUK, D.; MEREDITH, J.; BALL, R.; BAKER, L.; GRANDPRE, J.; MURPHY, M.D.; VAN HOUTEN, C.; BEACH, M.J.; BISHOP, H.; DA SILVA, A.J.; HILL, V.R.; XIAO, L.; BOEHMER, T.K.; BRUNKARD, J.M.; CHRISTIAN, K.A.; LUCE, R.; TREVINO, I.C. Cryptosporidiosis outbreaks associated with recreational water use – five states, 2006. **MMWR,** v. 56 (29), p. 729-732, 2007.

ALMEIDA, T.T.C. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase).** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil, 2004, 143p.

AMAR, C.F.; DAR, P.H.; McLAUCHLIN, J. Detection and identification by real time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from humam faeces. **Letter Applied Microbiology,** v. 38, p. 217-222, 2004.

ARAÚJO, A.J.; KANAMURA, H.Y.; ALMEIDA, M.E.; GOMES, A.H.; PINTO, T.H.; DA SILVA, A.J. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 50 (3), p. 139-143, 2008.

ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1490-1495, 1989.

BARROS, R.T. de V. *et al.* **Manual de Saneamento e Proteção Ambiental para os Municípios.** Belo Horizonte. Escola de Engenharia da UFMG, 1995. 221p.

BERINO, E.C.S. **Ocorrência e detecção de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em águas brutas de abastecimento de formadores do lago Guaíba.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS), Porto Alegre, RS, Brasil, 2004, 155p.

BOEHMER, T.K.; ALDEN, N.B.; GHOSH, T.S.; VOGT, R.L. Cryptosporidiosis from a community swimming pool: outbreak investigation and follow-up study. **Epidemiology and Infection,** v. 137, p. 1651-1654, 2009.

BORGES, J.C.G.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G.; GOMES, J.K.N.; de LIMA, R.P. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água destinada a manutenção dos peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) em cativeiro. **Revista Biotemas,** v. 20 (3), p. 67-74, 2007b.

BORGES, J.C.G.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G.; LIMA, A.M.A. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) e funcionários envolvidos no manejo da espécie. **Estudos de Biologia,** v. 29 (66), p. 33-41, 2007a.

BRADY, M.T.; OLESKE, J.M.; WILLIAMS, P.L.; ELGIE, C.B.S.; MOFENSON, L.M.; DANKNER, W.M.; VAN DYKE, R.B. Declines in mortality rates and changes in causes of death in HIV-1-infected children during the HAART era. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes,** v. 53 (1), p. 86-94, 2010.

BRANCO, N. **Avaliação da presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas minerais naturais de nascentes e enteroparasitoses em duas comunidades rurais da cidade de Campos de Jordão, SP, Brasil.** Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil, 2006, 99p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 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**, 141(59), p. 266.

BRASIL. MINISTÉRIO DAS CIDADES. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Programa de Modernização do Setor Saneamento – PMSS. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – Parte 2 – Tabelas de Informações e Indicadores**, 448p, 2007.

BRIANCESCO, R.; BONADONNA, L. An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. **Environmental Monitoring and Assessment,** v. 104, p. 445-457, 2005.

BRUIJNESTEIJN VAN COPPENRAET, L.E.; WALLINGA, J.A.; RUIJS, G.J.; BRUINS, M.J.; VERWEIJ, J.J. Parasitological diagnosis combining na internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. **Clinical Microbiology and Infection,** v. 15 (9), p. 869-874, 2009.

CACCIÒ, S.; HOMAN, W.; CAMILLI, R.; TRALDI, G.; KORTBEEK, T.; POZIO, E. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum.* **Parasitology,** v. 120 (3), p. 237-244, 2000.

CACCIÒ, S.; SPANO, F.; POZIO, E. Large variation at two microsatellite loci among zoonotic (genotype C0 isolates of *Cryptosporidium parvum.* **International Journal of Parasitology,** v. 31(10), p. 1082-1086, 2001.

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

CAREY, C.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Comparison of most probable number-PCR and most probable number-foci detection method for quantifying infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental samples. **Journal of Microbiological Methods,** v. 67, p. 363-372, 2006.

CARRARO, E.; FEA, E.; SALVA, S.; GILLI, G. Impacto f a wastewater treatment planto n *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in surface water. **Water Science and Technology,** v. 41, p. 31-37, 2000.

CARVALHO-COSTA, F.A.; GONÇALVES, A.Q.; LASSANCE, S.L.; DE ALBUQUERQUE, C.P.; LEITE, J.P.G.L.; BÓIA, M.N. Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 40 (3), p. 346-348, 2007.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; DA COSTA, J.M.C.; MEZO, M. Contribuition of tre ated wastewater to the contamination of recreational river áreas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Water Research,** v. 42, p. 3528-3538, 2008.

CAUSER, L.M.; HANDZEL, T.; WELCH, P.; CARR, M.; CULP, D.; LUCHT, R.; MUDAHAR, K.; ROBINSON, D.; NEAVEAR, E.; FENTON, S.; ROSE, C.; CRAIG, L.; ARROWOOD, M.; WAHLQUIST, S.; XIAO, L.; LEE, Y.M.; MIREL, L.; LEVY, D.; BEACH, M.J.; POQUETTE, G.; DWORKIN, M.S. An outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection at an Illinois recreational waterpark, **Epidemiology and Infection,** v. 134 (1), p. 147-156, 2006.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta. Disponível em: <www.cdc.gov>. Acesso em 15/04/09.

CHALMERS, R.M.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; HAFDI, S.J.; XIAO, L.; RYAN, U.; MODHA, D.; MALLAGHAN, C.. *Cryptosporidium* sp. rabbit genotype, a newly identified human pathogen. **Emerging Infectious Diseases,** v. 15 (5), p. 829-830, 2009.

CHEN, F.; HUANG, K.; QIN, S.; ZHAO, Y.; PAN, C. Comparison of viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in potassium dichromate solution and chlorinated tap water. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 13-17, 2007.

CLARK, D.P.; SEARS, C.L. The pathogenisis of cryptosporidiosis. **Parasitology Today,** v. 12 (6), p. 221-225, 1996.

CONNELLY, J.T.; NUGEN, S.R.; BOREJSZA-WYSOCKI, W.; DURST, R.A.; MONTAGUA, R.A; BAEUMNER, A.J. Human pathogenic *Cryptosporidium* species bioanalytical detection method with single oocyst detection capability. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 391, p. 487-495, 2008.

CURRENT, W.L.; GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 4 (3), p. 325-358, 1991.

D´ANTONIO, R.G.; WINN, R.E.; TAYLOR, J.P.; GUSTAFSON, T.L.; CURRENT, W.L.; RHODES, M.M.; GARY JR, G.W.; ZAJAC, R.A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. Annals of Internal Medicine, v. 103 (6), p. 886-888, 1985.

DENG, M.Q.; CLIVER, D.O. Differentiation of *Cryptosporidium parvum* isolates by a simplified randomly amplified polymorphic DNA technique. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 64 (5), p. 1954-1957, 1998.

DE OLIVEIRA-SILVA, M.B.; DE OLIVEIRA, L.R.; RESENDE, J.C.P.; PEGHINI, B.C.; RAMIREZ, L.E.; LAGES-SILVA, E.; CORREIA, D. Seasonal profile and level of CD4+ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/AIDS patients in the Triângulo Mineiro region, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 40 (5), p. 512-515, 2007.

DI BENEDETTO, M.A.; DI PIAZZA, F.; MAIDA, C.M.; FIRENZE, A.; OLIVERI, R. Ocurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in watewater, surface water and ground water samples in Palermo (Sicily), **Annali di Igieni: medicina preventiva e di comunità,** v. 17, p. 367-375, 2005.

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

DOI, Y. *Cryptosporidium* Pig genotype II in immunocompetent man. **Emerging Infectious Diseases,** v. 15 (6), p. 982-983, 2009.

DOWNEY, A.S.; GRACZYK, T.K. Maximizing recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from spiked eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissue samples. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 73 (21), p. 6910-6915, 2007.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals.** Boston: CRC Press, 1990, 199p.

DZIUBAN, E.J.; LIANG, J.L.; CRAUN, G.F.; HILL, V.; YU, P.A.; PAINTER, J.; MOORE, M.R.; CALDERON, R.L.; ROY, S.L.; BEACH, M.J. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water – United States, 2003-2004. **MMWR,** v. 55 (12), p. 1-24, 2006.

FAHEY, T. Cryptosporidiosis. **Infetious Disease Update,** v. 10 (2), p. 75-80, 2003.

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

FAYER R (2009). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology** doi:10.1016/j.exppara.2009.03.005

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

FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology,** *in press,* disponível para download em 19 de maio de 2009.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology,** v. 156, p. 191-198, 2008.

FRANCO, R.M.B.; CARTUSIO-NETO, R. Occurrence of Cryptosporidial oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in th city of Campinas, state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97 (2), p. 205-207, 2002.

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CARTUSIO-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**, v. 43 (2), p. 109-111 2001.

FUJINO, T.; MATSUI, T.; KOBAYASHI, F.; HARUKI, K.; YOSHINO, Y.; KAJIMA, J.; TSUJI, M. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64 (3), p. 199-200, 2002.

FUJINO, T.; MATSUO, T.; OKADA, M.; MATSUI, T. Detection of a small number of *Cryptosporidium parvum* oocysts by sugar floatation and sugar centrifugation methods. **Parasitology**, v. 68 (11), p. 1191-1193, 2006.

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**, v. 31, p.151-153, 2000.

GARCÉS-SANCHEZ, G.; WILDERER, P.A.; MUNCH, J.C.; HORN, H.; LEBUHN, M. Evaluation of two methods for quantification of hsp70 mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples. **Water Research,** v. 43 (10), p. 2669-2678, 2009.

GAUTAM, H.; BHALLA, P.; SAINI, S.; UPPAL, B.; KAUR, R.; BAVEJA, C.P.; DEWAN, R. Epidemiology of opportunistic infections and its correlation with CD4 T L-lymphocyte counts and plasma viral load among HIV-positive patients at a Tertiary Care Hospital in India. **Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care (JIAPAC).** doi: 10.1177/1545109709346881

FAYER R (2009). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology** doi:10.1016/j.exppara.2009.03.005

GIANGASPERO, A.; BERRILLI, F.; BRANDONISIO, O. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. **Parasitology Research,** v. 101, p. 1169-1182, 2007.

GONÇALVES, E.M.; DA SILVA, A.J.; EDUARDO, M.B.; UEMURA, I.H.; MOURA, I.N.; CASTILHO, V.L.; CORBETT, C.E. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a Day care unit in São Paulo. **Clinics (Sao Paulo),** v. 61 (2), p. 119-126, 2006.

GUYOT, K.; FOLLET-DUMOULIN, A.; RECOURT, C.; LELIÈVRE, E.; CAILLIEZ, J.C.; DEI-CAS, E. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of a diagnostic 452-base-pair ENA fragment discriminates between *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis* and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 68 (4), p. 2071-2076, 2002.

HACHICH, E. M.; GALVANI, A.T.; MENEGON, N.; PADULA, J.A.; SATO, M.I.Z. Importância do controle dos parasitos patogênicos Giardia e *Cryptosporidium* em águas captadas para consumo humano. In: **XXVII Congreso Interamericano de Ingenieria Sanitaria Y Ambiental**, Porto Alegre, Brasil, 2000.

HACHICH, E.M. **Avaliação da presença dos protozoários *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp. Em águas captadas para consumo humano no Estado de São Paulo**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil, 2002.

HAQUE, R.; ROY, S.; SIDDIQUE, A.; MONDAL, U.; RAHMAN, S.M.; MONDAL, D.; HOUPT, E.; PETRI JR, W.A. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 76 (4), p. 713-717, 2007.

HASHIMOTO, A.; SUGIMOTO, H.; MORITA, S.; HIRATA, T. Genotyping of single *Cryptosporidium* oocysts in sewage by semi-nested PCR and direct sequencing, **Water Research,** v. 40, p. 2527-2532, 2006.

HELLER, L.; BASTOS, R.K.X.; VIEIRA, M.B.C.M.; BEVILACQUA, P.D.; de BRITO, L.L.A.; MOTA, S.M.M.; OLIVEIRA, A.A.; MACHADO, P.M.; SALVADOR, D.P.; CARDOSO, A.B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Saúde,** v. 13 (2), 2004.

HOEK, M.R.; OLIVER, I.; BARLOW, M.; HEARD, L.; CHALMERS, R.; PAYNTER, S. Outbreak of *Cryptosporidium parvum* among children after a school excursion to na adventure farm, south West England. **Journal Water Health,** v. 6 (3), p. 333-338, 2008.

HSU, B-M.; HUANG, C.; HSU, Y-F.; et al. Evaluation of two concentration methods for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. **Water Research,** v. 35 (2), p. 419-424, 2000.

IACOVSKI, R.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Detection and enumeration of *Cryptosporidium* SP. Oocysts in sewage sludge samples from the city of Florianópolis (Brazil) by using immunomagnetic separation combined with indirect immunofluorescence assay. **Waste Management & Research,** v. 22, p. 171-176, 2004.

ICHINOHE, S.; FUKUSHIMA, T.; KISHIDA, K.; SANBE, K.; SAIKA, S.; OGURA, M. Secondary transmission of cryptosporidiosis associated with swimming pool use. **Japanese Journal of Infectious Diseases,** v. 58, p. 400-401, 2005.

INSULANDER, M.; LEBBAD, M.; STENSTRÖM, T.A.; SVENUNGSSON, B. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases,** v. 37 (5), p. 354-360, 2005.

ISSAC-RENTON, J.; BLATHERWICK, J.; BOWIE, W.R.; FYFE, M.; KHAN, M.; LI, A.; KING, A.; MCLEAN, M.; MEDD, L.; MOOREHEAD, W.; ONG, C.S.; ROBERTSON, W. Epidemic and endemic seroprevalence of antibodies to *Cryptosporidium* and *Giardia* in residents of three communities with different drinking water supplies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60 (4), p. 578-583, 1999.

JAKUBOWSKI, W.S.; BOUTROS, S.; FABER, F.; FAYER, F.; GHIORSE, W. LeCHEVALLIER, M.; ROSE, J.; SHAUB, S.; SIGNGH, A.; STERWART, M. Environmental methods for *Cryptosporidium.* **JAMA, the Journal of the American Medical Association,** v. 88, p. 107-121, 1996.

JEX, A.R.; SMITH, H.V.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. *Cryptosporidium* – biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances,** v. 26, p. 304-317, 2008.

JIANG, J.; ALDERISIO, K.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,** v. 71 (3), p. 1135-1141, 2005a.

JIANG, J.; ALDERISIO, K.A.; XIAO, L. Distribuition of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 71 (8), p. 4446-4454, 2005b.

JUE, R.; SCHMALZ, T.; CARTER, K.; NETT, R.J. Outbreak of Cryptosporidiosis Associated with a Splash Park. **MMWR,** v. 58(22), p.615-618, 2009.

KEEGAN, A.; DAMINATO, D.; SAINT, C.P.; MONIS, P.T. Effect of water treatment processes on *Cryptosporidium* infectivity. **Water Research,** v. 42, p. 1805-1811, 2008.

KESHVARZ, A.; HAGHIGHI, A.; ATHARI, A.; KAZEMI, B.; ABADI, A.; MOJARAD, E.N. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. **Veterinary Parasitology,** v. 160, n3-4, p. 316-318, 2009.

KHAN, O. **Intestinal (protozoa) and liver parasites sporozoea order: eucoccidiida. *Cryptosporidium parvum* – a review of cryptosporidiosis.** Disponível em: <http://www.cdfound.to.it/HTML/khan.htm>. Acesso em 10 de agosto de 2008.

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

KVÁC, M.; HANZLÍKOVÁ, D.; SAK, B.; KVETONOVÁ, D. Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotyp II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. **Veterinary Parasitology,** v. 160, n3-4, p. 319-322, 2008.

LAZENSKY, R.; HAMMOND, R.M.; VAN ZILE, K.; GEIB, K. Cryptosporidiosis outbreak in a Nassau County, Florida, return travel group from Ireland, May 24, 2006-June 4, 2006. **Journal of Environmetal Health,** v. 71 (2), p. 20-24, 2008.

LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; Lee, R.G. Ocurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 57 (9), p. 2610-2616, 1991.

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

LEMOS, V.; GRACZYK, T.K.; ALVES, M.; LOBO, M.L.; SOUSA, M.C.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Identification and determination of the viability of *Giardia lamblia* cysts and *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts in human fecal and water supply samples by fluorescent in situ hybridization (FISH) and monoclonal antibodies. **Parasitology Research,** v. 98 (1), p. 48-53, 2005.

LEONE, A.; RIPABELLI, G.; SAMMARCO, M.L.; GRASSO, G.M. Detection of *Cryptosporidium* spp. from human faeces by PCR-RFLP, cloning and sequencing. **Parasitology Research**, v. 104 (3), p. 583-587, 2009.

LEONI, F.; GÓMEZ-COUSO, H.; ARES-MAZÁS, M.E.; MCLAUCLIN, J. Multilocus genetic analysis of *Cryptosporidium* in naturally contaminated bivalve molluscs. **Journal of Applied Microbiology,** v. 103 (6), p. 2430-2437, 2007.

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

LIM, L.S.; VARKEY, P.; GIESEN, P.; EDMONSON, L. Cryptosporidiosis outbreak in a recreational swimming pool in Minnesota, **Journal of Environmental Health,** v. 67 (1), p. 16-20, 2004.

LUPO, P.J.; LANGER-CURRY, R.C.; ROBINSON, M.; OKHUYSEN, P.C.; CHAPPELL, C.L. *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 78 (6), p. 917-921, 2008.

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. Amassive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted trhough the public water supply. **New England Journal of Medicine,** Boston, v. 3, p. 161-167, 1994.

MATTSSON, J.G.; INSULANDER, M.; LEBBAD, M.; BJÖRKMAN, C.; SVENUNGSSON, B. Molecular typing of *Cryptosporidium parvum* associated with a diarrhoea outbreak identifies two sources of exposure. **Epidemiology and Infection,** v. 136 (8), p. 1147-1152, 2007.

MEDEMA, G.J.; SCHIJVEN, J.F. Modelling the sewage discharge and dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. **Water Research**, v. 35, p. 4307-4316, 2001.

MEISEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C.E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in a immunosuppressed patient. **Gastroenterology,** v. 70, p. 1156-1160, 1976.

MILLER, K.; DURAN-PINALES, C.; CRUZ-LOPEZ, A.; et al. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrea in Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 51, p. 322-5, 1994.

MINAROVICOVÁ, J.; KACLÍKOVÁ, E.; KRASCSENICSOVÁ, K.; SIEKEL, P.; KUCHTA, T. A single-tube nested real-time polymerase chain reaction for sensitive contained detection of *Cryptosporidium parvum.* **Letter Applied Microbiology,** v. 49 (5), p. 568-572, 2009.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H. Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. **International Journal for Parasitology,** v. 28, p. 981-987, 1998.

MONIS, P.T.; SAINT, C.P. Development of a Nested-PCR assay for the detection of *Cryptospodium parvum* in finished water. **Water Research***,* v. 35, p. 1641-1648, 2001.

MONS, C.; DUMÈTRE, A.; GOSSELIN, S.; GALLIOT, C.; MOULIN, L. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris área. **Water Research,** v. 43, p. 211-217, 2009.

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

MORGAN, U.M.; MONIS, P.T.; FAYER, R.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R.C. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. **The Journal of Parasitology**, v. 85 (6), p. 1126-1133, 1999a.

MORGAN, U.M.; PHILIP, A.; O´BRIENB, R.C..; THOMPSON, A. The development of diagnostic PCR primers for *Cryptosporidium* using RAPD-PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology,** v. 77, p. 103-108, 1996.

MORGAN, U.M.; XIAO, L.; FAYER, R.; GRACZYK, T.K.; LAL, A.A.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R.C. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from captive reptiles using 18S rDNA sequence data and random amplified polymorphic DNA analysis. **The Journal of Parasitology**, v. 85 (3), p. 525-530, 1999b

MULLER, A.P.B. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de são Paulo.** Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP*),* São Paulo, SP, Brasil, 1999, 135p.

NASCIMENTO, W.R.C.; CAVALCANTI, I.M.F.; IRMÃO, J.I.; ROCHA, F.J.S. Presença de *Cryptosporidium* spp em crianças com diarreia aguda em uma creche pública de Recife, Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 42 (2), p. 175-178, 2009.

NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; MOORE, S.R.; NATARO, J.P.; WUHIB, T.; AGNEW, D.A.; GUERRANT, R.L.; LIMA, A.A. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180 (1), p. 167-175, 1999.

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

NISHI, L.; BAESSO, M.L.; SANTANA, R.G.; FREGADOLLI, P.; FALAVIGNA, D.L.M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a Public Water-Treatment System. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, p. 221-228, 2009.

OLSON, M.E.; O´HANDLEY, R.M.; RALSTON, B.J.; MCALLISTER, T.A.; THOMPSON, R.C.A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology,** v. 20 (4), p. 185-191, 2004.

ONG, C.S.; EISLER, D.L.; GOH, S.H.; TOMBLIN, J.; AWAD-EL-KARIEM, F.M.; BEARD, C.B.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A.; FYFE, M.; KING, A.; BOWIE, W.R.; ISAAC-RENTON, J.L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis outbreaks and transmission in British Columbia, Canada, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 61 (1), p. 63-69, 1999.

ONG, C.S.L.; EISLER, D.L.; ALIKHANI, A.; FUNG, V.W.K.; TOMBLIN, J.; BOWIE, W.R.; ISAAC-RENTON, J.L. Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first reporto f human infections with a cervine genotype. **Emerging Infectious Diseases,** v. 8 (3), p. 263-268, 2002.

PARR, J.B.; SEVILLEJA, J.E.; SAMIE, A.; ALCANTARA, C.; STROUP, S.E.; KOHLI, A.; FAYER, R.; LIMA, A.A.; HOUPT, E.R.; GUERRANT, R.L. Detection and quantification of *Cryptosporidium* in HCT-8 cells and human fecal specimens using real-time polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 76 (5), p. 938-942, 2007.

PEREIRA, J. T., COSTA, A., SILVA, M. B.O.; SCHUCHARD W.; OSAKI, S. C., CASTRO, E. A., PAULINO, R. C., THOMAZ-SOCCOL, V. Comparing the Efficacy of Chlorine, Chlorine Dioxide, and Ozone in the Inactivation of *Cryptosporidium parvum* in Water from Parana State, Southern Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. , v.144, p.001 - 010, 2008.

PILAI, D.R. *Cryptosporidium* sp. Rabbit genotype, a newly identified human pathogen. **Emerging Infectious Diseases,** v. 15 (5), p. 829-830, 2009.

PIRESTANI, M.; SADRAEI, J.; DALIMI, A.A.; ZAVVAR, M.; VAEZNIA, H. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from human and bovine using 18S rRNA gene in Shahriar county of Tehran, Iran. **Parasitology Research,** v. 103 (2), p. 467-472, 2008.

QUÍLEZ, J.; TORRES, E.; CHALMERS, R.M.; HADFIELD, S.J.; DEL CACHO, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 74 (19), p. 6026-6031, 2008a.

QUÍLEZ, J.; TORRES, E.; CHALMERS, R.M.; ROBINSON, G.; DEL CACHO, E.; SANCHEZ-ACEDO, C. *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. **Parasitology,** v. 135, p. 1613-1620, 2008b.

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

RIBEIRO, P.C.; PILE, E.; QUEIROZ, M.M.C.; NORBERG, A.N.; TENÓRIO, J.R.O. Cryptosporidiosis occurrence in HIV + patients attended in a hospital, Brazil. **Revista da Saúde Pública,** v. 38 (3), p. 469-470, 2004.

RICHTER, B.; FRAGNER, K.; WEISSENBÖCK, H. Simultaneous detection of protozoa in the tissues of snakes by Double in situ hybridization. **Microscopy Research and Technique,** v. 71 (4), p. 257-259, 2008a.

RICHTER, B.; KÜBBER-HEISS, A.; WEISSENBÖCK, H.; SCHMIDT, P. Detection of *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. and *Monocercomonas* spp. in the gastrointestinal tract of snakes by in-situ hybridization. **Journal of Comparative Pathology,** v. 138 (2-3), p. 63-67, 2008b.

ROBERTSON, L.J.; BJERDE, B. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw Waters in Norway. **Scandinavian Journal Public Health,** v. 29, p. 200-208, 2001b.

ROBERTSON, L.J.; BJERDE, B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. **Journal of Food Protection,** v. 64 (11), p. 1793-1798, 2001a.

SATOH, M.; NAKAI, Y. Discrimination of *Cryptosporidium* species by denaturing gradient gel electrophoresis. **Parasitology Research,** v. 101, p. 463-466, 2007.
SCHETS, F.M.; ENGELS, G.B.; DURING, M.; RODA HUSMAN, A.M. Detection of Infectious *Cryptosporidium* oocysts by cell culture immunofluorescence assay: applicability to environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 71 (11), p. 6793-6798, 2005.

SEMENZA, J.C.; NICHOLS, G. Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. **Euro Surveill,** v. 12 (5), p. 13-14, 2007.

SHIANNA, K.V.; RYTTER, R.; SPANIER, J.G. Randomly amplified polymorphic DNA PCR analysis of bovine *Cryptosporidium parvum* strains isolated from the watershed of the Red River of the North. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 64 (6), p. 2262-2265, 1998

SILVA, C.V.; FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S.; COSTA-CRUZ, J.M. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases,** v. 37 (3), p. 211-215, 2005.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology,** v. 27 (10), p. 1135-1145, 1997.

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,** v. 22, p. 161-167, 2006.

SMITH, H.V.; CAMPBELL, B.M.; PATON, C.A.; NICHOLS, R.A.B. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in water concentrates determined by using 4´,6´-diamino-2-phenylindole and immunofluorescence microscopy. **Applied and Environmental Microbiology** v. 68, p. 5198-5201, 2002.

SMITH, R.P.; CHALMERS, R.M.; ELWIN, K.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; MUELLER-DOBLIES, D.; WATKINS, J.; PAIBA, G..A.; GILES, M. Investigation of the role of companion animals in the zoonotic transmission of cryptosporidiosis. **Zoonoses and Public Health,** v. 56, p. 24-33, 2009.

SOBA, B.; PETROVEC, M.; MIOC, V.; LOGAR, J. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. **Clinical Microbiology and Infection***,* v. 12, p. 918-921, 2006.

SOLDAN, O.C.P.; VÁSQUEZ, F.V.; VARAS, A.G.; CORDÓN, G.P.; SOTO, J.R.V.; SÁNCHES-MORENO, M.; GONZALES, I.R.; LOMBARDO, M.J.R. Intestinal parasitism in Peruvian children and molecular characterization of *Cryptosporidium* species. **Parasitology Research,** v. 98, p. 576-581, 2006.

TAGUCHI, T.; SHINOZAKI, Y.; TAKEYAMA, H.; HARAGUCHI, S.; YOSHINO, M.; KANEKO, M.; ISHIMORI, Y.; MATSUNAGA, T. Direct counting of *Cryptosporidium parvum* oocysts using fluorescence in situ hybridization on a membrane filter, **Journal of Microbiological Methods,** v. 67 (2), p. 373-80, 2006.

TAKAGI, M.; TORIUMI, H.; ENDO, T.; YAMAMOTO, N.; KUROKI, T. An outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming pools. **Kansenshogaku Zasshi,** v. 82 (1), p. 14-19, 2008.

TAMBURRINI, A. e POZIO, E. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal for Parasitology,** v. 29, p. 711-715, 1999.

TEM-HOVE, R.; SCHUURMAN, T.; KOOISTRA, M.; MÖLLER, L.; VAN LIESHOUT, L.; VERWEIJ, J.J. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. **Clinical Microbiology and Infection,** v. 13 (10), p. 1001-1007, 2007.

TROTZ-WILLIAMS, L.A.; MARTIN, D.S.; GATEI, W.; CAMA, V.; PEREGRINE, A.S.; MARTIN, S.W.; NYDAM, D.V.; JAMIESON, F.; XIAO, L. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. **Parasitology Research,** v. 99, p. 346-352, 2006.

TURABELIDZE, G.; LIN, M.; WEISER, T.; ZHU, B-P. Communitywide outbreak of cryptosporidiosis in rural Missouri associated with attendance at child care centers. **Archives of Pediatric Adolescent Medicine,** v. 161 (9), p. 878-883, 2007.

TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. Trends in Parasitology, v. 24 (4), p. 184-189, 2008.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1997), Method 1622 – *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. U.S. Environmental Protection Agency Publication, 821-R-97-023. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1999), Method 1623—*Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. U.S. Environmental Protection Agency Publication,. 821/R-99-006. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

WALDRON, L.S.; FERRARI, B.C.; GILLINGS, M.R.; POWER, M.L. Terminal restrition fragment length polymorphism for identification of *Cryptosporidium* species in human feces. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 75 (1), p. 108-112, 2009.

WHEELER, C.; VUGIA, D.J.; THOMAS, G.; BEACH, M.J.; CARNES, S.; MAIER, T.; GORMAN, J.; XIAO, L.; ARROWOOD, M.J.; GILLISS, D.; WERNER, S.B. Outbreak of cryptosporidiosis at a California waterpark: employee and patron roles and the long Road towards prevention. **Epidemiology and Infection**, v. 135 (2), p. 302-310, 2007.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTecniques,** v. 39, p. 75-85, 2005.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1239-1255, 2008.

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis *in:* ORTEGA, Y. R. **Foodborne Parasites.** Springer US, 2006, 108p.

XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R.C.A.; FAYER, R.; LAL, A.A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 65 (8), p. 3386-3391, 1999.

YODER, J.S.; HLAVSA, M.C.; CRAUN, G.F.; HILL, V.; ROBERTS, V.; YU, P.A.; HICKS, L.A.; ALEXANDER, N.T.; CALDERON, R.L.; ROY, S.L.; BEACH, M.J. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events – United States, 2005-2006. **MMWR**, v. 57 (09), p. 1-29, 2008.

YOKOI, H.; TSURUTA, M.; TOSHIMITSU, T.; TSUTAKE, M.; AKIBA, Y.; KIMURA, T.; TOKITA, Y.; AKIMOTO, T.; MITSUI, Y.; OGASAWARA, Y.; IKEGAMI, H. *Cryptosporidium* outbreak in a Sports Center. **Japanese Journal Infection Disease,** v. 58, p. 331-332, 2005

ZAVVAR, M.; SADRAEI, J.; EMADI, H.; PIRESTANI, M. The use of a nested PCR-RFLP technique, based on the parasite´s 18S ribosomal RNA, to characterise *Cryptosporidium* isolates from HIV/AIDS patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology,** v. 102 (7), p. 597-601, 2008.

ZINTL, A.; PROCTOR, A.F.; READ, C.; DEWAAL, T.; SHANAGHY, N.; FANNING, S.; MULCAHY, G. The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. **Epidemiology and Infection,** v. 137, p. 270-277, 2009.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) E DA NESTED PCR (nPCR) PARA A DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* spp PRESENTES EM ÁGUA

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) E DA NESTED PCR (nPCR) PARA A DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp PRESENTES EM ÁGUA

Resumo: Surtos de criptosporidiose por veiculação hídrica tem sido relatados tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Métodos sensíveis para detectar oocistos em água são necessários para prevenir a transmissão. No presente trabalho, técnicas de PCR e nPCR foram avaliadas com o objetivo de detectar *Cryptosporidium* em água. Amostras de água contendo 10^5 a 1 oocistos foram submetidos a quatro diferentes técnicas de extração de DNA. Cinco pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos foram testados em reações para detectar *Cryptosporidium*. Amostras submetidas à extração de DNA utilizando a técnica de *salting-out* seguidas de reação de PCR usando *primers* LAX469F/LAX869R apresentaram sensibilidade para detectar 10 oocistos, em PCR de etapa única. Os melhores resultados foram obtidos na nPCR com os primers XIAF/XIAR e subsequentemente XIA2F/XIA2R, utilizando DNA extraído com *kit* comercial. Nestas condições, sinais de amplificação foram observados em amostras contendo apenas dois oocistos. A aplicação dessas técnicas é discutida nesse presente trabalho, como uma possibilidade de ser empregada para detectar *Cryptosporidium* em água consumida pela população brasileira, uma vez que até o momento no Brasil não são feitas análises para detectar protozoários veiculados pela água.

Palavras-chave: *Cryptosporidium,* PCR, nested-PCR, técnica de extração de DNA, água.

EVALUATION OF DIFFERENT METHODS OF EXTRACTION OF DNA AND STANDARDIZATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) FOR OOCYSTS DETECTION OF *Cryptosporidium* spp IN WATER

Abstract: Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis have been reported both in developed and developing countries. Sensitive methods to detect oocysts in water are necessary for preventing transmission. In the present work, PCR and the nested-PCR techniques were evaluated in order to detect *Cryptosporidium* in water. Sets of water of separate tubes containing 10^5 to 1 oocyst were submitted to four different DNA extraction techniques. Five distinct pairs of specific primers were tested in the reactions to detect *Cryptosporidium*. DNA extraction with the salting-out technique followed by reactions using primers LAX469F/LAX869R rendered sensitivity to detect 10 oocysts, in a single step PCR. The best result was obtained in the nested-PCR with the primers XIAF/XIAR and subsequently XIA2F/XIA2R, using DNA extracted by the commercial kit. These procedures allowed detecting amplification signs in samples with two oocysts only. The application of this technique is discussed in the present work as a proposal to detect *Cryptosporidium* in water supplied to the population in Brazil, where the control of such protozoan has not been undertaken in water supplies so far.

Key words: *Cryptosporidium,* PCR, nested-PCR, DNA extraction technique, water.

1. INTRODUÇÃO

As primeiras técnicas de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* presentes em água, alimento, material fecal ou amostras de tecido foram feitas através de exames microscópicos. Dentre os métodos de coloração, a técnica de Ziehl-Neelsen modificada (HENRICKSEN e POHTENZ, 1981) tem se mostrado a melhor opção para diferenciar os oocistos de debris fecais e facilitar a identificação dos oocistos. Apesar de bastante usada, essa técnica apresenta uma baixa sensibilidade e especificidade (JEX *et al.,* 2008).

Devido às limitações inerentes à detecção específica de *Cryptosporidium* usando microscopia, métodos imunológicos e/ou citometria de fluxo, um grande número de métodos baseados na detecção de ácidos nucleicos tem sido desenvolvidos e avaliados para a identificação de espécies, variação genética intraespecífica de inúmeros materiais, como amostras fecais e ambientais (JEX *et al.,* 2008). A determinação da espécie envolvida possibilita a identificação da fonte de contaminação e consequente implementação de medidas profiláticas (QUINTERO-BETANCOURT *et al.*, 2002). Métodos moleculares tem sido aplicados em pesquisas ambientais e tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade (RAMIRES e SREEVATSAN, 2006). A maior sensibilidade que a PCR apresenta quando comparada com a imunofluorescência pode ser explicada pela diminuição de antígenos de superfície durante o período em que os oocistos permanecem no meio ambiente (JIANG *et al.,* 2005).

O sequenciamento direto de produtos da PCR, assim como a utilização de enzimas de restrição (RFLP) tem sido praticado para a detecção de *Cryptosporidium* e identificação das diferentes espécies e genótipos (LEETZ *et al.,* 2007).

No presente trabalho, o objetivo foi padronizar a técnica de PCR e nested-PCR para a identificação de *Cryptosporidum* buscando melhorar a sensibilidade do método, com perspectivas de empregá-lo para detecção deste parasito em água.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS DE PARASITOS:

Oocistos de *Cryptosporidium parvum* foram adquiridos junto à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, com a colaboração da Profa Dra. Márcia Benedita de Oliveira Silva, que obteve os parasitos de fezes de bezerros neonatos infectados experimentalmente por via oral. Os oocistos foram purificados utilizando protocolos descritos por ORTEGA-MORA *et al.* (1992) com modificações segundo SILVA (2000) (ANEXO 01), estocados em PBST com antibióticos (500 UI/mL de penicilina e 0,024 mg/mL de estreptomicina), quantificados e mantidos em geladeira por até um mês antes do uso.

2.2. EXTRAÇÃO DE DNA:

Para determinação da melhor técnica de extração de DNA amostras de oocistos foram inoculadas em um microlitro de água ultrapura. O processo foi realizado com amostras contendo 10^4, 10^3, 500, 10^2, 50, 10 e 1 oocisto, para determinação da sensibilidade de detecção de DNA de *Cryptosporidium* por PCR. Após a contaminação as amostras foram centrifugadas a 10.000g durante 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi suspenso em 1mL de tampão, de acordo com o método de extração de DNA, e submetido à extração de DNA por quatro diferentes técnicas:

2.2.1. Método Clássico Segundo SAMBROOK *et al.* (1989) (ANEXO 02)

Para lise da parede dos oocistos do *Cryptosporidium parvum* foram realizados três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido a -196ºC por cinco minutos e descongelamento a 37ºC em banho-maria por cinco minutos. A desproteinização foi feita utilizando uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Para a concentração do DNA foram usadas soluções de

acetato de sódio (3M) e etanol puro. Nas lavagens subsequentes usou-se etanol a 70%. O DNA foi eluído com 100µL de tampão TEN (Tris-EDTA-NaCl).

2.2.2. Protocolo Descrito por WEISS (1993) Modificado. (ANEXO 03)

Neste protocolo a ruptura celular foi feita com tampão de lise contendo β-mercaptoetanol [100 µL de 100mM Tris-HCl (pH 8,0) + 100 µL 50mM EDTA (pH 8,0) + 50 µL SDS a 10% + 3,5 µL 70 mM β-mercaptoetanol] e enzimas (lisozima, proteinase K e RNAse). As demais etapas foram iguais às do subitem 2.2.1.

2.2.3. Protocolo de MILLER *et al.* (1988), com Modificações. (ANEXO 04)

O material contendo os oocistos foi centrifugado (10.000g/10min) e o sobrenadante foi descartado, em seguida foi adicionado tampão de lise (TE 5X) seguido de 15 ciclos de congelamento/descongelamento (-80ºC/56ºC), foi adicionado proteinase K e SDS seguido de incubação em banho-maria. Após a incubação o material foi deixado em temperatura ambiente e adicionou-se solução saturada de NaCl (6M), o material foi agitado vigorosamente e centrifugado a 12.000g. O sobrenadante foi transferido para um tubo e centrifugado novamente a 12.000g. O sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo e acrescentado etanol 99,5%. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi secado em estufa a 37ºC. O DNA foi então eluído em água ultrapura.

2.2.4. Utilização de *Kit* Comercial: *ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit*.

Aos oocistos foi adicionado 1mL de tampão de lise presente no *kit*. Em seguida foram submetidos a 15 ciclos de congelamento (-80 ºC) e descongelamento (55ºC). Para a lise da parede foi utilizada proteinase K, em seguida RNAse, sendo as demais etapas realizadas de acordo com o fabricante.

2.3. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) E NESTED PCR (nPCR)

Os quatro pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram escolhidos por serem os mais utilizados por diversos pesquisadores, segundo a literatura consultada. As reações de PCR foram testadas com iniciadores específicos para o gênero *Cryptosporidium* ou apenas para *C. parvum* e *C. hominis*, cujos tamanhos esperados dos fragmentos estão descritos na Figura 1. Os diferentes protocolos de reação de PCR empregados são descritos a seguir:

2.3.1 *Primers* XIAF/ XIAR (5´TTCTAGAGCTAATACATGCG/5´CCCATTTCCTTCGAAACAGGA3'), que amplificam a região hiper-variada do gene 18SSU rRNA (XIAO *et al*, 2000). A reação foi realizada em volume final de 25µL, contendo $MgCl_2$, 200µM de cada dNTP, *primer*, *Taq* DNA polimerase, DNA; com desnaturação inicial a 94ºC – 3 min., 35 ciclos a 94ºC - 45 seg./55ºC – 1 min./72º C – 1 min. e extensão final a 72º C – 7 min. Os produtos foram submetidos à *nested*-PCR (nPCR), utilizando-se os primers XIA2F e XIA2R (5´GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG3'/ 5´AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA) nas mesmas condições descritas acima.

2.3.2 *Primers* AWA995F/ AWA1206R (5´TAGAGATTGGAGGTTGTTCCT/ 5´CTCCACCAACTAAGAACGGCC), que amplificam a região hiper-variada do gene 18SSU rRNA (AWAD-EL-KARIEM *et al.*, 1994). A reação foi realizada em volume final de 25µL, contendo $MgCl_2$, 200µM de cada dNTP, *primer*, *Taq* DNA polimerase, DNA, com desnaturação inicial a 95ºC – 7 min., 40 ciclos a 94ºC – 1 min./54ºC – 1 min./72º C – 3 min. e extensão final a 72º C – 7 min.

2.3.3 *Primers* CRY15F/CRY9R (5´GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG/ 5´GTAGATAATGGAAGAGATTGTG), que amplificam o gene codificador da proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium* (COWP) (SPANO *et al*., 1997). A reação foi realizada em volume final de 50µL, contendo $MgCl_2$, 200µM de cada dNTP, *primer*, *Taq* DNA polimerase, DNA, com desnaturação inicial a 94ºC – 5 min., 40 ciclos a 94ºC – 30 seg./55ºC – 30 seg./72º C – 1 min. e extensão final a 72º C – 7 min.

2.3.4 *Primers* LAX469F/LAX869R (5´ CCGAGTTTGATCCAAAAAGTTACGAA/ 5´TAGCTCCTCATATGCCTTATTGAGTA), que também amplificam região hipervariada do gene 18SSU rRNA (LAXER *et al.*, 1991). A reação foi realizada em volume final de 25µL, contendo $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, *primer*, Taq DNA polimerase e 5µL de DNA., com desnaturação inicial a 95ºC – 7 min., 40 ciclos a 94ºC – 1 min./52ºC – 1 min./72º C – 3 min. e extensão final a 72º C – 7 min.

Para cada reação foram testadas 5,0; 2,5 e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase;10 e 20pmol de cada *primer*, 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 6,0mM de $MgCl_2$ e 5,0 e 10µL de DNA.

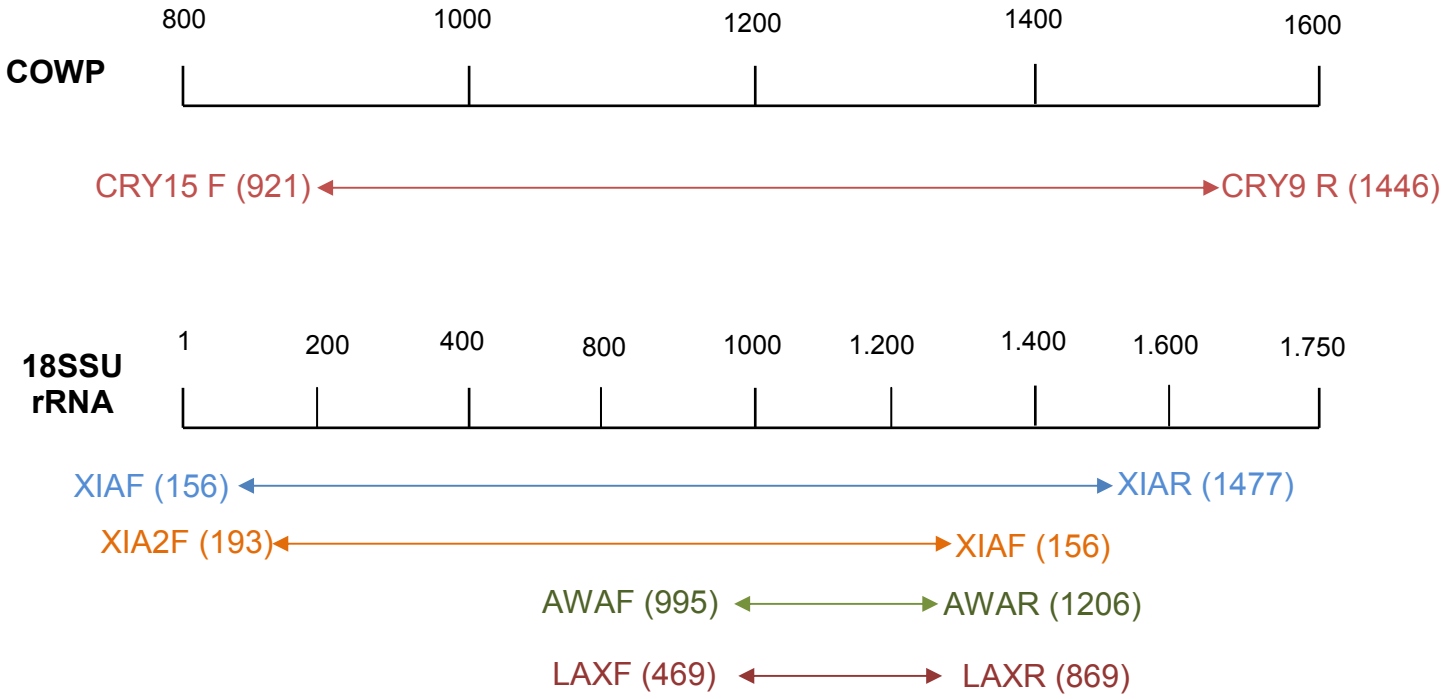

FIGURA 1. POSIÇÕES DOS PARES DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA *Cryptosporidium* spp. ACESSO NO GENBANK (COWP Z22537; SSU rRNA AF093489) (YU *et al.,* 2009)

2.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos amplificados pela PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,6%. Em seguida o gel foi deixado submerso em uma solução contendo brometode etídio (0,5µg/mL) durante 20 a 30 minutos, visualizados em UV e fotodocumentado.

3. RESULTADOS

As duas primeiras técnicas de extração de DNA (método clássico segundo SAMBROOK *et al.*, 1989 e modificado do protocolo descrito por WEISS, 1993), seguidas de amplificação do DNA de *Cryptosporidium* tiveram a capacidade de identificar 10^3 a 10^5 oocistos do parasito presentes em amostras de água. A técnica de *Salting-out* modificada detectou até 10 oocistos (TABELA 01). Quando o *kit* comercial foi usado para a extração de DNA na padronização da PCR, foi possível detectar o DNA de apenas dois oocistos presentes em amostras de água (TABELA 02).

TABELA 01: RESULTADOS DAS REAÇÕES DE PCR E nPCR PARA AMPLIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE *Cryptosporidium* spp. ou *C. parvum/C. hominis* EM AMOSTRAS CONTENDO 10^5 A 10 OOCISTOS, QUANDO O DNA FOI EXTRAÍDO PELO MÉTODO DE *SALTING-OUT* MODIFICADO.

Primers	Especificidade	Reação	Tamanho esperado do fragmento gênico	Sinais de amplificação na PCR					
				10^5	10^4	10^3	10^2	50	10
AWA995F AWA1206R	Gênero	PCR	211	+	+	+	+	-	-
CRY 15F CRY 9R	*C. parvum, C. hominis*	PCR	550	+	+	+	+	-	-
LAX469F LAX869R	*C. parvum, C. hominis*	PCR	451	+	+	+	+	+	+
XIAF XIAR	Eukarioto	PCR	1325	+	+	-	-	-	-
XIA2F XIA2R	Gênero	nested PCR	826-864	+	+	+	-	-	-

TABELA 02: RESULTADOS DAS REAÇÕES DE PCR E nPCR PARA AMPLIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE *Cryptosporidium* spp. ou *C. parvum/C. hominis* EM AMOSTRAS CONTENDO 10^5 A 1 OOCISTOS, QUANDO O DNA FOI EXTRAÍDO PELO KIT CHARGESWITCH®.

Primers	Especificidade	Reação	Tamanho esperado do fragmento gênico	Sinais de amplificação na PCR										
				10^5	10^4	10^3	10^2	50	10	5	4	3	2	1
AWA995F AWA1206R	Gênero	PCR	211	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CRY 15F CRY 9R	*C. parvum, C. hominis*	PCR	550	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
LAX469F LAX869R	*C. parvum, C. hominis*	PCR	451	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
XIAF XIAR	Eukarioto	PCR	1325	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
XIA1F XIA2R	Gênero	nested PCR	826-864	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

A tabela 3 sumariza os resultados da padronização da reação de PCR em relação à quantidade de DNA, unidades da enzima *Taq* DNA polimerase, concentração de $MgCl_2$ e *primer*.

TABELA 03: PADRONIZAÇÃO DA PCR UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $MgCl_2$, *PRIMERS* E *TAQ* DNA POLIMERASE

***Primer*/reagente**	**$MgCl_2$ (mM)**	**Primer (μM)**	***Taq* DNA pol. (U)**
XIAF/XIAR	3.0	0.8	1.25
CRY9F/CRY15R	3.0	0.4	2.50
LAX469F/LAX869R	3.0	0.8	1.25
AWA995F/AWA1206R	2.0	0.8	1.25

Considerando os *primers* usados na PCR, o par XIAF/XIAR apresentou uma sensibilidade de detectar cinco oocistos (TABELA 02 e FIGURA 02). A nPCR foi então realizada para amplificar a região interna do fragmento previamente obtido. Nesse caso houve um aumento na sensibilidade e a técnica foi capaz de detectar apenas dois oocistos (TABELA 02 e FIGURA 03). No estágio simples de PCR, quando os *primers* AWA995F/AWA1206R foram utilizados foi possível detectar apenas 100 oocistos (TABELA 01 e 02; e FIGURA 04), quando os *primers* LAX469F/ LAX869R, houve sinal de amplificação em amostras contendo 10 oocistos (TABELA

01 e FIGURA 05) e foi possível detectar cinco oocistos quando os *primers* CRY9F/CRY15R foram usados (TABELA 02 e FIGURA 06).

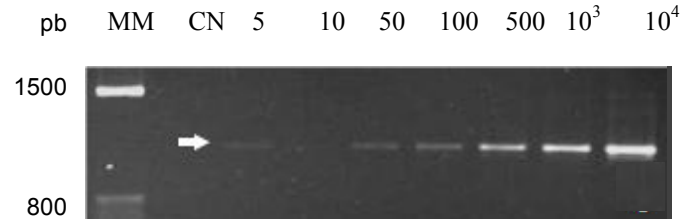

FIGURA 02- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE *Cryptosporidium* spp. POR PCR COM *OS PRIMERS* XIAF/XIAR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (1325pb). MM: MARCADOR MOLECULAR, CN: CONTROLE NEGATIVO.

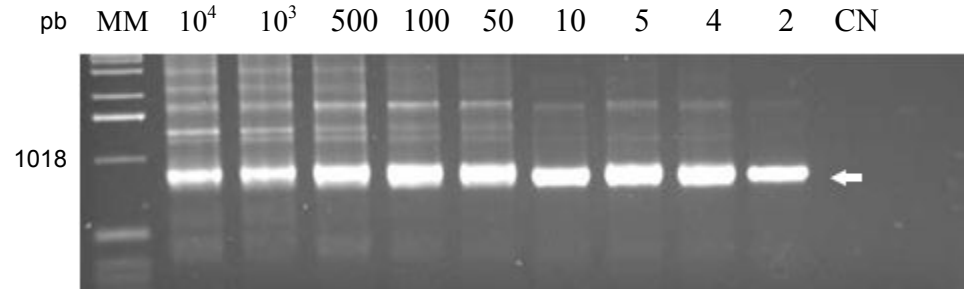

FIGURA 03- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE *Cryptosporidium* spp. POR nPCR COM *OS PRIMERS* XIA2F/XIA2R. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (826-864pb). MM: MARCADOR MOLECULAR, CN: CONTROLE NEGATIVO.

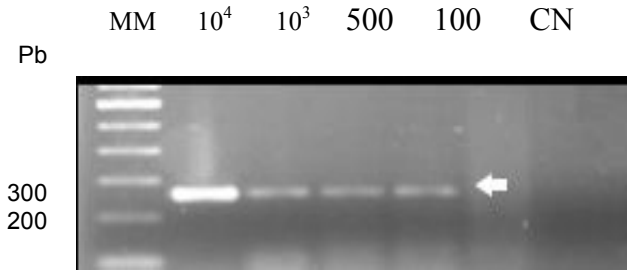

FIGURA 04- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE *Cryptosporidium* spp. POR PCR COM *OS PRIMERS* AWA995F/1206R. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (211p). MM: MARCADOR MOLECULAR, CN: CONTROLE NEGATIVO.

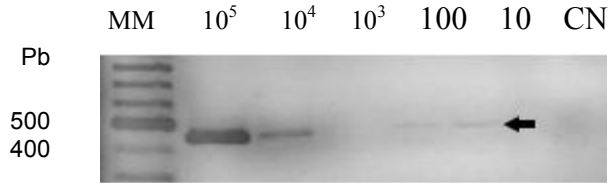

FIGURA 05- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE *Cryptosporidium parvum/C. hominis* POR PCR COM *OS PRIMERS* LAX469F/869R. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (451pb). MM: MARCADOR MOLECULAR, CN: CONTROLE NEGATIVO.

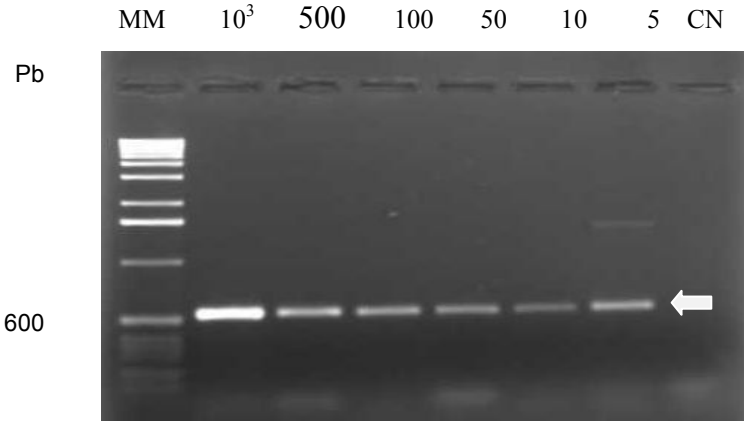

FIGURA 06- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO GÊNICO DE *Cryptosporidium parvum/C. hominis* POR PCR COM *OS PRIMERS* CRY15F/9R. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (550pb). PM: MARCADOR MOLECULAR, CN: CONTROLE NEGATIVO.

4. DISCUSSÃO

A sensibilidade de métodos de detecção de patógenos em amostras ambientais é hoje em dia de grande interesse para os investigadores, uma vez que vários surtos de doenças de veiculação hídrica vem sedo relatados em países desenvolvidos. Especialmente no caso de protozoários patogênicos, cuja dose infectante geralmente é baixa, e dessa forma, pequenas contaminações podem ser suficientes para que ocorram grandes surtos ou casos isolados da doença. Para resolver este problema buscou-se padronizar metodologias moleculares como a técnica de PCR e suas variantes visando aumentar a sensibilidade na detecção do DNA do parasito. Todavia, ainda não há um consenso, pois, várias são as dificuldades para trabalhar com amostras ambientais. No presente trabalho visou-se avaliar a técnica de PCR e Nested PCR para detectar *Cryptosporidium* em água uma vez que a técnica de PCR permite amplificar uma cópia de DNA milhões de vezes e amplificar o sinal. Uma das maiores dificuldades observadas foi na fase de extração de DNA. A etapa de lise da parede dos oocistos foi determinante pois estes possuem espessura de 40nm (HARRIS e PETRY, 1999) e é composta por quatro camadas sendo que a externa possui 5nm e é uma cadeia difusa com zonas interespassadas com densidades diferentes e formada por material filamentoso; espaço de 5nm; camada central, de 10nm fibrilar e a camada interna, com 20nm, além da presença de estruturas particuladas e glicoproteína filamentosa (PETRY, 2004). Devido a essa composição resistente da parede, os 15 ciclos de congelamento e descongelamento realizados neste trabalho, antes da extração de DNA mostraram-se necessários para a quebra da parede e consequente liberação do material genômico.

Ultrapassada a primeira barreira, de ruptura da parede e liberação do material genômico, outra etapa importante na realização da PCR foi a extração de um DNA purificado, livre de substâncias que possam inibir a reação de PCR. Diante disso, nosso trabalho comparou quatro técnicas de extração de DNA, visando a obtenção de um DNA purificado propiciando uma taxa de detecção alta, ou seja, uma técnica que apresentasse uma sensibilidade alta.

Na fase de amplificação a sensibilidade da técnica de PCR pode ainda ser afetada pela presença de substâncias orgânicas e inorgânicas, especialmente em água, fezes, e solo, tornando o isolamento e a purificação do DNA as etapas mais

difíceis (RAMIREZ e SREEVATSAN, 2006). Os carboidratos e os produtos químicos são mencionados também como os contaminantes que inibem a técnica de PCR (HIGGINS *et al.*, 2001).

A extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio demonstrou o resultado menos satisfatório, pois um mínimo de 10^3 oocistos foram necessários para a visualização dos sinais de amplificação. LEETZ *et al.* (2007) compararam a sensibilidade de 20 pares de *primers* em amplificar pequenas quantidades de oocistos. A taxa de detecção variou de 10 a 10^4 oocistos. A capacidade de detectar apenas 10 oocistos pode ter sido devido à realização de uma etapa de purificação imunomagnética realizada antes do início da extração de DNA.

Assim, obter o DNA de boa qualidade é um estágio crucial para que a PCR seja bem sucedida. Os resultados encontrados neste trabalho confirmaram a necessidade de uma etapa de purificação mais específica, já que o método mais eficiente, capaz de detectar apenas dois oocistos, foi o que utilizou o *kit* comercial que possui pérolas magnéticas que se ligam aos oocistos proporcionando uma melhor remoção de substâncias potencialmente inibidoras da PCR (TABELA 02).

Outras formas de purificação poderiam ter sido testadas neste trabalho e associadas à extração de DNA pelas técnicas em que não foi utilizado o *kit* comercial. RAMIREZ e SREEVATSAN (2006) associaram o método de flutuação pela sacarose com a extração de DNA, diminuindo a interferência por substâncias inibidoras, aumentando sua sensibilidade de 10^6 para 10 oocistos, demonstrando a importância do processo de purificação durante a extração de DNA. Todavia, a etapa de purificação de DNA por sacarose é mais um passo e que pode levar a perdas, e em amostras ambientais este é um ponto crucial.

PLUTZER *et al.* (2008) testaram seis métodos de extração de DNA e os resultados demonstraram que inibidores de PCR estavam presentes em todos os métodos de extrações; entretanto, esse efeito inibidor pode ser significativamente reduzido pela adição de BSA. Trabalho semelhante ao nosso foi feito por YU *et al.* (2009) que compararam sete pares de *primers* para a detecção de DNA de *Cryptosporidium parvum* em amostras de água contaminadas com 1 a 10^7 oocistos. A extração de DNA foi feita com *kit* comercial e os piores resultados encontrados foram aqueles que apresentaram sensibilidade de 10^2 a 10^3 na PCR, semelhantes aos resultados deste trabalho quando foi utilizada a técnica de *salting-out* na extração de DNA associada aos *primers* AWA, CRY e à nPCR (TABELA 01). De

uma forma geral nosso trabalho apresentou resultados melhores, uma vez que quando utilizamos o *kit* comercial para a extração de DNA, o pior resultado encontrado foi o que apresentou sensibilidade para detectar 100 oocistos (TABELA 02). Quando comparamos o par de *primer* CRY, esses autores conseguiram detectar apenas 10^4 oocistos, enquanto que em nosso trabalho foi possível identificar 100 oocistos.

No Brasil, embora a pesquisa sobre *Cryptosporidium* na água não seja compulsória, é recomendada pela Portaria 518/2004 do Ministério da saúde (BRASIL, 2004). Se, em futura revisão da portaria, o monitoramento do *Cryptosporidium* se tornar obrigatório para as companhias de saneamento, haverá um considerável aumento no custo de produção da água potável, caso o Brasil dependa da importação de *kits* de diagnósticos para detecção de protozoários. Considerando o custo dos métodos de detecção que utilizam separação imunomagnética e anticorpos fluorescentes, como o 1622 e 1623 (USEPA, 1997 e 1999), a PCR tem sido testada como uma técnica mais barata por diversos autores para detectar protozoários encontrados na água (XIAO *et al.*, 1999; HIGGINS *et al.*, 2001; MONIS e SAINT, 2001; TROTZ-WILLIAMS *et al.*, 2006).

A metodologia utilizada neste trabalho apresentou uma sensibilidade elevada, pois foi possível detectar DNA de apenas dois oocistos e demonstrou ser uma ferramenta promissora no monitoramento da água utilizada para o consumo, uma vez que os processos do tratamento não são capazes de eliminar o parasito (PEREIRA *et al*., 2008). Uma avaliação sistemática da presença de *Cryptosporidium* na água tratada poderia reduzir os riscos da contaminação e de surtos como aqueles que ocorreram em países desenvolvidos.

5. CONCLUSÃO

- Para que ocorra o rompimento da parede dos oocistos e consequente liberação do material genômico foram necessários 15 ciclos de congelamento/descongelamento antes da extração de DNA.

- A extração de DNA utilizando *kit* comercial obteve melhor resultado, apresentando uma sensibilidade para detectar dois oocistos.

- O par de *primer* que apresentou melhor desempenho na nPCR, sendo possível detectar apenas dois oocistos foi o desenhado por XIAO *et al.* (2000) quando associado à extração de DNA utilizando o *kit* comercial.

6. REFERÊNCIAS

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 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**, 141(59), p. 266.

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

HENRICKSEN, S.A.; POHTENZ, J.F. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica,** v. 22 (3-4), p. 594-596, 1981.

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

JEX, A.R.; SMITH, H.V.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. *Cryptosporidium* – biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances,** v. 26, p. 304-317, 2008.

JIANG, J.; ALDERISIO, K.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,** v. 71 (3), p. 1135-1141, 2005.

LAXER, M.A.; TIMBLIN, B.K.; PATEL, R.J. DNA Sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 45 (6), p. 688-694, 1991.

LEETZ, A.S.; SOTIRIADOU, I.; ONGERTH, J. KARANIS, P. An evaluation of primers amplifying DNA targets for the detection of *Cryptosporidium* spp. using *C. Parvum* HNJ-1 Japanese isolate in water samples. **Parasitology Research,** v. 101, p. 951-62, 2007.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D. E POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 1215, 1988.

MONIS, P.T. E SAINT, C.P. Development of a Nested-PCR assay for the detection of *Cryptospodium parvum* in finished water. **Water Research***,* v. 35, p. 1641-1648, 2001.

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,** v. 60 (8), p. 3442-5, 1992.

PEREIRA, J. T., COSTA, A., SILVA, M. B.O.; SCHUCHARD W.; OSAKI, S. C., CASTRO, E. A., PAULINO, R. C., THOMAZ-SOCCOL, V. Comparing the Efficacy of Chlorine, Chlorine Dioxide, and Ozone in the Inactivation of *Cryptosporidium parvum* in Water from Parana State, Southern Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. , v.151, p. 464-473, 2008.

PETRY, F. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum.* **Microscopy and Microanalysis,** v. 10, p. 586-601, 2004.

PLUTZER, J.; KARANIS, P.; DOMOKOS, K.; TÖRÖKNÉ, A.; MÁRIALIGETI, K. Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. **International Journal of Hygiene and Environmental Health,** v. 211, p. 524-533, 2008.

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

RAMIREZ, N.E.; SREEVATSAN, S. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. **Veterinary Parasitology***,* v. 136, p. 201-213, 2006.

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

SILVA, M.B.O. **Infecção natural e experimental de *Cryptosporidium* e caprinos: avaliação clínica, parasitológica e da resposta humoral. Belo Horizonte, (2000).** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

SPANO, F.; PURIGNANI, L.; MCLAUCHLIN, J.; CASEMORE, D.P.; CRISANTI, A. A PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **FEMS Microbiology Letters,** v. 150, p. 209-217, 1997.

TROTZ-WILLIAMS, L.A.; MARTIN, D.S.; GATEI, W.; CAMA, V.; PEREGRINE, A.S.; MARTIN, S.W.; NYDAM, D.V.; JAMIESON, F.; XIAO, L. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. **Parasitology Research,** v. 99, p. 346-352, 2006.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1997), Method 1622 – *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. U.S. Environmental Protection Agency Publication, 821-R-97-023. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1999), Method 1623—*Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. U.S. Environmental Protection Agency Publication,. 821/R-99-006. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

WEISS, J. B. (1993), PCR detection of *Giardia lamblia*. *In*-**Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications,** ed. D.H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, T. J. White, T. J., American Society for Microbiology, Washington, pp. 480-485.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A.A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental microbiology,** v. 66 (12), p. 5492-5498, 2000.

YU, J.R.; LEE, S.U.; PARK, W.Y. Comparative sensitivity of PCR primer sets for detection of *Cryptosporidium parvum.* **Korean Journal of Parasitology,** v. 47 (3), p. 293-297, 2009.

CAPÍTULO III

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*Cryptosporidium* E PADRONIZAÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA DETECÇÃO DE OOCISTOS EM ÁGUA

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*Cryptosporidium* E PADRONIZAÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA DETECÇÃO DE OOCISTOS EM ÁGUA

Resumo: *Cryptosporidium* spp. emergiu como um dos mais importantes patógenos veiculados pela água. A identificação de seus oocistos em amostras ambientais frequentemente é feita pelo uso de imunofluorescência direta (IFD) após processos de concentração e purificação, de acordo com o recomendado pela USEPA (United States Environmental Protection Agency) no método 1623. Os *kits* utilizados para a realização da IFD são importados e de custo elevado, dessa forma o objetivo do presente experimento foi produzir anticorpos policlonais anti-*Cryptosporidium* e conjugá-los com isotiocianato de fluoresceína (FITC) para utilização na imunofluorescência direta visando usá-los para determinação do protozoário em água. Dois coelhos foram imunizados e várias coletas de sangue foram feitas para separação de soro e avaliar a produção de anticorpos específicos. Posteriormente foi feito um *pool* dos soros colhidos e esses foram preparados para a extração das imunoglobulinas G que foram purificadas e conjugadas com FITC. O conjugado produzido foi utilizado com sucesso em amostra de água contaminada experimentalmente com oocistos de *Cryptosporidium*, sendo capaz de detectar até cinco oocistos/"spots" que corresponde a uma contaminação de 250 oocistos/mL.

Palavras-chave: anticorpos policlonais, imunofluorescência direta, oocistos, água.

PRODUCTION OF ANTI-*Cryptosporidium* POLYCLONAL ANTIBODIES AND STANDARDIZATION OF DIRECT IMMUNOFLUORESCENCE FOR DETECTING OOCYSTS IN WATER

Abstract: *Cryptosporidium* spp. has emerged as one of the most important pathogens transmitted via water. The identification of their oocysts in environmental samples is frequently performed by direct immunofluorescence assays (IF) after being submitted to concentration and purification processes, following the USEPA (United States Environmental Protection Agency) recommendations - method 1623. The kits used for IF are imported and consequently very expensive, thus the objective of the present experiment was to produce polyclonal antibodies against *Cryptosporidium* and conjugate them with fluorescein isothiocyanate (FITC) to be used in direct immunofluorescence in order to determine the protozoa in water. Two rabbits were immunized and several samples of blood were collected to verify the production of specific antibodies. Subsequently, a pool of collected sera was produced, and these sera were prepared for the extraction of immunoglobulins *G,* which were purified and conjugated with FITC. The produced conjugate was successfully utilized in samples of water experimentally contaminated with *Cryptosporidium* oocysts and allowed detecting up to five oocysts/spot, which corresponds to a contamination of 250 oocists/mL.

Keywords: Polyclonal Antibodies; Direct Immunofluorescence; Oocysts; Water

1. INTRODUÇÃO

O ensaio de imunofluorescência para detecção de *Cryptosporidium* foi desenvolvido na década de 1980, apresentando inúmeras vantagens em relação à técnica até então utilizada que empregava a flutuação com solução de sulfato de zinco e coloração com lugol (CARTUSIO-NETO, 2004). Esta técnica quando comparada à coloração com fucsina ácida possui a vantagem de apresentar uma maior sensibilidade e especificidade (XIAO e CAMA, 2006).

Um dos problemas na utilização da IFD em amostras de água é a presença de um grande número de substâncias orgânicas e inorgânicas capazes de se ligarem aos anticorpos e promover um resultado falso-positivo (RODGERS *et al.*, 1995). Esse problema pode ser minimizado através da implantação de uma etapa de purificação, cujo objetivo é eliminar partículas que possam se ligar aos anticorpos marcados produzindo fluorescência que pode confundir o técnico menos experiente.

Essa técnica, assim como outras que utilizam métodos imunofluorescentes não são capazes de informar a espécie de *Cryptosporidium*, genótipo e hospedeiros específicos (HASHIMOTO *et al.*, 2006), porém continuam tendo uma grande importância em estudos epidemiológicos e na avaliação da qualidade da água pós tratamento. Além disso os métodos 1622 e 1623 da Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA, 1997 e 1999), desenvolvidos para monitoramento de *Cryptosporidium* em água, requerem como última etapa anticorpos monoclonais fluorescentes capazes de marcar a membrana dos oocistos de *Cryptosporidium*.

Considerando o alto custo para a realização dos métodos 1622 ou 1623, a proposta deste trabalho foi a produção de anticorpos policlonais para utilização em ensaios de imunofluorescência em amostras de água de captação ou água tratada, visando a determinação dos níveis de contaminação por oocistos de *Cryptosporidium.*

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PREPARO DO EXTRATO ANTIGÊNICO

Os oocistos de *C. parvum* previamente purificados foram contados em câmara de Neubauer e um total de 10^8 diluídos em 10mL de PBS (pH 7,2) foram submetidos ao ultrassom (60Hz). Foram utilizados cinco ciclos de um minuto, em banho de gelo, seguidos de um minuto de repouso. O extrato foi centrifugado por 30 minutos a 9.000g a 4ºC e o material obtido foi dividido em antígeno solúvel (sobrenadante) e antígeno particulado (sedimento).

A concentração proteica foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) usando como solução padrão a albumina (BSA), na concentração de 1 mg/Ml. Após a calibração do aparelho, procedeu-se a leitura das absorbâncias das amostras utilizando-se o filtro de 595nm.

2.2. IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados dois coelhos machos da raça Nova Zelândia com idade aproximada de sete meses. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 30 dias antes do início das imunizações. Todos os procedimentos relacionados ao manejo dos animais e a coleta de material foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (CEEA/UFPR), processo nº. 23075.029322/2007-47, certificado 250 (ANEXO 05).

Cada um dos animais recebeu a primeira dose do extrato antigênico com 1,25mg e 0,85mg do antígeno solúvel e particulado respectivamente, acrescida de adjuvante completo de *Freund* (Sigma Chemical Company) no dia 0.

Após 15 dias, os animais receberam uma segunda imunização, composta do extrato antigênico na mesma concentração que a primeira imunização e do adjuvante incompleto de *Freund* (Sigma Chemical Company), por via subcutânea, na região escapular direita. A terceira imunização foi repetida 15 dias após a aplicação da segunda dose, sendo idêntica a esta última, mas aplicada na região da escápula esquerda.

2.3. OBTENÇÃO DO SORO HIPERIMUNE

Os animais imunizados (item 2.2) foram submetidos a sangrias de prova realizadas nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120. As sangrias de produção foram realizadas aos 45, 60 e 75. Os soros obtidos foram armazenados a –20ºC até o seu uso.

2.4. TITULAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

O Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme*-Linked ImmunoSorbent Assay-*ELISA*) foi usado para determinar a cinética de produção de anticorpos contra *Cryptosporidium*. O protocolo adotado para este experimento seguiu aquele proposto por FROST *et al*. (1998) (ANEXO 06).

As placas (Immulon 2, Dynatech Laboratories) de fundo chato foram adsorvidas com o extrato antigênico (item 2.1) (uma placa contendo antígeno solúvel e outra particulado) com quatro concentrações diferentes: 250ng, 500ng, 1000ng e 1500ng diluídos em solução tampão carbonato (0,05M, com pH 9,6). Os soros dos coelhos foram diluídos em tampão de incubação (PBS; 0,25% caseína; 0,05% de tween 20) nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600. A imunoglobulina anti-IgG de coelho, conjugada com a enzima peroxidase (Sigma Chemical Company, A-0545) foi adicionada nas diluições de 1:2500 e 1:5000. A atividade enzimática foi revelada usando-se como substrato a solução de ortofenilenodiamino (OPD) diluído em tampão de substrado (4mg de OPD + 10,5mL de tampão citrato pH 5,0 + 4μL de H_2O_2). A reação foi interrompida utilizando-se 50μL de H_2SO_4 a 5%.

A leitura das absorbâncias do teste ELISA foi feita, imediatamente após a parada da reação, no leitor de micro placa (BIORAD Model 550) utilizando-se um filtro com comprimento de onda de 492nm.

2.5. CONJUGAÇÃO DOS ANTICORPOS COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA

Os soros obtidos das sangrias de prova e de produção foram conjugados com isotiocianato de fluoresceína para utilização na imunofluorescência direta. O fluxograma abaixo sintetiza as etapas de produção dos anticorpos fluorescentes.

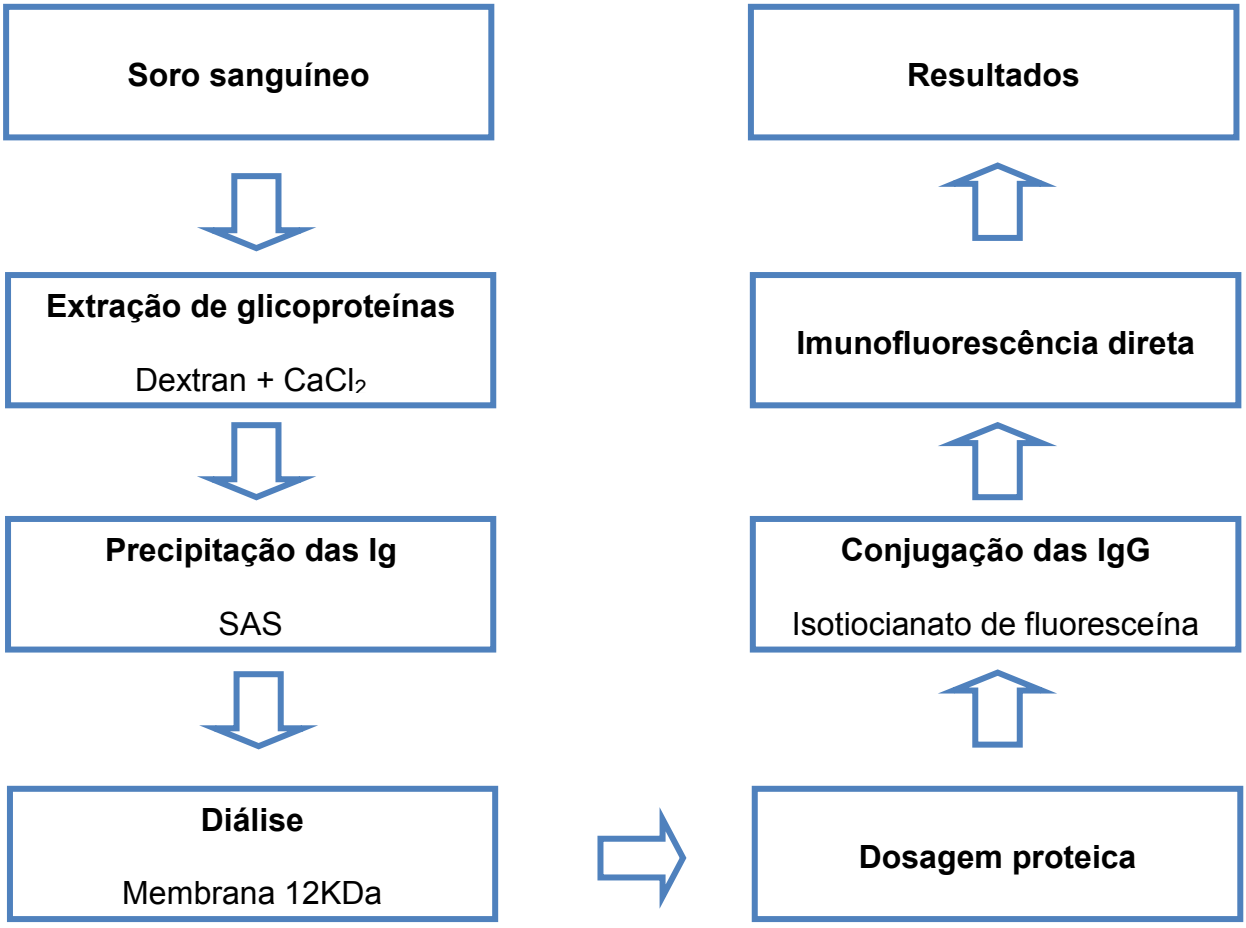

FIGURA 01- FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO E CONJUGAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Cryptosporidium* COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA.

2.5.1. Extração de Glicoproteínas (ANEXO 07) (PENHA, 2007)

Após a titulação dos anticorpos produzidos pelos animais foi feito um *pool* dos soros colhidos nos dias 30, 45 e 60 e centrifugados a 3700 g durante cinco minutos à 4°C. O sobrenadante obtido foi separado, medido e dextran a 5% foi adicionado ao soro, respeitando a proporção de 1,25mL de dextran para 25mL do

soro, gota a gota, sob agitação em temperatura ambiente. A mistura foi deixada em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente, agitando-a a cada 10 minutos. Após o tratamento com dextran, 1% da solução de $CaCl_2$ a 11,1% foi adicionado, gota a gota, sob agitação em banho de gelo. A mistura foi deixada em repouso por 30 minutos em banho de gelo. Em seguida a mistura foi centrifugada a 14.400g por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e acondicionado em câmara fria. O precipitado contendo gordura foi descartado.

2.5.2. Precipitação das Imunoglobulinas com Sulfato de Amônio Saturado (SAS) (ANEXO 08)

O volume do sobrenadante obtido na etapa 2.5.1 foi medido e o mesmo volume de PBS foi adicionado. Em seguida foi adicionado o dobro do volume do sobrenadante de SAS (pH 7,6) para que ocorresse a precipitação das imunoglobulinas. A mistura foi deixada em agitação magnética lenta por uma hora em temperatura ambiente. Após a precipitação das imunoglobulinas G, a amostra foi centrifugada durante 30 minutos a 14.800g à 4°C.

2.5.3. Diálise

Foi utilizada uma membrana (Sigma, Dialysis Sacks) que permite um limite de exclusão de 12 kDa para retenção da proteína e liberação do sulfato de amônio. As diálises foram feitas durante três dias em um frasco com dois litros de PBS pH, 7,2, com trocas a cada 12 horas. Após esta etapa, as imunoglobulinas foram centrifugadas a 3.700g durante 15 minutos à 4°C para remover as impurezas.

2.5.4. Conjugação do Anticorpo Policlonal com FITC e Preparo do Conjugado para Testes de Imunofluorescência Direta (ANEXO 09)

O material dialisado foi centrifugado a 1.330g por 15 minutos a 4°C para separar as imunoglobulinas. Para a quantificação proteica foi utilizada a espectrofotometria na região ultravioleta. O equipamento usado foi o Espectrofotômetro metrolab 1700, onde as leituras de absorbância foram realizadas por detecção com raios U.V., em comprimento de ondas de 260nm e 280nm. A fórmula proposta por PETERSON (1983) foi usada para o cálculo da concentração proteica:

Y= (1,55 x leitura 280nm) - (0,76 x leitura 260nm)
Y x diluição utilizada = resultado (concentração de proteína em mg/mL)

O FITC foi dissolvido em tampão carbonato/bicarbonato e adicionado, gota a gota, na suspensão de imunoglobulinas na proporção de 1,6µg para cada 1mg em temperatura ambiente sob agitação magnética lenta. A mistura permaneceu sob agitação magnética lenta durante duas horas tomando-se o cuidado para não formar espuma.

A amostra foi então submetida à cromatogafia de exclusão molecular em uma coluna de Sephadex G 25 (Sigma Aldrich) (FIGURA 02). Após a hidratação do Sephadex com água ultrapura, esta foi lavada cinco vezes com salina borato e transferida para a coluna de filtração em gel. O volume da coluna foi calculado respeitando-se a proporção de 20mL de gel para 1mL de conjugado. A fração inicial (conjugado) foi separada e dialisada em salina borato por 48 horas, sendo então centrifugada a 1.330g, por 10 minutos a 4ºC, aliquotada e armazenada a -20ºC.

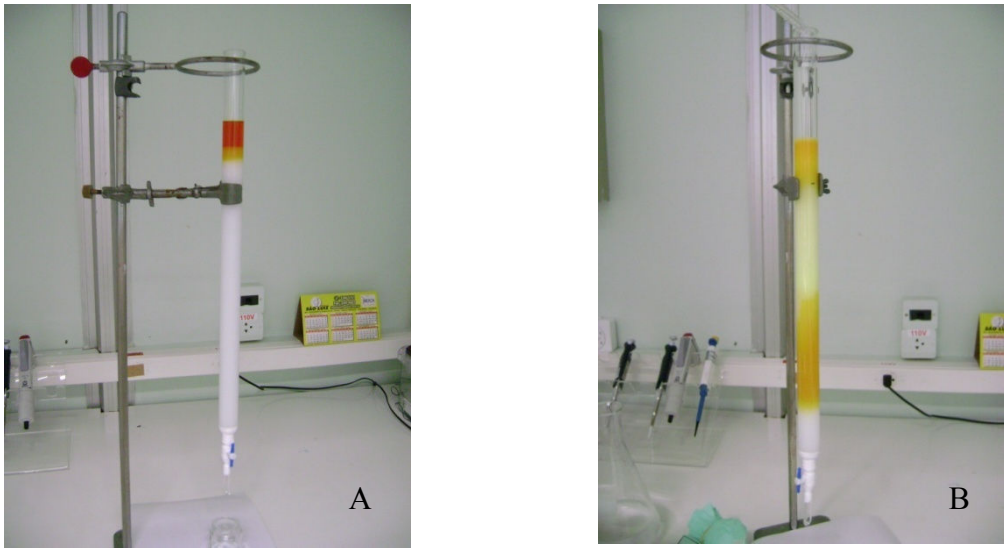

FIGURA 02: COLUNA DE CROMATOGRAFIA POR FILTRAÇÃO EM GEL UTILIZADA PARA A PURIFICAÇÃO DO CONJUGADO ANTI-*Cryptosporidium parvum*. INÍCIO (A) E FINAL (B) DA PURIFICAÇÃO.

2.6. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

Após a produção dos anticorpos policlonais em coelhos e sua sequente conjugação com FITC, estes foram testados para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* através da reação de imunofluorescência direta (IFD) (ANEXO 10).

As lâminas contendo 10 *spots* foram adsorvidas com sete quantidades diferentes de oocistos (1.000; 500; 100; 50; 10; 5 e 1), diluídos em PBS (1X, pH 7,2), em quintuplicata, com o objetivo de determinar a sensibilidade da técnica. Para determinar a especificidade da técnica, duas lâminas contendo quatro quantidades diferentes de cistos de *Giardia* spp. (1000; 500; 100 e 50) foram preparadas, também em quintuplicata. Após a adição dos oocistos as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente durante 15 minutos para sedimentação dos oocistos e em seguida foi levada à estufa em temperatura de 37°C durante uma hora, ou até que ficasse completamente seca. Em seguida a lâmina foi colocada em cubas protegidas da luz e congelada a -20°C até sua utilização.

Para a realização da IFD foram preparadas quatro lâminas específicas com oocistos de *Cryptosporidium parvum* e duas com cistos de *Giardia duodenalis*.

Cada quantidade de oocisto testada foi feita em quintuplicata e apenas a que continha um único oocisto foi feita repetindo-se 10 vezes.

No momento da utilização as lâminas foram retiradas do freezer e deixadas em estufa a 37°C por 10 a 15 minutos ou até seu completo descongelamento. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS e o conjugado, diluído em azul de Evans, foi adicionado nas seguintes diluições: puro; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 e 128 vezes e as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C, durante 30 minutos. Após a realização de três lavagens com PBS as lâminas foram colocas em estufa a 37°C durante 10 minutos para secagem.

3. RESULTADOS

3.1. CONCENTRAÇÃO PROTEICA DO EXTRATO ANTIGÊNICO E IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Os oocistos submetidos ao ultrassom foram observados em microscópio óptico com aumento de 400X e contraste de fase para verificar a eficiência do processo de sonicação para ruptura da membrana. O material foi centrifugado e a dosagem proteica obtida foi de 2,5mg/mL para o antígeno solúvel, enquanto que o antígeno particulado (sedimento) apresentou 1,7mg/mL.

3.2. TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS

A cinética de produção de anticorpos específicos contra *Cryptosporidium* foi testada pela técnica de ELISA. Para tanto, foram comparadas as concentrações proteicas do extrato antigênico para fazer a adsorção da placa e as diluições do soro e do conjugado. Para realizar a adsorção das placas, o melhor resultado obtido foi quando se utilizou 500ng de proteína/mL e as melhores diluições do soro e conjugado foram, respectivamente, 1:100 e 2500.

O controle negativo da reação foi feito utilizando-se o soro colhido do animal no dia 0 do experimento, antes da inoculação do extrato antigênico. Como controle positivo, foi utilizado o soro do animal colhido 45° dia do experimento, conforme proposto por FERNANDES *et al.* (2007).

O ponto de corte (*cut off*) foi determinado fazendo-se a média da absorbância dos controles negativos mais dois desvios padrões e foi de 0,100. Dessa forma, amostras com absorbância igual ou maior que 0,100 foram consideradas positivas.

Os soros dos coelhos colhidos ao longo do experimento foram titulados e todos apresentaram absorbâncias maiores que 0,100 demonstrando a produção de anticorpos contra *Cryptosporidium* (ANEXO 11 e FIGURA 3).

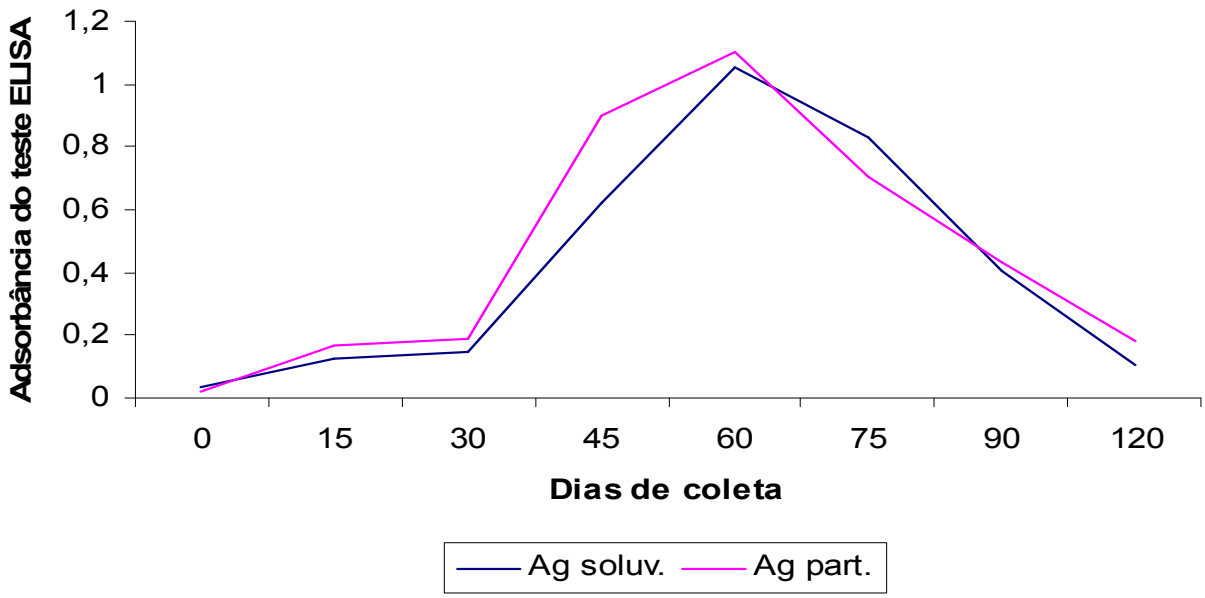

FIGURA 03: COMPARAÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA REAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO, UTILIZANDO O TESTE ELISA, DISTRIBUÍDAS AO LONGO DAS COLHEITAS DE SANGUE, REALIZADAS A CADA 15 DIAS, ENTRE OS ANIMAIS IMUNIZADOS COM OS DOIS EXTRATOS ANTIGÊNICOS (SOLÚVEL EPARTICULADO) DE *Cryptosporidium parvum.*

3.3. CONJUGAÇÃO DOS ANTICORPOS COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA (FITC) E REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

Uma vez confirmada a produção de anticorpos policlonais contra *Cryptosporidium*, estes foram conjugados com FITC e testados posteriormente na IFD.

Todas as amostras que continham de 1000 a 100 oocistos foram positivas (FIGURA 04), enquanto que as que possuíam de 50 a 10 oocistos foram positivos em dois e negativos em três. Apenas uma amostra contendo cinco oocistos foi positiva e nenhuma contendo um oocisto foi positiva (TABELA 01).

No teste de especificidade que foi realizado para verificar se existia ou não reação cruzada com cistos de *Giardia*, em nenhum dos círculos foi verificada a reação positiva.

TABELA 01: RESULTADOS DAS REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS CONTENDO 10^3 A 1 OOCISTOS.

Quantidade de oocistos	N° de amostras positivas/total amostras
1000	5/5
500	5/5
100	5/5
50	2/5
10	2/5
5	1/5
1	0/10

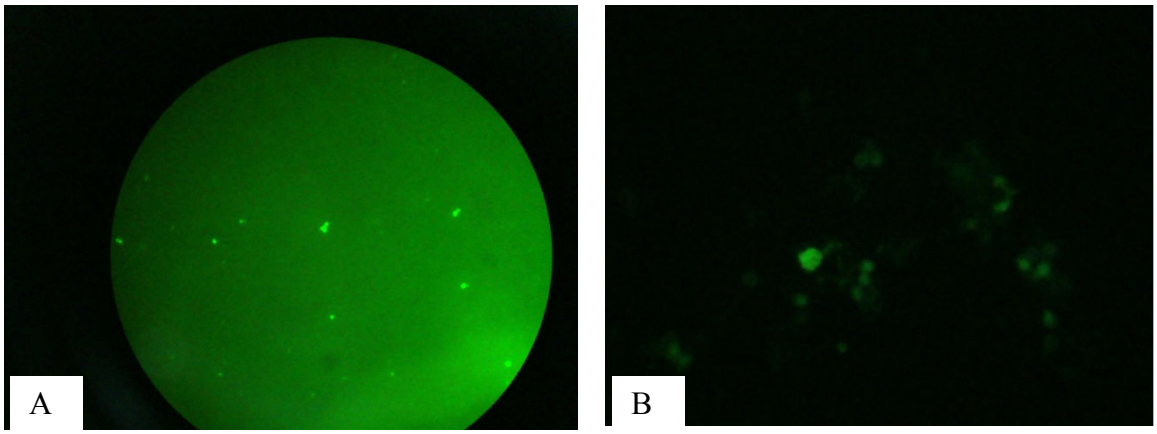

FIGURA 04- OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* DETECTADOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA UTILIZANDO ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*Cryptosporidium* PRODUZIDOS EM COELHOS. AUMENTOS DE 200 X (A) E 400 X (B).

4. DISCUSSÃO

A identificação de oocistos de *Cryptosporidium* presentes em água é difícil, uma vez que estes podem ser encontrados em quantidades pequenas, necessitando de técnicas que os concentrem e posteriormente os identifiquem corretamente. Outro ponto relevante reside na dificuldade do reconhecimento destes parasitos, dificuldades estas devido aos fatores ambientais adversos que podem alterar a morfologia dos cistos e oocistos (CARTUSIO-NETO, 2004).

O presente trabalho padronizou uma reação de imunofluorescência direta através da produção de anticorpos policlonais anti-*Cryptosporidium* spp com o objetivo de diminuir essas dificuldades citadas, além do que o Brasil não tem produção de anticorpos poli ou monoclonais contra *Cryptosporidium,* o que dificulta as companhias de Saneamento inserir o monitoramento contra este parasito.

Os animais escolhidos para a sensibilização com extrato antigênico do protozoário foram coelhos por apresentarem um tamanho maior em relação aos outros animais de laboratório, e consequentemente produzirem uma quantidade maior de sangue. A opção em se produzir anticorpos policlonais ao invés de monoclonais foi pela maior facilidade e viabilidade, esperando-se com isso, observar a eficácia dessa técnica em identificar a presença dos oocistos em amostras de água e então, numa próxima etapa, produzir anticorpos monoclonais, uma vez que estes apresentam uma maior especificidade e são utilizados nos diferentes *kits* comerciais existentes.

Para a purificação das imunoglobulinas foi feita a cromatografia de exclusão molecular, ou seja, todas as imunoglobulinas produzidas pelo animal foram separadas e conjugadas com FITC. A separação das imunoglobulinas G (IgG) das imunoglobulinas M (IgM) foi feita pela utilização da concentração do sulfato de amônio saturado escolhida, que provocou apenas a precipitação das IgG (ANEXO 08) A reação poderia ser melhorada se tivesse sido utilizada a cromatografia de afinidade, porém essa técnica exige uma grande quantidade de antígeno, inviabilizando a sua execução.

As reações cruzadas podem ocorrer nos testes de imunofluorescência direta realizados em amostra de água, uma vez que a presença de um grande número de partículas fluorescentes pode causar dificuldades durante a confirmação microscópica de oocistos suspeitos (QUINTERO-BETANCOURT *et al.*, 2002).

Neste trabalho foi testada a reatividade dos anticorpos anti-*Cryptosporidium* com cistos de *Giardia* e não foi verificada reação cruzada com este protozoário. Apesar da grande diferença morfológica entre os oocistos e os cistos, a intenção do teste de especificidade foi justamente observar a presença de possíveis componentes presentes nos cistos que pudessem ser reconhecidos pelos anticorpos anti-*Cryptorporidium.*

A reatividade cruzada destes anticorpos pode ocorrer com diferentes tipos de algas presentes na água. RODGERS *et al.* (1995) testaram 54 algas e encontraram reatividade com 24 delas, sendo que duas, *Navicula minima e Synechococcus elongatus*, apresentaram uma morfologia e fluorescência semelhantes àquelas encontradas nos oocistos. Esse teste não foi realizado em neste experimento porque não foi possível encontrar as algas nos mananciais uma vez que a presença destas algas não ocorre durante todo o ano. BULL *et al* (1998) testaram a reatividade de anticorpos policlonais anti-*Cryptosporidium* com esporocistos de *Monocystis* presentes em fezes e também verificaram reação cruzada.

Embora existam algumas reações inespecíficas, a IFD é uma boa alternativa para detectar a contaminação ambiental por oocistos de *Cryptosporidium* (CARTUSIO-NETO, 2004). O desenvolvimento de IFD que utiliza anticorpos monoclonais contra proteínas específicas de determinadas espécies possibilita a identificação dessas espécies e consequentemente os hospedeiros responsáveis pela contaminação, como foi observado por STURBAUM *et al.* (2008) que encontraram diferenças antigênicas em proteínas isoladas de *C. parvum* e *C. hominis* responsáveis pela adesão e invasão. Dessa forma essa metodologia poderá ser utilizada também para a detecção de espécies e não apenas do gênero *Cryptosporidium*.

5. CONCLUSÃO

- As três imunizações realizadas nos coelhos foram suficientes para a produção de anticorpos policlonais contra oocistos de *Cryptosporidium parvum* confirmado pelo teste de *ELISA.*

- A imunofluorescência direta padronizada permitiu a detecção de até cinco oocistos em 20% das amostras.

- Não houve reação cruzada com cistos de *Giardia* nas amostras testadas.

6. REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BULL, S.; CHALMERS, R.; STURDEE, A.P.; CURRY, A.; KENNAUGH, J. Cross-reaction of na anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. **Veterinary Parasitology,** v. 77, p. 195-197, 1998.

CARTUSIO-NETO, R. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. **Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),** Campinas, São Paulo, 2004, 87p.

FERNANDES, N. L. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PINTO, S. B.; MINOZZO, J. C.; OLIVEIRA, C. A. L. Resposta imune-humoral e celular em bovinos da raça Nelore imunizados com extrato de larvas (L2 e L3) de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 789-795, 2007.

FROST, F.J.; CRUZ DE LA, A.A.; MOSS, D.M.; CURRY, M.; CALDERON, R.L. Comparisons of ELISA and Western blot assays for detection of *Cryptosporidium* antibody. **Epidemiology and Infection,** v. 121, p. 205-211, 1998.

HASHIMOTO, A.; SUGIMOTO, H.; MORITA, S.; HIRATA, T. Genotyping of single *Cryptosporidium* oocysts in sewage by semi-nested PCR and direct sequencing, **Water Research,** v. 40, p. 2527-2532, 2006.

PENHA, T.R. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti-fragmento Fc de IgG de bovino. **Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná (UFPR),** Curitiba, PR, Brasil, 2007, 98p.

PETERSON, G.L. Determination of total protein. **Methods Enzymol,** v. 91, p. 95-119, 1983.

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

RODGERS, M.R.; FLANIGAN, D.J. JAKUBOWSKI, W. Identification of algae which interfere with the detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and a method for alleviating this interference. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61 (10), p. 3759-3763, 1995.

STURBAUM, G.D.; SCHAEFER, D.A.; JOST, B.H.; STERLING, C.R.; RIGGS, M.W. Antigenic differences within the *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporiium parvum* surface proteins P23 and GP900 defined by monoclonal antibody reactivity. **Molecular & Biochemical Parasitology,** v. 159, p. 138-141, 2008.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1997), Method 1622 – *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. U.S. Environmental Protection Agency Publication, 821-R-97-023. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1999). **Method 1623—*Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA**. U.S. Environmental Protection Agency Publication,. 821/R-99-006. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis *in:* ORTEGA, Y. R. **Foodborne Parasites.** Springer US, 2006, 108p.

CAPÍTULO IV

MÉTODOS CONVENCIONAIS DE TRATAMENTO DA ÁGUA: EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. AVALIADA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), NESTED PCR (nPCR) E POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

MÉTODOS CONVENCIONAIS DE TRATAMENTO DA ÁGUA: EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. AVALIADA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), NESTED PCR (nPCR) E POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

Resumo: A eficiência dos processos de tratamento de água pode variar de um local para outro, de acordo com características físico-químicas da mesma e de outros fatores ambientais. Por esta razão, as companhias de saneamento precisam padronizar e adaptar protocolos de tratamento que sejam mais convenientes às necessidades locais. Diante disto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de três coagulantes (Sulfato de Alumínio, Policloreto de Alumínio e Cloreto Férrico) usados para tratamento de água, na remoção de oocistos de *Cryptosporidium*, em água bruta da Estação de Tratamento de Água Iguaçu (ETA Iguaçu), localizada no município de São José dos Pinhais, região metropolitana de Curitiba. Ensaios em *Jartest*® utilizando os três coagulantes em diferentes concentrações foram realizados com água contaminada com quantidades de oocistos variando de 0,1 até 100 oocistos/mL. A eficiência de remoção foi avaliada por técnica de PCR e imunofluorescência direta, aplicadas em materiais de diferentes etapas do processo de tratamento. Nos resultados foram observados oocistos, tanto em material floculado, indicando a retenção do parasito. Também foi encontrado no material filtrado, demonstrando a ineficiência da remoção destes no processo de filtração. A técnica de PCR mostrou-se como uma ótima ferramenta na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* presentes em amostras de água, uma vez que foi possível encontrar positividade em amostras contendo uma concentração de apenas 0,1 oocisto/mL de água bruta, além de ser uma técnica de fácil execução. Quando se utilizou a imunofluorescência direta não foi possível encontrar amostras positivas.

Palavras-chave: remoção de oocisto *Cryptosporidium*, coagulação.

CONVENTIONAL METHODS OF WATER TREATMENT: REMOVAL EFFICIENCY OF *Cryptosporidium* ssp. OOCYSTS EVALUATED BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND *DIRECT* IMMUNOFLUORESCENCE (IFD)

Abstract: The efficiency of water treatment process can vary from place to place according to their physical-chemic characteristics and other environmental factors. For this reason, the water treatment plans need to standardize and adapt protocols of treatment that are more convenient for the local demands. In view of this, the present work has the objective of evaluate the efficiency of three coagulants (Aluminium Sulfate, PAC and Ferric Chloride) used for water treatment in the *Cryptosporidium* oocyst removal in raw water from Iguaçu water treatment plans (ETA Iguaçu) located at São José dos Pinhais, in the metropolitan area of Curitiba city. Jartest® assays using the three coagulants in different concentrations were performed by employing contaminated water with oocysts varying from 0.1 to 100 oocysts/mL. The removal efficiency was evaluated by PCR technique and direct *i*mmunofluorescence applied in materials of different steps of the treatment process. In the results we observed oocysts in the flocculated material indicating parasite retention as well as in filtered material, demonstrating the efficiency oocysts removal in the filtration process. Despite being an easy procedure technique, the PCR indicated an efficient tool for *Cryptosporidium* oocysts detection in water samples since positivity was verified in samples with a concentration of only 0.1 oocysts/mL of raw water. When the direct immunofluorescence was used it was not possible to find positive samples

Keywords: *Cryptosporidium* oocysts removal, coagulation.

1. INTRODUÇÃO

Os processos convencionais de tratamento de água contribuem para reduzir os micro-organismos presentes na água, embora sua eficiência não seja a mesma para todos os protozoários (BETANCOURT e ROSE, 2004). Com relação ao *Cryptosporidium*, os processos de tratamento de água de superfície são capazes de reduzir 3 a 4 logs de oocistos, porém os parasitos são capazes de passar pela etapa de filtração e resistir ao tratamento por cloração e outros desinfetantes (SMITH et al., 2006; PEREIRA *et al.,* 2008).

Na etapa de coagulação/floculação, são adicionadas à água substâncias que, sob agitação, promovem a aglomeração de partículas, que se condensam em flocos ou agregados. Sais de alumínio (como sulfato de alumínio e policloreto de alumínio) e sais de ferro (cloreto férrico), ou mesmo polímeros orgânicos são as substâncias coagulantes utilizadas no tratamento de água (BETANCOURT e ROSE, 2004). Em estações de tratamento de água que utilizam a coagulação/floculação, é essencial proceder à dosagem do coagulante a ser adicionado. Neste procedimento o processo é realizado em escala de bancada, a fim de determinar as dosagens corretas do coagulante, visando obter água de melhor qualidade com a utilização de menor quantidade do produto.

Na etapa de decantação o material floculado é separado, por meio da sedimentação, o que possibilita a remoção das partículas da água a ser posteriormente filtrada. A filtração é a etapa final para retenção de partículas, cistos e oocistos de protozoários no sistema de distribuição de água (BETANCOURT e ROSE, 2004). A água deve passar por uma estrutura porosa, geralmente composta por um leito de areia, ou ainda, uma combinação de antracita mais areia fina (Di BERNARDO E DANTAS, 2005).

Entre os processos de filtração a filtração rápida é a mais difundida no Brasil, mas é crescente o uso de sistema de filtração direta (FAGUNDES, 2006). A filtração lenta é um processo altamente efetivo na remoção de oocistos de *Cryptosporidium*, mesmo quando submetidos a condições operacionais extremas – alta turbidez e alta densidade de oocistos – o processo manteve-se eficiente e estável quanto à qualidade da água tratada (HELLER *et al.,* 2004).

O desenvolvimento e avaliação de métodos de tratamento de água, portanto, devem ser contínuos, buscando propor sistemas alternativos e aprimorar os

convencionais, a fim de 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.

Dessa forma este trabalho teve como objetivo avaliar a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* durante o processo convencional de tratamento da água comparando-se três coagulantes comumente usados nas ETAs.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS DE PARASITOS:

No dia da realização dos experimentos, os oocistos foram contados em câmara de Neubauer e foram preparadas soluções com concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 oocistos/mL e inoculados na água bruta proveniente da Estação de Tratamento da Água Iguaçu (ETA Iguaçu).

2.2. ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO:

O tratamento convencional de água foi simulado em escala laboratorial utilizando o aparelho Jartest®, para testar a capacidade de retenção dos oocistos do parasito. A água obtida, nas diferentes etapas do processo, foi avaliada para a presença ou ausência do parasito por meio da técnica de PCR e Imunofluorescência Direta (IFD).

A água bruta foi colhida na Estação de Tratamento de Água - Iguaçu (ETA Iguaçu) localizada no município de São José dos Pinhais, região metropolitana de Curitiba. No momento da coleta da água, os valores de turbidez, pH, temperatura, alcalinidade e cor da água bruta foram fornecidos pelos funcionários da ETA. O nome do coagulante utilizado no momento da coleta, assim como a sua concentração foram anotados para servirem de parâmetro para se realizar os ensaios laboratoriais em Jartest® (TABELA 01).

O fluxograma a seguir sintetiza as etapas dos ensaios (FIGURA 01).

TABELA 01: DATAS DAS COLETAS DE ÁGUA BRUTA NA ETA-IGUAÇU E PARÂMETROS DA ÁGUA NO MOMENTO DA COLETA.

Data Coleta da água: 15/04/2008 **Condições do tempo:** Nublado

Coagulante	**Conc. (ppm)**	**pH**	**Temperatrura**	**Cor**	**Turbidez**	**Alcalinidade**
$Al_2(SO_4)_3$	19	6,3	12ºc	100	18	16

Data Coleta da água: 16/04/2008 **Condições do tempo:** Chuvoso

Coagulante	**Conc. (ppm)**	**pH**	**Temperatrura**	**Cor**	**Turbidez**	**Alcalinidade**
$Al_2(SO_4)_3$	21,5	6,2	18ºc	100	15	16

Data Coleta da água: 10/08/2008 **Condições do tempo:** Nublado

Coagulante	**Conc. (ppm)**	**pH**	**Temperatrura**	**Cor**	**Turbidez**	**Alcalinidade**
PAC	17	6,2	14ºc	120	20	16

Data Coleta da água: 13/08/2008 **Condições do tempo:** Chuvoso

Coagulante	**Conc. (ppm)**	**pH**	**Temperatrura**	**Cor**	**Turbidez**	**Alcalinidade**
PAC	17	6,2	14ºc	85	13,2	16

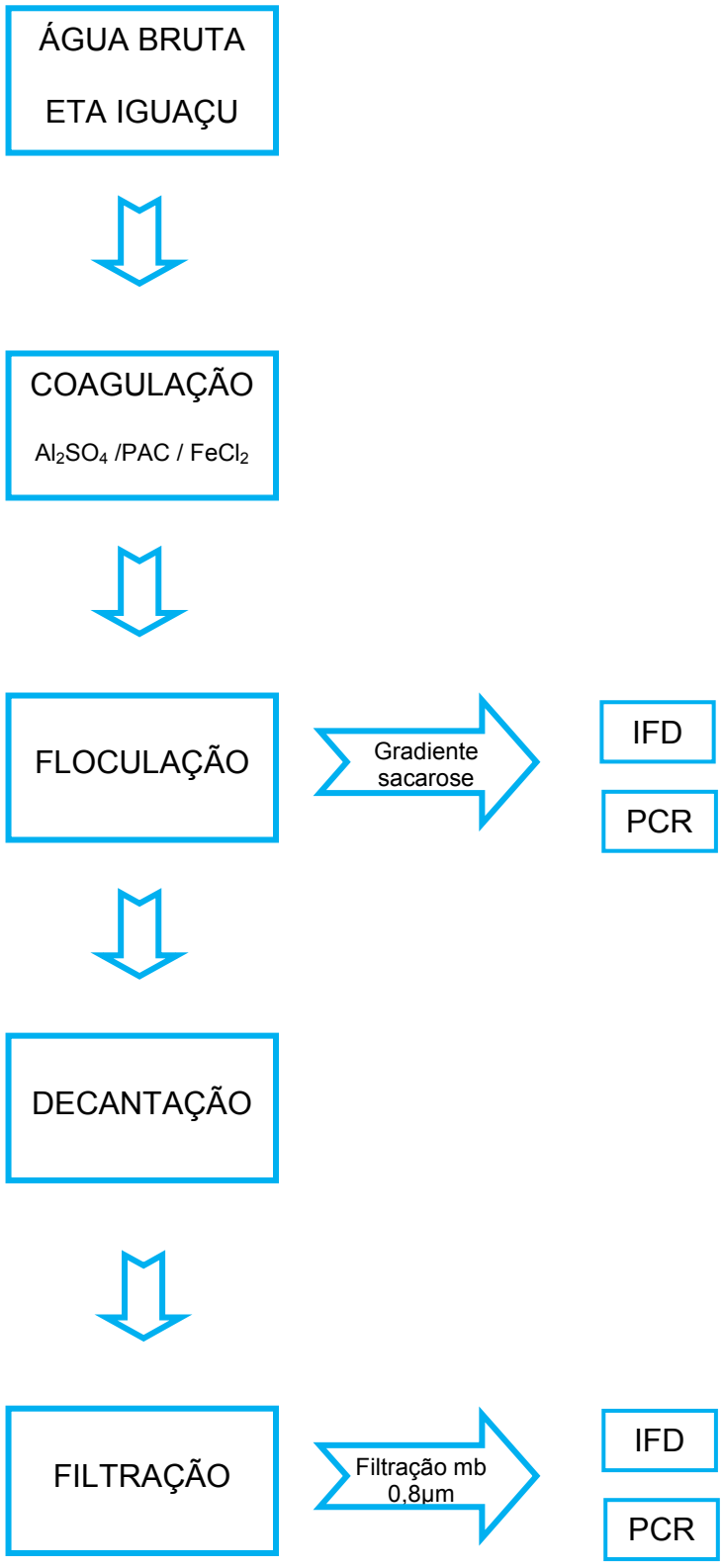

FIGURA 01- ETAPAS DO ENSAIO EM JARTEST E FILTRAÇÃO DA ÁGUA CONTAMINADA EXPERIMENTALMENTE COM OOCISTOS DE *Cryptosporidium* E PESQUISA DO PARASITO.

Nesses experimentos foram utilizadas três substâncias para coagulação e foram mensurados os parâmetros de turbidez, cor e pH. Os ensaios foram realizados em aparelho de Jartest® com capacidade de 2L e em triplicata.

Os coagulantes testados foram sulfato de alumínio $Al_2(SO_4)_3$, nas concentrações de: 21; 21,5; 23,5; 27,5; 29,5 e 31,5ppm; policloreto de alumínio (PAC) nas concentrações de: 17, 19, 21 e 23ppm; e cloreto férrico ($FeCl_2$), nas concentrações de 17, 19 e 21ppm.

A concentração dos coagulantes foi escolhida de acordo com a utilizada na ETA no momento da coleta da água, dessa forma foram testadas concentrações acima e abaixo da utilizada na ETA. Com a concentração do coagulante e a alcalinidade da água, cálculos foram realizados para verificar a necessidade de se utilizar um alcalinizante. Para tanto, seguiu-se a seguinte fórmula:

ppm x fator (TABELA 02) - alcalinidade da água =

Valores maiores que zero necessitaram de alcalinizante, e a dose foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

mL = ppm x 1,6 ÷ fator x L, onde:
mL: volume em mL a adicionar;
ppm: mg de alcalinizante necessário
1,6: fator de conversão carbonatos $\rightarrow$ bicarbonatos
L: volume do jarro em litros

Após a adição do alcalinizante (quando necessário) e do coagulante foram adicionados os oocistos de *Cryptosporidium* e em seguida utilizou-se o seguinte ciclo:

Coagulação	-	20s	-	100rpm
Floculação	-	20 min	-	45rpm
Decantação	-	20 min	-	-

Uma parte do material sobrenadante obtido da decantação foi separado e sua cor, turbidez e pH aferidos.

TABELA 02: FATOR DE CORREÇÃO PARA DETERMINAR A NECESSIDADE OU NÃO DE UTILIZAÇÃO DE ALCALINIZANTE, DOS DIFERENTES COAGULANTES.

Produto (1,0ppm)	ppm alcalinidade cálcio/sódio pH < 8,2/8,3
Sulfato de alumínio	0,45/0,48
Sulfato férrico	0,75/0,80
Cloreto férrico	0,92/0,98
PAC	0,23/0,28

2.3. FILTRAÇÃO RÁPIDA DA ÁGUA EM COLUNA DE AREIA

Para a realização da filtração foram usados filtros de laboratório (fabricados pelo mesmo produtor do Jartest®), acoplados ao equipamento Jartest® , e preenchido com areia com granulometria variável entre 0,3 a 1,45mm. Após a coagulação e a decantação, o material sobrenadante, aproximadamente 1L, foi filtrado e sua turbidez, cor e pH aferidos.

2.4. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Cryptosporidium* NO MATERIAL DECANTADO

A água proveniente da etapa anterior foi filtrada em aparato de filtração da Millipore (Millipore Filter Holder part # 4), contendo membrana filtrante de acetato celulose de diâmetro 47mm e porosidade 0,8µm com o intuito de concentrar possíveis oocistos presentes. A filtração ocorreu sob pressão negativa de 10 a 15 cmHg e após, a membrana foi retirada e depositada em embalagem plástica com PBST, sendo então friccionada dentro da embalagem e o eluato centrifugado a 600g por 10 minutos. O sedimento final foi suspenso em 2mL de tampão de lise (*ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit*) para extração de DNA e congelado a -80°C até ser submetido ao processo de extração de DNA e Reação de Imunofluorescência Direta.

2.5. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Cryptosporidium* NO MATERIAL FLOCULADO

O material floculado, aproximadamente 1L, foi transferido para cálices de sedimentação onde permaneceu sedimentando durante duas horas. O sobrenadante foi aspirado e o sedimento foi submetido à purificação usando gradiente de sacarose (ANEXO 01) e o material obtido foi congelado (-80°C) até ser submetido ao processo de extração de DNA e Reação de Imunofluorescência Direta.

2.6. EXTRAÇÃO DE DNA DE *CRYPTOSPORIDIUM* UTILIZANDO O KIT COMERCIAL: *CHARGESWITCH® GDNA MINI TISSUE KIT*.

O material resultante da lavagem da membrana de celulose e da purificação do lodo pela sacarose foram eluídos em tampão de lise foram submetidos a 15 ciclos de congelamento (-80 ºC) e descongelamento (55ºC). As demais etapas foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

2.7. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Para a realização da PCR foram utilizados os *primers* AWA995F/ AWA1206R (AWAD-EL-KARIEM *et al.*, 1994). As amostras negativas foram novamente submetidas à PCR, dessa vez utilizando os *primers* XIAF/ XIAR e XIA2F e XIA2R (XIAO *et al*, 1999). Todas as PCRs foram feitas conforme padronização descrita no capítulo II.

2.8. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 1,6%. Após a corrida eletroforética o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) por 20 minutos, as bandas foram observadas em UV e fotodocumentadas.

2.9. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD) (ANEXO 10)

As lâminas foram adsorvidas com o material resultante da lavagem da membrana de celulose e da purificação do lodo pela sacarose em triplicata. Em cada lâmina foi colocado um controle positivo e um controle negativo. A IFD foi realizada de acordo com a padronização realizada no capítulo III.

3. RESULTADOS

3.1. ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO/FILTRAÇÃO:

As Tabelas 03 a 05 mostram os resultados referentes ao pH, turbidez e cor da água no momento da coleta na estação de tratamento e após ensaios no laboratório.

TABELA 03: ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO/FILTRAÇÃO UTILIZANDO SULFATO DE ALUMÍNIO a 1% COMO COAGULANTE.

Amostra	Contam. (ooc./mL)	Quant. Coagulante		Material floculado (lodo)	Água decantada			Água filtrada		
		ppm	mL	pH	pH	Cor	Turb	pH	Cor	Turb
1	CN	27,5	4,7	6,5	6,4	15	5,22	6,8	5	0,59
2	0,1	27,5	5,5	6,3	6,1	15	2,51	6,4	<5	0,46
3	1	27,5	5,5	6,6	6,3	10	1,41	6,4	5	0,54
4	10	27,5	5,5	6,6	6,5	10	3,72	6,6	0	0,46
5	100	27,5	5,5	6,3	6,4	5	1,61	6,7	0	0,51
6	0,1	29,5	5,9	6,3	6,1	15	3,60	6,4	<5	0,57
7	1	29,5	5,9	6,7	6,2	10	1,14	6,5	<5	0,32
8	10	29,5	5,9	6,2	6,1	5	0,61	6,6	<5	0,63
9	100	29,5	5,9	6,2	6,1	5	1,12	6,5	<5	0,45
10	1	31,5	6,3	6,2	5,9	5	1,36	6,4	<5	0,49
11	10	31,5	6,3	6,0	5,9	5	1,78	6,4	<5	0,65
12	100	31,5	6,3	5,9	5,7	<5	1,10	6,1	<5	0,53

Quando o sulfato de alumínio foi utilizado, os valores de pH, turbidez e cor da água filtrada variaram de 6,1 a 6,8; 0,32 a 0,65 e 0 a 5 respectivamente, permanecendo dentro dos limites aceitos.

TABELA 04: ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO/FILTRAÇÃO UTILIZANDO POLICLORETO DE ALUMÍNIO (PAC) 1% COMO COAGULANTE.

Amostra	Contam. (ooc/mL)	Quant. Coagulante		Material floculado (lodo)	Água decantada			Água filtrada		
		Ppm	mL	pH	pH	Cor	Turb	pH	Cor	Turb
1	CN	17	3,4	7,6	7,6	20	4,88	8,3	15	3,72
2	0,1	17	3,4	6,7	6,6	15	3,36	7,0	5	0,64
3	1	17	3,4	6,8	6,9	10	4,08	7,0	5	0,97
4	10	17	3,4	6,8	6,9	10	3,42	7,0	5	0,53
5	CN	19	3,8	6,9	7,9	15	3,25	8,2	15	2,65
6	0,1	19	3,8	7,0	7,6	10	2,18	7,2	5	1,13
7	1	19	3,8	6,8	6,9	15	2,73	7,2	10	1,68
8	10	19	3,8	7,0	6,8	5	1,32	7,1	5	0,80
9	CN	21	4,2	7,9	7,5	10	1,58	8,1	10	1,60
10	0,1	21	4,2	6,8	7,0	5	1,41	7,3	5	0,77
11	1	21	4,2	7,0	6,9	5	1,22	7,0	5	0,55
12	10	21	4,2	6,9	6,7	10	2,05	6,7	5	0,43
13	0,1	23	4,6	6,9	6,8	5	0,63	7,1	5	0,54
14	1	23	4,6	6,9	7,0	10	0,91	7,0	5	0,41
15	10	23	4,6	6,9	6,9	5	1,43	7,1	0	0,37

Nos experimentos em que se utilizou o PAC, os valores de pH, turbidez e cor da água filtrada variaram de 6,7 a 8,3; 0,37 a 3,72 e 0 a 15 respectivamente. Em cinco situações o valor da turbidez foi superior ao recomendado pela portaria 518 que é de 1,0 após o processo de filtração rápida.

TABELA 05: ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO/FILTRAÇÃO UTILIZANDO CLORETO FÉRRICO 1% COMO COAGULANTE.

Amostra	Contam	Quant. Coagulante		Quant. Alcalin.	Material Floculado (lodo)	Água decantada			Água filtrada		
	Ooc/mL	Ppm	mL	mL	pH	pH	Cor	Turb	pH	Cor	Turb
1	CN	17	3,2	1,06	5,0	4,4	60	15,23	4,9	0	0,41
2	0,1	17	3,2	1,06	4,9	5,7	15	4,50	5,7	0	0,20
3	1	17	3,2	1,06	4,9	4,4	50	9,77	4,7	0	0,18
4	10	17	3,2	1,06	5,0	4,5	70	14,73	5,6	0	0,41
5	CN	19	3,8	4,20	4,7	4,6	60	16,55	5,6	0	0,31
6	0,1	19	3,8	4,20	5,3	5,6	10	1,39	5,5	5	0,37
7	1	19	3,8	4,20	4,8	4,7	30	6,60	5,2	0	0,60
8	10	19	3,8	4,20	4,9	5,6	55	11,7	5,3	5	0,82
9	CN	21	4,2	7,30	5,3	5,4	20	3,45	5,8	5	1,03
10	0,1	21	4,2	7,30	6,2	5,8	10	1,32	5,9	5	0,56
11	1	21	4,2	7,30	5,5	5,1	20	2,17	5,8	5	1,09
12	10	21	4,2	7,30	5,3	6,7	50	6,0	5,9	5	0,33

Quando se utilizou o cloreto férrico como coagulante, os valores de pH, turbidez e cor da água filtrada variaram de 4,7 a 5,9; 0,18 a 1,09 e 0 a 5 respectivamente.

O alcalinizante foi necessário somente nos ensaios em que se utilizou o cloreto férrico como coagulante.

3.2. DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* NAS DIFERENTES ETAPAS DO TRATAMENTO DA ÁGUA

Em nenhum dos experimentos foi possível detectar a presença de oocistos pela técnica de imunofluorescência direta (tabelas 06 a 08, figura 02). A FIGURA 02 demonstra o resultado positivo para a presença de oocistos quando utilizada a PCR como técnica de detecção. Todas as amostras negativas para o par de *primers* AWA foram novamente negativas quando a técnica foi repetida utilizando-se os *primers*

XIAO 1F e XIAO 2R, que apresentam uma maior sensibilidade, e também apresentaram resultado negativo.

Quando foi utilizado o coagulante sulfato de alumínio, oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados tanto no material floculado (lodo) quanto na água filtrada, e em todas as concentrações do coagulante e nas diferentes quantidades de oocistos utilizadas para a contaminação da água. Somente nas concentrações de 27,5 e 31,5ppm houve uma remoção dos oocistos após a filtração.

Nos experimentos em que se utilizou o policloreto de alumínio como coagulante foi possível encontrar oocistos no material floculado quando a concentração do coagulante foi de 23ppm e na água filtrada quando a concentração do coagulante foi de 17 e 21 ppm.

Com a utilização do cloreto férrico foi possível encontrar oocistos apenas no material floculado quando utilizado nas concentrações de 19 e 21 ppm.

TABELA 06: DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* PELAS TÉCNICAS DE IFD E PCR QUANDO UTILIZADO O SULFATO DE ALUMÍNIO 1% COMO COAGULANTE.

Amostra	Coagulante	Contaminação	Material floculado (lodo)		Água filtrada		
	Ppm	Oocistos/mL	PCR	IFD	Turb	PCR	IFD
1	27,5	CN	-	-	0,41	-	-
2	27,5	0,1	+	-	0,20	+	-
3	27,5	1	+	-	0,18	+	-
4	27,5	10	+	-	0,41	+	-
5	27,5	100	+	-	0,31	-	-
6	29,5	0,1	+	-	0,37	+	-
7	29,5	1	+	-	0,60	+	-
8	29,5	10	+	-	0,82	+	-
9	29,5	100	+	-	1,03	+	-
10	31,5	1	+	-	0,56	-	-
11	31,5	10	+	-	1,09	-	-
12	31,5	100	+	-	0,33	-	-

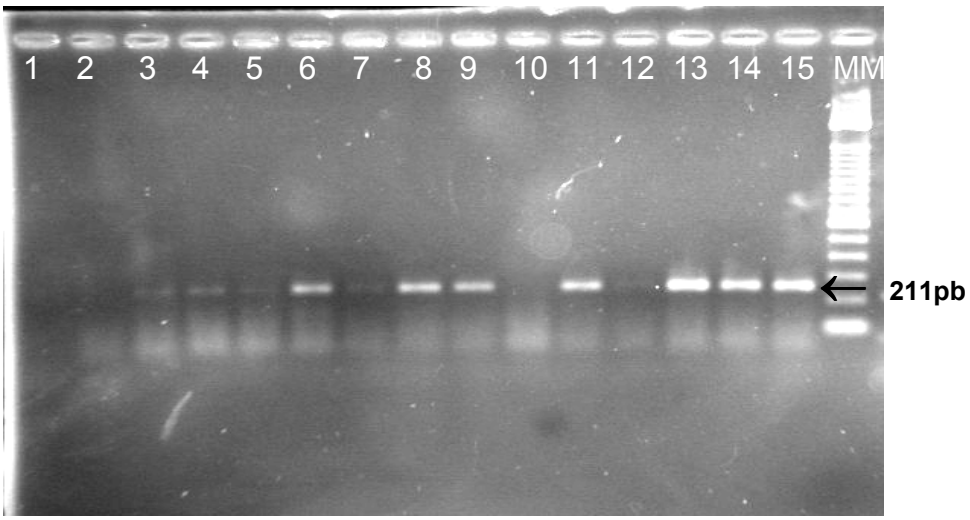

FIGURA 02 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%) MOSTRANDO A PRESENÇA DE DNA DE *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUBMETIDAS AOS ENSAIOS EM JARTEST® QUANDO UTILIZADO O COAGULANTE SULFATO DE ALUMÍNIO E TÉCNICA DE PCR UTILIZANDO OS INICIADORES AWA995F/AWA1206R. CANALETA 1: CONTROLE NEGATIVO; CANALETAS DE 2 A 15 AMOSTRAS CONTAMINADAS COM OOCISTOS/CONCENTRAÇÃO DO COAGULANTE EM PPM (0,1/19; 0,1/21,5; 0,1/23,5; 0,1/27,5; 0,1/29,5; 1/27,5; 10/27,5; 100/27,5; 1/29,5; 10/29,5; 100/29,5; 1/31,5; 10/31,5; 100/31,5 RESPECTIVAMENTE); 16 MARCADOR MOLECULAR (100PB)

TABELA 07: DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* PELAS TÉCNICAS DE IFD E PCR QUANDO UTILIZADO O POLICLORETO DE ALUMÍNIO (PAC) 1% COMO COAGULANTE.

Amostra	Coagulante	Contaminação	Material floculado		Água filtrada	
	Ppm	Oocistos/mL	PCR	IFD	PCR	IFD
1	17	0,1	-	-	+	-
2	17	1	-	-	+	-
3	17	10	-	-	+	-
4	19	0,1	-	-	-	-
5	19	1	-	-	-	-
6	19	10	-	-	-	-
7	21	CN	-	-	-	-
8	21	0,1	-	-	-	-
9	21	1	-	-	-	-
10	21	10	-	-	-	-
11	23	0,1	-	-	-	-
12	23	1	+	-	-	-
13	23	10	-	-	-	-

TABELA 08: DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* PELAS TÉCNICAS DE IFD E PCR QUANDO UTILIZADO O CLORETO FÉRRICO 1% COMO COAGULANTE.

Amostra	Coagulante	Contaminação	Material floculado (lodo)		Água filtrada	
	Ppm	Oocistos/mL	PCR	IFD	PCR	IFD
1	17	0,1	-	-	-	-
2	17	1	-	-	-	-
3	17	10	-	-	-	-
4	19	0,1	-	-	-	-
5	19	1	-	-	-	-
6	19	10	+	-	-	-
7	21	CN	-	-	-	-
8	21	0,1	-	-	-	-
9	21	1	+	-	-	-
10	21	10	-	-	-	-

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho comparou a eficiência de três coagulantes na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp em água. Quando foi utilizado o coagulante sulfato de alumínio, os valores de pH, cor e turbidez da água filtrada permaneceram dentro dos limites exigidos pela legislação para água tratada (TABELA 03). A manutenção do pH dentro dos valores referidos é importante porque influencia de forma direta a atuação dos coagulantes, interferindo nos processos de higienização da água e consequentemente na remoção de cistos e oocistos dos protozoários.

Oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados no material floculado e em todas as concentrações do coagulante e nas diferentes quantidades de oocistos utilizadas para a contaminação da água. A portaria 518 do Ministério da Saúde (2004) recomenda que a turbidez após a filtração fique abaixo de 0,5UT para a remoção eficaz dos oocistos de *Cryptosporidium.* Porém, nesses experimentos, houve uma variação na turbidez após a filtração de 0,32 a 0,65UT e na cor, de 0 a 5 e a remoção dos oocistos não esteve correlacionado à turbidez, uma vez que, somente quando foi utilizada uma concentração de coagulante de 31,5ppm (com 10 e 100 oocistos/mL e turbidez de 0,65 e 0,53UT respectivamente) e 27,5ppm (com 100 oocistos/mL e turbidez de 0,51) os oocistos foram removidos após a filtração (TABELA 03).

Isso demonstra que um fator importante na remoção dos oocistos é a quantidade ideal do coagulante, que no caso do sulfato de alumínio nas condições em que a água se apresentava foi de 31,5ppm, já que foi a única concentração que houve a remoção de oocistos em todas as quantidades de parasitos. Esses dados demonstram a importância da avaliação periódica da concentração do coagulante para permitir maior remoção dos parasitos.

Em trabalho realizado por KEEGAN *et al.* (2008) foi observada uma alta remoção de oocistos para três concentrações de alumínio (40, 70 e 100mg/L). Esses autores observaram que após atingir a quantidade ideal de coagulante, o seu aumento não melhorava a remoção dos oocistos. Isto demostra a importância em se encontrar a quantidade ótima de coagulante que seja capaz de remover os oocistos, mas que não seja além do necessário, pois isto aumentaria os custos do tratamento da água e também as possibilidades de intoxicação da população por resíduos dessas substâncias.

Alguns valores de turbidez foram superiores ao recomendado (1,0UT), nos experimentos em que utilizou o PAC, possivelmente pela quantidade insuficiente do coagulante (17, 19 e 21ppm), uma vez que, com o aumento dessa concentração (23ppm), os valores diminuíram, ficando dentro dos limites aceitáveis pela legislação (TABELA 04).

O único coagulante que tornou necessária adição de um alcalinizante foi o cloreto férrico. Apesar da adição do alcalinizante seguindo o critério estabelecido pelas estações de tratamento da água (TABELA 02) alguns pH ficaram abaixo do recomendado (6,0 a 9,5) (TABELA 05).

A portaria 518 recomenda que os valores de turbidez fiquem abaixo de 0,5UT para que ocorra a remoção dos oocistos de *Cryptosporidium*, associando, dessa forma, a turbidez e a remoção dos oocistos. BERINO (2004) analisou a água de quatro rios formadores do Lago Guaíba, Rio Grande do Sul e encontrou correlação entre a turbidez e a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium.* Os presentes experimentos não demonstraram essa correlação, uma vez que a remoção de oocistos ocorreu independente dos valores de turbidez encontrados na água filtrada. Diversos autores relatam que não encontraram correlação com a remoção, como MACHADO (2006) que analisou águas superficiais da região metropolitana de Recife e encontrou amostras positivas em águas que apresentavam turbidez elevada, chegando até 73,9 UT, demonstrando que a interferência na técnica de identificação pela presença de resíduos é relativa. Trabalho realizado por KEEGAN *et al.* (2008) também não encontraram relação entre diminuição da turbidez e remoção de oocistos do parasito.

Nos experimentos em que se utilizou o policloreto de alumínio como coagulante foi possível encontrar oocistos no material floculado quando a concentração do coagulante foi de 23ppm (com 1 oocisto/mL e 0,91UT). Na água filtrada foi possível encontrar oocistos quando a concentração do coagulante foi de 17ppm (0,1 oocisto/mL e 0,64UT; 1 oocisto/mL e 0,97UT e 10 oocistos/mL e 0,53UT) e 21 ppm (10 oocistos/mL e 0,43). Esses resultados também não apresentaram uma correlação entre a remoção de oocistos e a turbidez, uma vez que esta variou de 0,91 a 4,88UT no material decantado e de 0,41 a 2,65UT na água filtrada (TABELA 02). HASHIMOTO *et al.* (2001) em experimentos realizados no Japão utilizando coagulates de alumínio também encontraram oocistos de *Cryptosporidium* em todas as amostras de água bruta e em 35% das amostras filtradas.

Com a utilização do cloreto férrico foi possível encontrar oocistos apenas no material floculado quando utilizado nas concentrações de 19ppm (10 oocistos/mL e 11,7UT) e 21 ppm (1 oocisto/mL e 2,17UT). Na água filtrada, quando a turbidez variou de 0,18 a 1,09UT, não foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium*, demonstrando uma eficiente remoção desses durante o processo de tratamento da água (TABELA 05). A utilização do cloreto férrico como coagulante recebe a crítica de que ele é corrosivo e produz oxidação nos encanamentos. Todavia, há que se levantar a discussão se não seria viável a substituição dos encanamentos por materiais que não sejam corrosíveis. Se este coagulante se confirmar como excelente no processo de remoção de *Cryptosporidium* em grande escala, os prós e os contras de sua utilização devem ser avaliados.

5. CONCLUSÃO

- O coagulante sulfato de alumínio foi capaz de remover oocistos de *Cryptosporidium* spp. após a filtração somente em três experimentos, quando utilizados concentrações de 27,5 e 31,5ppm;

- Quando foi utilizado o coagulante policloreto de alumínio a remoção após a filtração foi observada quando utilizou-se concentrações de 17 e 21ppm;

- Quando o coagulante cloreto férrico foi utilizado, não foram observados oocistos de *Cryptosporidium* na água filtrada;

- Não foi possível correlacionar a turbidez com a remoção de oocistos para os coagulantes PAC, sulfato de alumínio e cloreto férrico.

6. REFERÊNCIAS

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

BERINO, E.C.S. Ocorrência e detecção de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em águas brutas de abastecimento de formadores do lago Guaíba. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS),** Porto Alegre, RS, Brasil, 2004, 155p.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 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**, 141(59), p. 266.

DI BERNARDO L., DANTAS A.D. **Métodos e técnicas de tratamento da água**, 2ed. RiMma editora, 792p., 2005.

FAGUNDES, A.P. Remoção de oocistos de *Cryptosporidium* por filtração direta – Influência de alguns aspectos operacionais. **Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília (UnB),** Brasília, DF, Brasil, 2006, 148p.

HASHIMOTO, A.; HIRATA, T.; KUNIKANE, S. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in a conventional water purification plant. **Water Science and Technology,** v. 43 (12), p. 89-92, 2001.

HELLER, L.; BASTOS, R.K.X.; VIEIRA, M.B.C.M.; BEVILACQUA, P.D.; de BRITO, L.L.A.; MOTA, S.M.M.; OLIVEIRA, A.A.; MACHADO, P.M.; SALVADOR, D.P.; CARDOSO, A.B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Saúde,** v. 13 (2), 2004.

KEEGAN, A.; DAMINATO, D.; SAINT, C.P.; MONIS, P.T. Effect of water treatment processes on *Cryptosporidium* infectivity. **Water Research,** v. 42, p. 1805-1811, 2008.

MACHADO, E.C.L. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife/Pernambuco. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),** Recife, PE, Brasil, 2006, 141p.

PEREIRA, J. T., COSTA, A., SILVA, M. B.O.; SCHUCHARD W.; OSAKI, S. C., CASTRO, E. A., PAULINO, R. C., THOMAZ-SOCCOL, V. Comparing the Efficacy of Chlorine, Chlorine Dioxide, and Ozone in the Inactivation of *Cryptosporidium parvum* in Water from Parana State, Southern Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. , v.151, p. 464-473, 2008.

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,** v. 22, p. 161-167, 2006.

XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R.C.; FAYER, R.; LAL, A.A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 65, p. 3386-3391, 1999.

CAPÍTULO V

PESQUISA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* EM ÁGUA BRUTA PROVENIENTE DE QUATRO ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DA ÁGUA DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ.

PESQUISA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* EM ÁGUA BRUTA PROVENIENTE DE QUATRO ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DA ÁGUA DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ.

Resumo: *Cryptosporidium* spp. é um protozoário responsável por surtos de gastroenterites em humanos tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. A resistência de sua forma infectante a desinfetantes usualmente utilizados nas estações de tratamento de água torna sua detecção extremamente importante. Com o objetivo de pesquisar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água e em lodo resultante do tratamento da água foram realizadas três coletas de amostras em quatro estações de tratamento de água (ETA) da região metropolitana de Curitiba. O material coletado foi água na entrada da estação de tratamento e lodo resultante do processo de tratamento. As 12 amostras avaliadas foram colhidas no período de dezembro de 2008 a janeiro de 2009. A água foi tratada em escala laboratorial (*JarTest*®) utilizando o sulfato de alumínio como coagulante, seguida de filtração (filtro de areia seguido de filtração em membrana de celulose). As membranas de celulose foram lavadas com PBST e encaminhadas para extração de DNA e Imunofluorescência Direta (IFD). O sedimento resultante da floculação foi submetido a processos de recuperação de oocistos. Para isto foram usadas as técnicas de concentração pela sacarose e em seguida foi feita a extração de DNA e preparo das lâminas para avaliação da presença por IFD. O lodo proveniente da ETA foi processado pelo método de Yanko, 1987 e o sedimento resultante foi dividido em duas alíquotas uma para avaliação da presença de protozoários e helmintos (avaliado em câmara de Sedwik Rafter) e a outra alíquota foi processada para a extração de DNA e IFD. Pelas técnicas de Yanko e Imunofluorescência Direta em nenhuma das 12 amostras analisadas foi possível detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Quando foi utilizada a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) detectou-se a presença de oocistos em lodo de água em duas (50%) estações de tratamento de água (ETAs). Esses resultados revelam a ocorrência desse protozoário na água de abastecimento da região metropolitana de Curitiba indicando um risco à Saúde Pública. Também indica a necessidade de monitoramento quanto a presença deste patógeno em água tratada. A detecção do protozoário utilizando a técnica de PCR demonstra que essa técnica pode ser uma ferramenta importante na detecção ambiental de *Cryptosporidium* spp.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp., PCR, IFD, Água, Abastecimento Público.

ANALYSIS OF WATER USED FOR HUMAN CONSUMPTION IN FOUR WATER TREATMENT PLANS FROM METROPOLITAN REGION OF CURITIBA, PARANÁ.

Abstract: *Cryptosporidium* spp. is a protozoan responsible for gastroenteritis outbreaks in humans both in developed and developing countries. Its resistance to disinfectants commonly used in water treatment plants (WTP) makes their detection extremely important. In order to investigate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water and in sludge resulting from the water treatment process, three sample collections were performed in four WTP in the metropolitan area of Curitiba-Brazil. The material collected consisted of water at the entrance of the water treatment plant and sludge resulting from the treatment process. The 12 samples tested were collected from December 2008 to January 2009. The water was treated at laboratory scale (*JarTest* ®), followed by filtration (sand filter followed by filtration through cellulose membranes). The cellulose membranes were washed with PBST and sent for DNA extraction and Direct Immunofluorescence (DIF). The sediment resulting from flocculation was submitted to oocyst recovery processes. For this, techniques of concentration by sucrose were used and then DNA extraction was performed, and slides were prepared in order to evaluate its presence by DIF. The sludge from the WTP was processed by the Yanko-1987 method, and the resulting sediment was divided into two aliquots: one aliquot was used to evaluate the presence of protozoa and helminths (assessed in a Sedwik Rafter chamber), and another aliquot was processed for DNA extraction and DIF. By the Yanko and Direct Immunofluorescence techniques, in none of the 12 samples analyzed was it possible to detect *Cryptosporidium* spp. When the polymerase chain reaction (PCR) technique was used, the presence of oocysts in sludge water was detected in two (50%) WTP. These results reveal the occurrence of this protozoan in the water supply system of the metropolitan area of Curitiba-Brazil indicating a public health risk. It also indicates the need for monitoring the presence of this pathogen in water. The detection of the protozoan using the PCR technique shows that this technique can be an important tool for detecting *Cryptosporidium* spp in the environment.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., PCR, DIF, Water, Public Water Supply

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água de abastecimento é um problema que vem aumentando em todo o mundo (PLUTZER *et al.,* 2008; FAYER, 2009). O parasito pode causar no hospedeiro um quadro de diarreia aquosa, com cólica abdominal, náusea, dor de cabeça e anorexia. A infecção é especialmente grave em indivíduos imunocomprometidos, tais como pacientes HIV positivos, submetidos à quimioterapia ou a transplante de órgão e também em crianças (ARROWOOD e STERLING , 1989).

Este agente se destaca pela elevada incidência de casos e devido às suas características de resistência aos tratamentos convencionais de água e capacidade de permanência dos oocistos no meio ambiente. Nos Estados Unidos e outros países desenvolvidos, a proteção das águas para abastecimento contra a veiculação dos protozoários parasitos emergentes, sobretudo *Cryptosporidium parvum*, é uma das maiores preocupações relativas ao abastecimento de água para o consumo humano (FAGUNDES, 2006).

Em vários países desenvolvidos, o monitoramento de protozoários como *Giardia* e *Cryptosporidium* tem sido realizado de forma sistemática e os surtos ocorridos tem sido notificados e sua origem identificada. Já no Brasil, a preocupação com a ocorrência de protozoários de veiculação hídrica está representada na Portaria 518 do Ministério da Saúde, editada em 2004. Esta Portaria recomenda a "Ausência de Patógenos como enterovírus, *Cryptosporidium* e *Giardia*", no capítulo referente ao padrão de potabilidade da água.

A detecção e a enumeração de oocistos de *Cryptosporidium* em água são importantes para se evitar futuros surtos, como os que ocorrem em todo o mundo (CAREY *et al.,* 2006). As pesquisas da contaminação da água no Brasil ainda são escassas, porém os trabalhos existentes vem demonstrando a presença de oocistos desse protozoário em água de abastecimento e indicam a necessidade de um monitoramento, no Brasil, da presença dos protozoários nos diversos meios, visando identificar fatores que conduzam à sua ocorrência (HELLER *et al.*, 2004). Destacam-se pesquisa da contaminação ambiental por *Cryptosporidium* nos estados de São Paulo (DIAS-JUNIOR, 1999; MULLER, 1999; RÉ, 1999; GAMBA *et al.*, 2000; FRANCO *et al.*, 2001; FARIAS *et al.*, 2002; FRANCO e CARTUSIO NETO, 2002; GOMES *et al.*, 2002; ALMEIDA, 2004; CARTUSIO-NETO e FRANCO, 2004;

HACHICH *et al.,* 2004; OLIVEIRA, 2005; BRANCO, 2006; ARAÚJO, 2008), Rio Grande do Sul (BERINO, 2004; FALCCHI, 2006) e Pernambuco (BORGES *et al.,* 2007).

No Paraná, FALAVIGNA-GUILHERME (2009) pesquisou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* na água da cidade de Maringá e da Terra Indígena Ivaí através da técnica de filtração em membrana e encontrou 26,66% e 14,3% de positividade respectivamente. NISHI *et al.* (2009) pesquisaram a presença de *Cryptosporidium* spp. em água bruta e tratada utilizada para abastecimento público no município de Maringá e encontraram uma positividade de 26,6% (média de 0,15 oocistos/L) e 0% respectivamente.

Na região de Curitiba não existem trabalhos demonstrando a ocorrência desse importante patógeno na água, dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em quatro estações de tratamento da água, na região Metropolitana de Curitiba, Paraná.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. LOCAIS DAS COLETAS

Atualmente a Região Metropolitana de Curitiba é composta por 26 municípios (FIGURA 01) e tem uma área de 15.478km^2, caracterizando-se em sua porção central por uma macroestrutura urbana composta pela conurbação de Curitiba e áreas urbanizadas de municípios vizinhos, entremeadas por extensas áreas de mananciais, de preservação ambiental e de características rurais (COMEC, 1999).

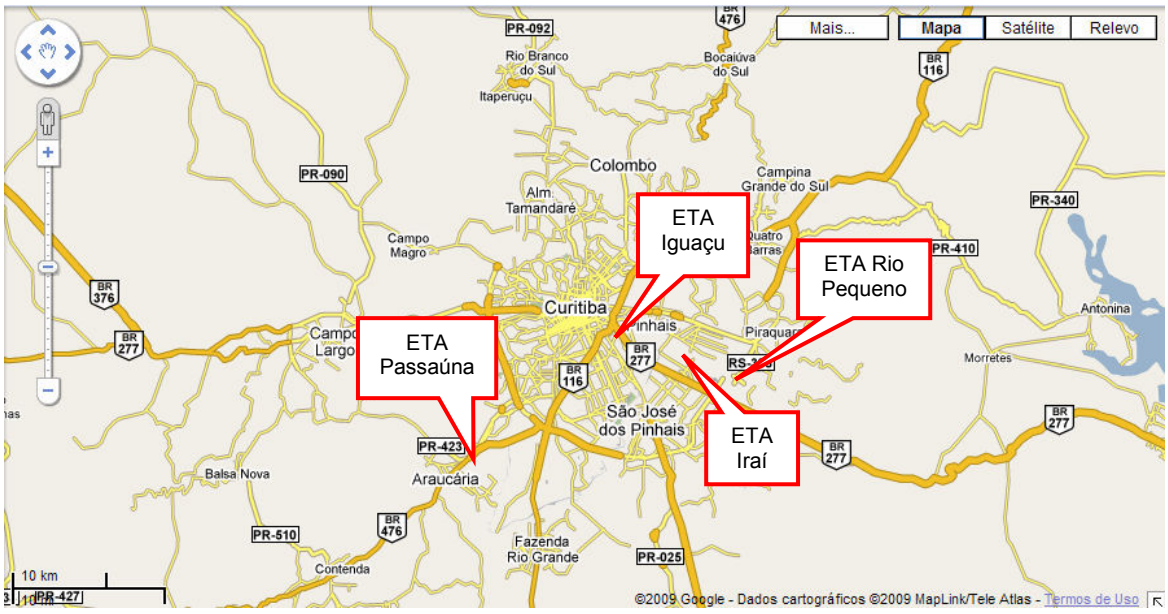

FIGURA 01 - A. LOCALIZAÇÃO DAS QUATRO ETAS EM CUJA ÁGUA E LODO DE ÁGUA FOI PESQUISADA A PRESENÇA DE *Cryptosporidium*
FONTE: Google maps

De acordo com IBGE (2000) a população da Região Metropolitana de Curitiba é de 2.725.629 habitantes. Desta população, 70% são abastecidos pelas captações do Rio Iguaçu e afluentes e pelos Reservatórios de Piraquara e Iraí e os habitantes da região oeste (22% do total) são abastecidos pelo Reservatório do Passaúna e os 8% restantes são provenientes do aquífero Karst.

Desta forma foram escolhidas as quatro estações de tratamento de água (ETA) da região metropolitana de Curitiba: ETA Iguaçu, ETA Iraí, ETA Rio Pequeno

e ETA Passaúna para avaliar a presença ou não de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Para pesquisar a presença deste patógeno foram colhidos amostras de água bruta e lodo produzido pelos flotadores.

2.2. COLETAS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

2.2.1. Coleta das Amostras

Durante o período de dezembro de 2008 a janeiro de 2009 foram realizadas três coletas de água bruta e lodo resultante do tratamento de água, com intervalos de 15 dias. Aproximadamente 20L de água bruta foram colhidas, na entrada da ETA e acondicionadas em frascos plásticos previamente limpos e 1L de lodo foi colhido diretamente do local de descarga e acondicionado em frascos plásticos previamente limpos. Imediatamente após as coletas a água e o lodo foram encaminhados ao laboratório de parasitologia molecular da Universidade Federal do Paraná para processamento e pesquisa de oocistos ou DNA do protozoário.

FIGURA 1- B. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUA – ETA IGUAÇU, LOCAL DE COLETA DE ÁGUA

FIGURA 1- C. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUA – ETA IGUAÇU- LOCAL DE COLETA DO LODO DE ÁGUA

2.2.2. Ensaios de Coagulação/Floculação/Sedimentação

Os ensaios foram realizados em aparelho Jartest® com capacidade para três repetições em amostras de 2L cada. Como coagulante foi utilizado o sulfato de alumínio e a concentração usada foi a utilizada na ETA no momento da coleta da água. Com a concentração do coagulante e a alcalinidade da água, cálculos foram realizados para verificar a necessidade de se utilizar um alcalinizante, já descritos no capítulo anterior.

Após a adição do alcalinizante (quando necessário) e do coagulante utilizou-se o mesmo ciclo citado também no item 2.2 do capítulo anterior.

Uma parte do material sobrenadante obtido da decantação foi separado e sua cor, turbidez e pH aferidos.

O material obtido da coagulação e floculação no Jartest®, assim como o recuperado no processo de filtração em membrana de celulose do produto de decantação foram submetidos à pesquisa de oocistos conforme protocolos descritos no capítulo IV.

A Figura 02 sumariza as etapas do experimento.

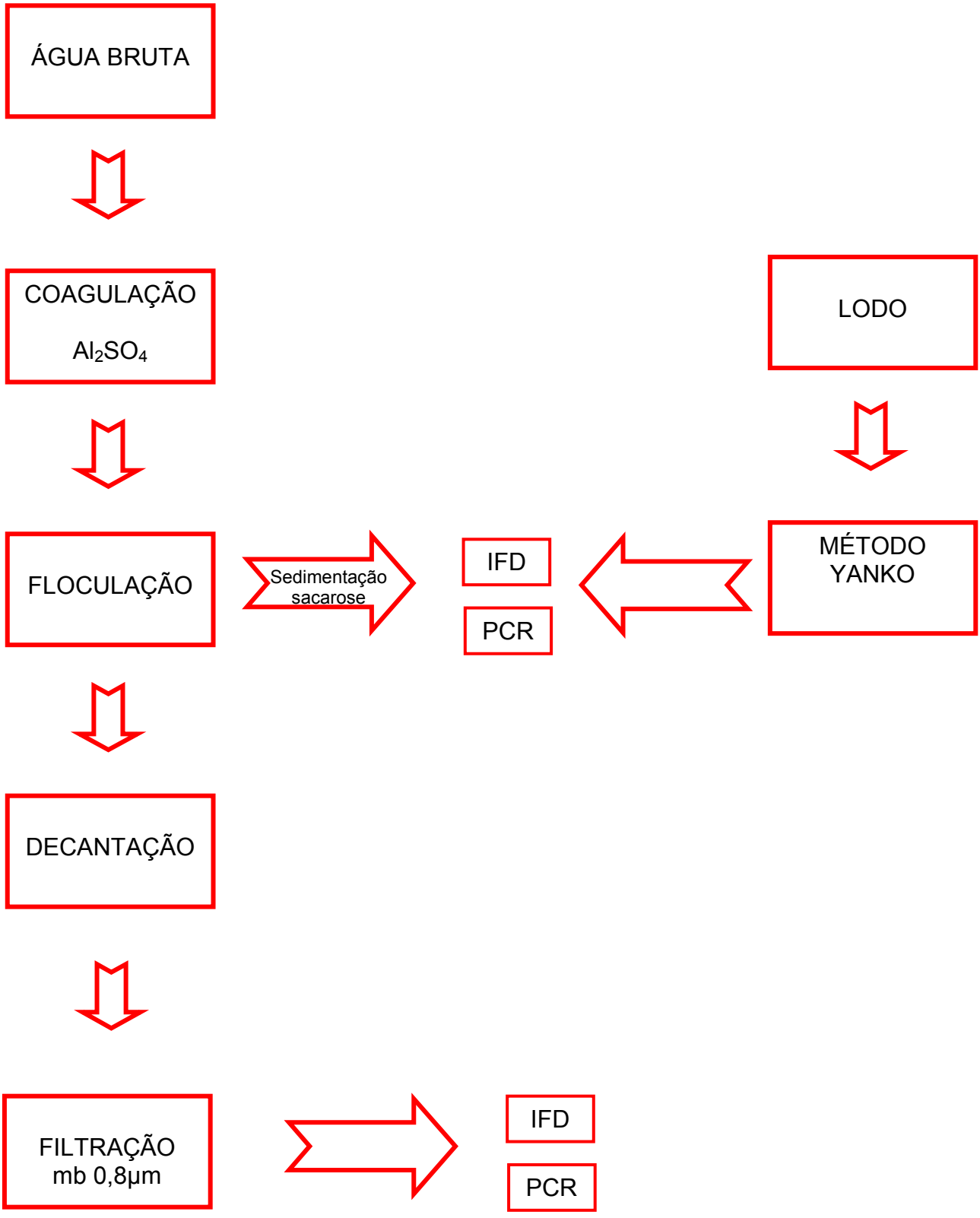

FIGURA 02- ETAPAS DO ENSAIO EM JARTEST COM ÁGUA COLHIDA NAS ETAS E PESQUISA DO PARASITO.

2.2.3. Método de Yanko (1992) (ANEXO 12)

Devido à grande quantidade de impurezas encontradas no lodo produzido nos flotadores e a consequente possibilidade de encontrar diferentes parasitos, o método de Yanko foi o escolhido para o processamento desse material.

O lodo colhido nas estações de tratamento de água eram bastante espessos, dessa forma foi feita uma diluição, utilizando Tween 80 na proporção de 0,1% (v/v), em seguida foi homogeneizado, filtrado e deixado para sedimentação *overnight.* O sobrenadante foi aspirado e o sedimento passado para tubos de centrífuga e centrifugados a 3000 rpm por cinco minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento suspenso com solução de sulfato de zinco d=1,20 e centrifugados a 3000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi misturado com o mesmo volume de água destilada e deixado sedimentando por três horas ou *overnight*. O sobrenandante foi aspirado e passado para tubos de centrífuga e centrifugados a 1400rpm por três minutos. Os sedimentos foram combinados em único tubo e centrifugados a 1400rpm por três minutos. O sedimento foi suspenso em 7mL de solução de álcool-ácido (H_2SO_4 0,1N em ETOH 35%) e em seguida foram adicionados 2mL de éter; os tubos foram invertidos várias vezes após tampá-los, ventilando cada vez. Em seguida os tubos foram centrifugados a 1800rpm por três minutos, o sedimento foi então suspenso em 4mL de tampão de lise e congelado até a realização da IFD e PCR.

A PCR e a IFD foram realizadas de acordo as padronizações descritas nos capítulos II e III respectivamente. Para a PCR foram utilizados os *primers* AWA995F/ AWA1206R e XIAF/ XIAR e XIA2F e XIA2R. As amostras positivas foram novamente submetidas à PCR, utilizando os *primers* específicos para *C. parvum/C. hominis* (CRY15F/CRY9R).

3. RESULTADOS

3.1. CONCENTRAÇÃO DA ÁGUA BRUTA

A Tabela 01 mostra os resultados referentes ao pH, turbidez e cor da água no momento da coleta na estação de tratamento e após ensaios no laboratório.

TABELA 01: CONCENTRAÇÃO DA ÁGUA BRUTA ATRAVÉS DE ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO/ UTILIZANDO SULFATO DE ALUMÍNIO A 1% COMO COAGULANTE.

Data	ETA	Coagulante (ppm)		Temp.	Alcal	CT	Água bruta			Água decantada		
		ETA	LAB	(°C)			pH	cor	turb.	pH	cor	turb.
02/12/08	IG	SA (24)	SA (24)	22	19	N	6,5	80	8	7,1	10	2,7
03/12/08	IR	SA (26)	SA (26)	23	20	E	6,8	70	11	6,6	5	0,6
02/12/08	RP	PAC(20)	SA (24)	20	7	N	6,0	60	5,1	5,3	15	1,3
03/12/08	PA	PAC (6,6)	SA (10)	24	56	E	7,9	10	1,3	7,7	0	3,0
15/12/08	IG	PAC (16)	SA (20)	22	18	N	6,4	62,5	8,0	6,7	5	1,3
15/12/08	IR	SA (31)	SA (31)	22	16	N	6,6	60	10,3	6,9	5	1,8
16/12/08	RP	PAC (15)	SA (15)	19	9	N	6,5	80	7,0	6,4	0	4,9
15/12/08	PA	PAC (18)	SA (18)	24	58	N	7,4	10	1,5	7,4	0	1,4
12/01/09	IG	PAC (16)	SA (16)	22	18	E	6,4	75	8,0	6,9	5	2,0
12/01/09	IR	SA (30)	SA (30)	24	16	E	6,0	60	12,4	6,8	5	1,2
12/01/09	RP	PAC (10)	SA (31)	21	9	E	6,5	80	7,9	5,8	5	1,3
13/01/09	PA	PAC (7)	SA (18)	27	62	E	8,7	10	1,51	7,3	0	2,2

IG: Iguaçu, IR: Iraí, RP: Rio Pequeno, PA: Passaúna
SA: Sulfato de Alumínio, PAC: policloreto de alumínio
Temp.: temperatura, Alcal.: alcalinidade, CT: condições do tempo
E: ensolarado, N: nublado

A filtração em filtro de areia não foi realizada porque o objetivo do experimento foi pesquisar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e estes poderiam ficar aderidos à areia. Os coagulantes foram utilizados para a concentração dos oocistos presentes na água.

Em nossos experimentos foram utilizados apenas o coagulante sulfato de alumínio, dessa forma sua concentração foi determinada pelos valores utilizados nas ETAs ou de acordo com a cor da água bruta. Na ETA Passúna a água sofria um pré-tratamento com um alcalinizante, por isso a alcalinidade da água sempre esteve maior que as outras ETAs.

3.2. PESQUISA DE *Cryptosporidium* NO MATERIAL FLOCULADO

O material obtido da coagulação e floculação no Jartest® foi submetido à recuperação de possíveis oocistos presentes usando o método de gradiente de sacarose e posteriormente às técnicas de PCR e IFD. Em apenas uma amostra foi encontrado DNA de *Cryptosporidium* pela técnica de PCR. Essa mesma amostra encontrou-se negativa na avaliação por IFD (TABELA 02).

3.3. PESQUISA DE *Cryptosporidium* NO MATERIAL RETIDO NA MEMBRANA DE CELULOSE APÓS FILTRAÇÃO

O material obtido após a filtração do produto de decantação e posterior lavagem da membrana de celulose foi submetido às técnicas de PCR e IFD. Em apenas uma amostra foi encontrado DNA de *Cryptosporidium* quando a técnica de PCR foi utilizada (TABELA 02), quando essa mesma amostra foi submetida à IFD não houve reatividade, sendo considerada negativa.

3.4. PESQUISA DE *Cryptosporidium* NO LODO DE ÁGUA

O lodo produzido pelos flotadores das ETAs foi analisado utilizando-se primeiramente para recuperação de oocistos o método de Yanko. Em três amostras de duas estações de tratamento de água foi possível encontrar oocistos de *Cryptosporidium* quando foi utilizada a técnica de PCR. Quando essas amostras foram submetidas à IFD, as amostras foram negativas.

3.5. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) E nPCR

Em todas as 12 coletas foram encontrados *Cryptosporidium* spp. quando foi utilizada a técnica de PCR. Na primeira coleta, apenas em apenas uma ETA foi observada a presença do parasito. Na segunda coleta foram observados *Cryptosporidium* em duas ETAs usando-se o método de Yanko associado à PCR e

quando os oocistos foram recuperados da membrana de celulose e submetidos à PCR. Na terceira coleta foi possível identificar a presença do parasito quando o lodo proveniente da ETA foi processado (TABELA 02).

3.6. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

Quando a técnica de imunofluorescência direta foi utilizada, não foi possível encontrar oocistos de *Cryptosporidium* em nenhuma amostra analisada.

TABELA 02: DETECÇÃO DO DNA DE *Cryptosporidium* UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR EM AMOSTRAS DE ÁGUA BRUTA E LODO PROVENIENTES DAS ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DA ÁGUA. Y (MÉTODO YANKO), S (SACAROSE), F (FILTRO DE CELULOSE)

DATA	**Estação de Tratamento de Água (ETA)**											
	Iguaçu			Iraí			Rio Pequeno			Passaúna		
	Y	S	F	Y	S	F	Y	S	F	Y	S	F
2 e 3/12/08												
Água	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**+**	-
Lodo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**-**	-
15 e 16/12/08												
Água	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**+**
Lodo	-	-	-	-	-	-	**+**	-	-	**+**	-	-
12 e 13/01/09												
Água	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lodo	-	-	-	-	-	-	**+**	-	-	-	-	-

4. DISCUSSÃO

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* em água bruta utilizada para o abastecimento demonstra a importância em se preservar esses mananciais. Segundo ANDREOLI *et al.* (1999), para os mananciais urbanos os problemas de lixo e esgotamento sanitário são os que mais atuam para a degradação dos mesmos. A degradação ambiental severa se reflete também na qualidade dos recursos hídricos e, de forma mais grave ainda, naqueles cursos d´água que servem como mananciais de abastecimento para as Regiões Metropolitanas, que possuem a maior população e consequentemente maior risco. Além da degradação ambiental dos mananciais, tem-se o agravamento da condição dos resíduos sólidos urbanos e outras questões ambientais associadas a esse crescimento desordenado (HASSLER, 2006).

Os casos de criptosporidiose, assim como os surtos relacionados ao consumo ou contato com água contaminada tem sido bem descritos em países desenvolvidos como Estados Unidos, Inglaterra e Japão (MULLER, 1996, SMITH et al., 2006, YODER *et al.,* 2008). No Brasil os trabalhos realizados nessa área ainda são escassos (FRANCO, 2007).

No presente trabalho, *Cryptosporidium* foi pesquisado em 12 amostras de água bruta e 12 amostras de lodo de água provenientes de quatro estações de tratamento de água (ETA) da região metropolitana de Curitiba. Oocistos foram encontrados em duas amostras de água bruta (16,7%) e três amostras de lodo (25%) (TABELA 02). Todas as amostras positivas foram provenientes de duas ETAs, equivalendo a 50% das ETAs pesquisadas. A quantificação de oocistos não foi possível, uma vez que a técnica (PCR) que detectou a presença desses organismos é uma técnica qualitativa e não quantitativa. A presença dos oocistos em duas estações das quatro analisadas sugerem que os rios utilizados para a captação da água dessas duas estações estejam sofrendo uma contaminação maior, possivelmente por animais de criação, já que as análises de PCR para a detecção de oocistos de *C. parvum* e *C. hominis* deram negativas, sugerindo uma outra espécie responsável pela contaminação desses cursos d´água.

MACHADO (2006) obteve resultados semelhantes aos nossos, ao analizar águas superficiais da região metropolitana de Recife onde encontrou o parasito em 40% dos locais estudados (2/5) e em 5% das amostras analisadas (3/60).

Já MULLER (1999) encontrou uma contaminação maior do que o encontrado em nosso trabalho. O autor analisou água de dois mananciais que abastecem duas ETAs em São Paulo e encontrou oocistos de *Cryptosporidium* em 74,45% das amostras, com densidades que variaram de 0 a 236 oocistos por litro. Essa ocorrência de oocistos apresentou baixa correlação com os parâmetros físico-químicos estudados, sugerindo que fatores como pH, turbidez, alcalinidade e cor não determinam a presença e/ou ausência de oocistos no ambiente. Diferentes resultados foram encontrados por CARTUSIO-NETO (2004) que pesquisou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em três pontos de tratamento da água (captação, saída do decantador e saída do filtro) em Campinas onde não encontrou *Cryptosporidium* em nenhuma amostra. FALCCHI (2006) analisou 12 pontos da Laguna dos Patos, no município de Rio Grande durante 12 meses e encontrou oocistos de *Cryptosporidium* em dois pontos. Nesse estudo, foi observada também a sazonalidade para a presença desse protozoário. Todavia, não foi encontrada uma diferença significante entre as estações de ano. No entanto, o protozoário foi encontrado com maior frequência nos meses de verão (dezembro, janeiro e fevereiro). O presente trabalho não analisou a influência da sazonalidade, uma vez que as coletas foram feitas somente nos meses de dezembro e janeiro, o que corresponde à estação de verão. BERINO (2004) analisou a água de quatro rios formadores do Lago Guaíba (Rio Taquari, Caí, dos Sinos e Gravataí) que abastecem a região metropolina de Porto Alegre durante 12 meses. Durante o período foram encontrados 75, 42, 33 e 25% de amostras positivas para os rios Taquari, Caí, dos Sinos e Gravataí respectivamente, com uma média de contaminção de 80, 47, 19 e 16 oocistos/100L. Esses autores não encontraram sazonalidade na ocorrência desse protozoário. ARAÚJO (2008) analisou 12 amostras de águas recreacionais coletadas no rio Ribeirão da Fazenda e 18 amostras de águas superficiais de rios que abastecem a região de Campinas. A ocorrência do parasito *Cryptosporidium* foi detectada em nove, ou seja, 30% das amostras, demonstrando a importância do monitoramento da água, seja de consumo ou de recreação.

O que se constata é que em regiões com maior grau de desenvolvimento maior proporção de protozoário é observada. Nosso estudo e o estudo de Recife, comparados ao do Estado de São Paulo, corrobora esta hipótese.

Quando foi utilizada a IFD como método de detecção dos oocistos, todas as amostras analisadas foram negativas, sugerindo uma baixa concentração de oocistos na água, uma vez que a técnica padronizada (Capítulo II) permitiu a detecção de até cinco oocistos por amostra (20µL) em 20% das amostras.

De acordo com informação da SANEPAR, praticamente 100% dos domicílios da Região Metropolitana de Curitiba são atendidos com água potável. Quanto ao tratamento de esgotos domésticos a situaçãonão é igual. No município de Curitiba, apenas 51% da população possui rede coletora de esgoto em seus domicílios. Quando são observados os demais municípios da Região Metropolitana, esta taxa cai para 41%. Contudo, quando se consideram domicílios atendidos por rede coletora e tratamento de esgotos o percentual está em torno de 16%. Esta situação compromete de forma grave os corpos d´água, pois a quantidade de esgotos que são lançados *in natura*, inclusive em bacias consideradas como futuros mananciais, podem inviabilizar o uso destes corpos d´água (XAVIER, 2005). Dessa forma, a proteção de fontes superficiais de água com alto risco de contaminação que combina controle efetivo da poluição, eficiente tratamento de água pela otimização de técnicas de tratamento convencional de água são necessários (PLUTZER *et al.,* 2008).

A preocupação com a ocorrência de protozoários de veiculação hídrica no país está representada na Portaria 518 do Ministério da Saúde, editada em 2004. Essa Portaria recomenda a "Ausência de Patógenos como enterovírus, *Cryptosporidium* e *Giardia*", no capítulo referente ao padrão potabilidade da água. No entanto, na portaria não há métodos recomendados no que diz respeito à detecção dos parasitos em amostra de água. Em futura revisão da Portaria deve ser exigido o monitoramento de *Giardia* e *Cryptosporidium* uma vez que há vários estudos em diferentes estados do País e comprovam a presença destes protozoários. A validação de técnicas e sua aplicação tanto em amostras de água tratada como água de captação deverá contribuir para determinar os níveis de contaminação por esses protozoários e consequentemente, os parâmetros de tratamento, visando garantir a qualidade da água consumida pela população brasileira.

5. CONCLUSÃO

- Os ensaios em *Jartest*® seguidos da filtração em membrana de celulose foram eficientes na concentração de oocistos de *Cryptosporidium* a partir de volumes de água de 6L;
- O método de Yanko mostrou-se como uma boa técnica na purificação de material contaminado, como foi o caso do lodo;
- A reação de imunofluorescência direta não foi capaz de detectar a presença de oocistos de *Cryptosporidium;*
- A PCR mostrou ser uma técnica sensível para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* presentes em água;
- 50% das ETAs foram positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium;*
- 16,7% das amostras de água bruta e 25% do lodo analisados foram positivos.

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T.T.C. Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase). **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP)**, São Paulo, SP, Brasil, 2004, 143p.

ANDREOLI, C. V.; DALARMI, O; LARA, A. I.; RODRIGUES, E. M.; ANDREOLI, F. N. Os Mananciais de Abastecimento do Sistema Integrado da Região Metropolitana de Curitiba – RMC. **Sanare**, v. 12 (12), p. 19-29, 1999.

ARAÚJO, R.S. Genotipagem de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras de águas superficiais e recreacionais como fonte de informação da dispersão de espécies no ambiente. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP),** São Paulo, SP, Brasil, 2008, 120p.

ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1490-1495, 1989.

BERINO, E.C.S. Ocorrência e detecção de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em águas brutas de abastecimento de formadores do lago Guaíba. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS),** Porto Alegre, RS, Brasil, 2004, 155p.

BORGES, J.C.G.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G.; GOMES, J.K.N.; de LIMA, R.P. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água destinada a manutenção dos peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) em cativeiro. **Revista Biotemas,** v. 20 (3), p. 67-74, 2007.

BRANCO, N. Avaliação da presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas minerais naturais de nascentes e enteroparasitoses em duas comunidades rurais da cidade de Campos de Jordão, SP, Brasil. **Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),** Campinas, SP, Brasil, 2006, 99p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 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**, 141(59), p. 266.

CAREY, C.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Comparison of most probable number-PCR and most probable number-foci detection method for quantifying infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental samples. **Journal of Microbiological Methods,** v. 67, p. 363-372, 2006.

CARTUSIO-NETO, R. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. **Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),** Campinas, São Paulo, 2004, 87p.

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

DIAS JÚNIOR, O. Occurrence of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in surface Waters and sewage from Araras city, São Paulo, Brazil. Dissertação (mestrado) – Universidade Mackenzie, 1999.

FAGUNDES, A.P. Remoção de oocistos de *Cryptosporidium* por filtração direta – Influência de alguns aspectos operacionais. **Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília (UnB),** Brasília, DF, Brasil, 2006, 148p.

FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Apresentação na Mesa Redonda: Saneamento e Parasitoses. **XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul: Novos Horizontes em Parasitologia,** 26 a 30 de outubro de 2009.

FALCCHI, R.L.C. Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel),** Pelotas, RS, Brasil, 2006, 90p.

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

FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology** doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.011, 2009.

FRANCO, R.M.B.; Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública **Revista Panamericana de Infectologia**, v.9 n.1 p.36-43, 2007

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

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CARTUSIO 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,** v. 43 (2), p. 109-111, 2001.

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

GOMES, A.H.S.; PACHECO, M.A.S.R.; FONSCECA, Y.S.K.; *et al.* Pesquisa de *Cryptosporidium* sp em águas de fontes naturais e comparação com análises bacteriológicas, **Revista do Instituto Adolfo Lutz,** v. 61 (1), p. 59-63, 2002.

HACHICH, E.M.; SATO, M.I.Z.; GALVANI, A.T.; MENEON, J.R.N.; MUCCI, J.L.N. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source Waters of São Paulo State, Brazil. **Water Science and Technology,** v. 50 (1), p. 239-245, 2004.

HASSLER, M.L. A dinâmica das unidades de conservação na região metropolitana de Curitiba. **R.RA´E GA,** n. 12, p. 135-143, 2006.

HELLER, L.; BASTOS, R.K.X.; VIEIRA, M.B.C.M.; BEVILACQUA, P.D.; de BRITO, L.L.A.; MOTA, S.M.M.; OLIVEIRA, A.A.; MACHADO, P.M.; SALVADOR, D.P.; CARDOSO, A.B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Saúde,** v. 13 (2), 2004.

MACHADO, E.C.L. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife/Pernambuco. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),** Recife, PE, Brasil, 2006, 141p.

MULLER, A.P.B. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de são Paulo. **Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP***),* São Paulo, SP, Brasil, 1999, 135p.

NISHI, L.; BAESSO, M.L.; SANTAN, R.G.; FREGADOLLI, P.; FALAVIGNA, D.L.M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Public Water-Treatment System. **Zoonoses and Public Health,** v. 56, p. 221-228, 2009.

OLIVEIRA, P.V. Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocisto de *Cryptosporidium* spp. no rio Atibaia, bacia do rio Piracicaba, Campinas, São Paulo. **Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),** Campinas, SP, Brasil, 2005, 87p.

PLUTZER, J.; KARANIS, P.; DOMOKOS, K.; TÖRÖKNÉ, A.; MÁRIALIGETI, K. Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. **International Journal of Hygiene and Environmental Health,** v. 211, p. 524-533, 2008.

RÉ, A.L. Qualidade microbiológica e parasitológica de águas de consumo humano do município de Araras, SP, com ênfase na pesquisa de oocitos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia lamblia.* **Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP),** São Paulo, SP, Brasil, 1999, 132p.

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**, v. 22, p. 161-167, 2006.

XAVIER, C.F. Avaliação da influência do uso e ocupação do solo e de características geomorfológicas sobre a qualidade das águas de dois reservatórios da Região Metropolitana de Curitiba – Paraná. **Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências do Solo da Universidade Federal do Paraná (UFPR),** Curitiba, PR, Brasil, 2005, 154p.

YANKO, W. A. Occurrence of pathogen in distribution and marketing municipal sludges. County Sanitation Districts of Los Angeles County, Whittier, CA. In: EPA/625/R – 92/013. Environmental Regulations and Technology. **Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge**. 152 p., 1992.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade da água tem sido intensamente deteriorada no mundo todo, apresentando, dessa forma, um risco potencial à saúde e ao bem-estar do homem e dos animais. Inúmeros organismos de origem fecal são considerados agentes causadores de gastroenterites de veiculação hídrica. Apesar da diminuição da ocorrência de surtos causados por bactérias como *Vibrio cholerae* e *Salmonella typhi*, devido à cloração da água, as infecções causadas por protozoários, especialmente *Cryptosporidium* continuam ocorrendo em todo o mundo.

Diversos surtos são relatados em todo o mundo, especialmente nos países desenvolvidos. Segundo YODER e BEACH (2009) os casos de criptosporidiose nos Estados Unidos vêm aumentando drasticamente desde 2004. As razões para esse aumento não estão bem claras, mas podem ser devido ao aumento na incidência, melhoria na vigilância e no conhecimento sobre a criptosporidiose e aumento no diagnóstico.

Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, dados sobre a ocorrência de surtos ou simplesmente a ocorrência desse protozoário em água, alimentos ou fezes são bastante escassos e se concentram em estudos realizados em centros de pesquisas ou Universidades. Nos casos de diarréias agudas, não existe uma obrigatoriedade em se pesquisar o agente causador, dessa forma, podem estar ocorrendo diarréias decorrentes da infecção pelo *Cryptosporidium* sem que haja a correta identificação. Urge que nas avaliações das etiologias de surtos de diarréias sejam incluídos *Cryptosporidium* e *Giardia.*

A não ocorrência de surtos no Brasil pode ser devido ao desenvolvimento de imunidade pela população devido aos constantes desafios decorrentes da ingestão desses patógenos presentes em água ou alimentos. Já nos países desenvolvidos, onde o controle e o rigor na produção de alimentos e da água consumida é maior, a população se tornou mais sensível aos desafios dos patógenos, especialmente os emergentes como *Cryptosporidium*, demonstrado pelo grande número de surtos relatados na literatura. Apesar de não haver registros de surtos no Brasil, deve-se atentar à necessidade urgente de um controle e monitoramento obrigatório, já que os trabalhos desenvolvidos em nosso país demonstram a contaminação desses cursos d´água utilizados tanto para o consumo como para a recreação.

A preocupação com a identificação dos agentes veiculados pela água e causadores de surtos é de suma importância, uma vez que a correta identificação torna possível o reconhecimento da fonte de infecção e, consequentemente, medidas profiláticas poderão ser implementadas.

É importante ressaltar que a melhor forma de prevenção ainda é o impedimento da contaminação dos cursos d´água. Dessa forma, deve-se evitar o despejo de esgoto não tratado em águas superficiais. Isso só poderá ocorrer quando houver investimento em saneamento básico, já que apenas 46,4% do esgoto do estado do Paraná é recolhido corretamento (BRASIL, 2007). Outra questão importante na prevenção da contaminação das águas superficiais pelo *Cryptosporidium* é o controle na criação de animais, especialmente os bovinos, tormando-se o cuidado com os seus dejetos para que não alcancem os cursos d´água, especialmente aqueles utilizados para o consumo humano.

No Brasil a Portaria 518 do Ministério da Saúde, editada em 2004, no capítulo referente ao padrão potabilidade da água, recomenda a "Ausência de Patógenos como enterovírus, *Cryptosporidium* e *Giardia*". No entanto, na portaria não há métodos recomendados no que se refere à detecção dos parasitos em amostra de água. Se em futuras revisões for exigida a detecção destes protozoários é fundamental que tenhamos técnicas que sejam de fácil execução, que seus resultados sejam confiáveis e que apresentem baixo custo. Em relação à identificação do *Cryptosporidium*, as metodologias utilizadas nos centros de referência dos Estados Unidos, Canadá e Grã-Bretanha utilizam reagentes caros que não são produzidos no nosso país, devendo ser importados, o que encarece significativamente as técnicas para identificação desse protozoário em água. Dessa forma torna-se necessária a padronização de técnicas que sejam viáveis para a realidade do nosso país.

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 de qualidade da água que bebemos. 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 sequências tenham sido validadas por vários centros de pesquisa. A PCR padronizada em nosso trabalho apresentou-se

como uma ferramenta importante no diagnóstico da contaminação ambiental pelo *Cryptosporidium* com uma boa sensibilidade e especificidade, com um custo baixo.

Outro aspecto interessante das técnicas moleculares a compreensão da transmissão zoonótica de *Cryptosporidium*. A identificação correta das espécies do protozoário, especialmente em amostras ambientais, é de suma importância para se avaliar o risco de infecção humana. Além disso, a determinação dos genótipos do parasito circulantes no ambiente e sua origem (humana ou animal) podem indicar as espécies que oferecem risco à saúde pública.

Em nosso trabalho foi possível a produção e utilização de anticorpos policlonais específicos para o reconhecimento de oocistos de *Cryptosporidium*, podendo ser utilizado, apesar de ter apresentado uma sensibilidade menor que a PCR. Padronizada por pesquisadores e técnicos americanos e usada para controle da presença de oocistos em água, a metodologia de Imunofluorescência Direta apresenta é de execução demorada e ter baixa sensibilidade. Além disso, o custo das metodologias de detecção e identificação de *Cryptosporidium* é um fator limitante considerando a realidade brasileira.

As análises das quatro estações de tratamento de água da Região Metropolitana de Curitiba demonstraram que existe a contaminação pelo *Cryptosporidium* na água de captação. Uma vez que a análise da água dessas estações incluiu os ensaios em *Jartest®,* é possível dizer que a utilização de coagulantes é uma forma de concentração dos oocistos encontrados na água, e uma forma eficiente para detectar esses oocistos.

Apesar de não ter sido quantificada a contaminação da água após a filtração nos experimentos em *Jartest®* os oocistos estavam presentes em grande parte dos experimentos após a filtração, dessa forma, foi possível concluir que os processos convencionais de tratamento de água são insuficientes para a remoção total dos oocistos desse protozoário em questão. Esses resultados foram confirmados pela presença em 50% das ETAs analisadas, demonstrando a necessidade de implementação de processos mais eficazes de tratamento da água para inviabilizar ou remover oocistos de *Cryptosporidium*.

É necessário que o Brasil passe a identificar e notificar os surtos de criptosporidiose, relacionados ao consumo de água tratada ou de recreação e que implementem medidas de vigilância da qualidade da água .

PERSPECTIVAS

A IFD utilizando anticorpos policlonais anti-*Cryptosporidium* spp. para a verificação da contaminação da água por oocistos desse protozoário mostrou-se viável, porém a sensibilidade da técnica deverá ser melhorada, uma vez que quantidades pequenas de oocistos podem não ser detectadas. Uma forma para melhorar a sensibilidade e a especificidade dessa técnica, é através da utilização de anticorpos monoclonais. Dessa maneira, o próximo passo será a padronização de uma IFD utilizando anticorpos monoclonais que sejam capazes de quantificar a contaminação de amostras ambientais, especialmente, a água.

Uma vez que foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em duas estações de tratamento da água da região metropolitana de Curitiba, o próximo passo será a padronização de uma técnica de PCR-RFLP que seja capaz de determinar a espécie envolvida nos surtos e consequentemente a fonte de infecção e então implementar medidas preventivas que impeçam a contaminação dos mananciais de abastecimento público.

Como já descrito extensivamente na literatura e demonstrado nos nossos experimentos, o tratamento convencional da água não é capaz de eliminar completamente os oocistos, dessa forma métodos alternativos do tratamento da água poderão ser testados de forma a melhorar a qualidade dessa água consumida.

ANEXOS

ANEXO 01:

Protocolo para a purificação de oocistos de *Cryptosporidium* em gradiente de sacarose.

a) Eliminar o K2Cr2O7 mediante lavagem com PBS pH 7,2 – Tween 80 (PBST) a 2% (1500g por 10 minutos);
b) Retirar a porção lipídica por suspensão em PBST/éter etílico 7:1 e centrifugação a 1500g por 10 minutos;
c) Eliminar os resíduos de éter etílico por lavagens (três vezes) com PBST;
d) Purificar os oocistos em gradiente descontínuo de sacarose, com soluções de densidade 1,05g/mL e 1,15g;mL e centrifugação a 1500g por 20 minutos à temperatura ambiente;
e) Separar a banda rica em oocistos e eliminar dos restos de sacarose mediante lavagens (três vezes) com PBS pH 7,2 (1500g por 10 minutos);
f) Eliminar as bactérias remanescentes por suspensão dos oocistos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e descanso por 10 minutos em banho de gelo;
g) Lavar os oocistos (três vezes) com PBS (1500g por 10 minutos);
h) Quantificar os oocistos em câmara de Neubauer utilizando como corante e contraste solução aquosa de verde malaquita a 0,17%;
i) Estocar os oocistos em PBS com penicilina (500UI/mL) e estreptomicina (0,024mg/mL) e 0,01% de Tween 20 a 4^{o}C.

Soluções utilizadas para a execução técnica:

1) <u>SOLUÇÃO DE SACAROSE A 1M</u>:

- Sacarose	-	342,31g
- H_2O deionizada q.s.p	-	1000 mL.

ANEXO 02:

Método clássico de extração de DNA segundo SAMBROOK *et al.* (1989)

a) Adicionar 500μL de tampão de lise. Suspender em homogeneizador tipo vórtex;
b) Adicionar 5μL de lisozima (100mg/mL), solução recente. Incubar a 37ºC por 60 minutos;
c) Adicionar 50μL de SDS a 5%. Homogeneizar e adicionar 2,5μL (20mg/mL) de proteinase K. Homogeneizar e incubar a 55ºC por 30 minutos em banho maria sob agitação;
d) Para desnaturar a proteinase K, aquecer a 95ºC por 10 minutos;
e) Centrifugar a 750g por cinco minutos;
f) Transferir o sobrenadante para novos tubos estéreis;
g) Adicionar 5μL de RNAse (20mg/mL);
h) Incubar a 37ºC por 30 minutos;
i) Extrair DNA com volume a volume de uma solução fenol. Recuperar o sobrenadante. Transferir o sobrenadante para um novo tubo a cada lavagem. Lavar três a cinco vezes até retirar toda a proteína. Para recuperar o sobrenadante usar pipetas com pontas cortadas. Centrifugar cada etapa a 14.000g por cinco minutos;
j) Fazer uma extração com fenol/clorofórmio/isoamílico (25:24:1);
k) Centrifugar a 14.000g por cinco minutos. Recolher o sobrenadante;
l) Finalmente fazer uma extração com clorofórmio (vol/vol), após centrifugação (14.000g/5min), recuperar o sobrenadante;
m) Adicionar 1/10 volume 3M de acetato de sódio pH 6,0 (30μL). Adicionar em seguida dois volumes de etanol puro gelado (600μL);
n) Centrifugar por 30 minutos a 14000g a 4ºC;
o) Lavar duas vezes o sedimento com etanol 70% (300μL, 15min, 12.000g);
p) Secar a vácuo ou na estufa a 37ºC por 10 minutos
q) Reconstituir o DNA com 100μL água deionizada.

Soluções utilizadas:

1) TE (TRIS-EDTA)

- Tris HCl - 10mM
- EDTA - 1mM
- acertar pH para 8,0

2) SOLUÇÃO DE LISOZIMA:

- lisozima - 100g
- H_2O deionizada q.s.p - 1000 mL.

3) SDS:

- SDS - 5g
- H_2O deionizada q.s.p - 1000 mL.

4) PROTEINASE K 5%:

- Proteinase K - 50g
- H_2O deionizada q.s.p - 1000 mL.

5) RNASE:

- RNAse - 20g
- H_2O deionizada q.s.p - 1000 mL.

6) SOLUÇÃO FENOL/CLOROFÓRMIO/ISOAMÍLICO (25:24:1):

- Fenol - 250mL
- Clorofórmio - 250mL
- Álcool Isoamílico - 10mL

7) SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 3M:

- Acetato de sódio - 408,15g
- H_2O deionizada q.s.p - 1000 mL.

8) TEN (TRIS-EDTA-NACL)

- Tris HCl - 10mM
- EDTA - 10Mm
- NaCl - 150mM
- acertar pH para 8,0

ANEXO 03:

Protocolo de extração de DNA associando congelamento/descongelamento e enzimas (protocolo descrito por WEISS, 1993 e modificado)

a) Descongelar os oocistos purificados em banho-maria a 65°C por 5 minutos;
b) Colocar 200µL da suspensão (contagem conhecida) em um tubo de 2,0mL, acrescentar 1.000µL de solução fisiológica 0,85% e homogeneizar;
c) Centrifugar a 12.000g por 5 minutos, em temperatura ambiente;
d) Descartar o sobrenadante;
e) Suspender o sedimento em 1.000µL de solução fisiológica 0,85% (repetir duas ou três vezes, até que o sobrenadante fique claro);
f) Suspender o sedimento em tampão de lise (500µL) contendo β-mercaptoetanol [50µL de 100mM Tris-HCl (pH 8,0) + 50µL 50Mm EDTA (pH 8,0) + 50µL SDS 10% + 3,5µL 70mM β-mercaptoetanol + 346,5µL de água ultrapura
g) As demais etapas foram idênticas às do item “b” ao “q” do ANEXO 2

Soluções utilizadas:

1) TAMPÃO DE LISE

- Tris HCl 100mM (pH 8,0) - 100µL
- EDTA 50mM (pH 8,0) - 100µL
- SDS 10% - 50µL
- β-mercaptoetanol 70mM - 3,5µL

ANEXO 04:

Método de Extração de DNA *Salting-Out* (MILLER *et al.,* 1988)

Antes de iniciar o protocolo, centrifugar o material a 10.000g por 10 minutos, jogar o sobrenadante e adicionar 80μL de tampão de lise (5X concentrado), seguidos de 15 ciclos de congelamento e descongelamento (freezer -80ºC/banho maria)

a) Adicionar 30μL de proteinase K (10mg/mL, dissolvida em água destilada), 20μL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 20% e 240μL de água destilada (volume final com sedimento: 400μL);
b) Incubar a 55ºC, em banho-maria com agitação, por duas a três horas ou *overnight* a 37ºC;
c) Deixar esfriar em temperatura ambiente;
d) Adicionar 100μL de solução saturada de NaCl (6M);
e) Agitar vigorosamente por 15 segundos;
f) Centrifugar a 12000g por seis minutos;
g) Transferir o líquido sobrenadante para um tubo (tipo eppendorff) de 1,5mL e centrifugar a 12000g por três minutos;
h) Transferir o líquido sobrenadante para um tubo (tipo eppendorff) de 1,5mL;
i) Adicionar 1mL de etanol 99,5% gelado. Deixar o DNA precipitar por no máximo dois minutos;
j) Centrifugar a 12000g por 30 minutos. Descartar o líquido sobrenadante;
k) Lavar uma vez com etanol 70%;
l) Centrifugar a 12000g por 15 minutos. Descartar o etanol;
m) Secar o sedimento na estufa por aproximadamente cinco minutos;
n) Eluir o DNA em 50-200μL (100μL) de água pura e deixar por 12 horas em temperatura de 4ºC.

Soluções utilizadas:

1) NaCl 6M

- NaCl - 35,07g
- H_2O deionizada q.s.p - 100 mL.

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

CERTIFICADO N.º 250

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA N.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em *"Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)"*.

APROVADO.

PROCESSO: 23075.029322/2007-47 RO 07/2007- 28/08/2007

TÍTULO: *Cryptosporidium* sp.: Produção de insumos para técnicas de imunodiagnóstico e padronização de técnicas moleculares para detecção de oocistos em água

AUTORES: Vanete Thomaz Soccol, Silvia Cristina Osaki

DEPARTAMENTO: Patologia Básica

Curitiba, 30 de agosto de 2007.

Profª. Ana Maria Caliman Filadelfi

ANEXO 06:

Prova enzimoimunoensaio - ELISA.

a) Adsorção do antígeno na placa:
   - 100µL/pocinho, da solução de antígeno diluído em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6.

b) Armazenar a placa a 4ºC *overnight*:
   - incubação durante 14 horas.

c) Lavar a placa com a solução de lavagem:
   - repetir por três vezes.

d) Bloquear a placa:
   - usar 100µL/pocinho.

e) Incubar a placa em estufa a 37ºC por 60 min.

f) Lavar a placa com a solução de lavagem:
   - repetir por três vezes.

g) Diluir as amostras de soro:
   - diluir em tampão de incubação e adicionar 100µL/pocinho.

h) Incubar a placa em estufa a 37ºC por 60 min

i) Lavar com solução de lavagem:
   - repetir por seis vezes.

j) Adicionar o conjugado:
   - diluir o conjugado em tampão de incubação e distribuir 100µL/pocinho.

k) Incubar a placa por 60 min. em estufa a 37ºC

l) Lavar a placa com solução de lavagem:
   - repetir por seis vezes.

m) Adicionar o substrato:
   - diluir 4 mg do substrato em tampão citrato pH 5,0 e acrescentar 4µL de H_2O_2.

n) Incubar a placa em estufa a 22ºC, por 20 min.

o) Parar a reação com o ácido sulfúrico:
   - usar 50 µL/pocinho de solução de H_2SO_4 a 5%.

p) Leitura da absorbância com o filtro de 492nm de comprimento de onda.

Soluções utilizadas:

1) TAMPÃO CARBONATO:

- Solução A
  - Na_2CO_3 - 1,1g
  - H_2O deionizada - 200 mL
- Solução B
  - $NaHCO_3$ - 4,2g
  - H_2O deionizada - 1000mL
  - Corrigir o pH para 9,6, adicionando a solução A em B.

2) SOLUÇÃO DE LAVAGEM:

- NaCl - 9,0g
- Tween 20. - 0,5g
- H_2O deionizada q.s.p - 1000 mL.

3) SOLUÇÃO DE BLOQUEIO:

- caseína 2%
- 0,05% de Tween 20, diluídos em PBS.

4) PBS (0,05M com 0,15 M de NaCl, pH7,4), obtido a partir de:

- Solução A
  - Na_2HPO_4 - 7,1g
  - NaCl - 8,8g
  - H_2O deionizada q.s.p - 1000 mL.
- Solução B:
  - NaH_2PO_4 - 1,4g
  - NaCl. - 1,88g
  - H_2O deionizada q.s.p - 200 mL
- Corrigir o pH para 7,4, adicionando a solução B em A.

5) TAMPÃO DE INCUBAÇÃO:

- Solução A

- 0,25% caseína; 0,05% de Tween 20, diluída em PBS.

- Solução B:
  - Solução de bloqueio - 62,5 mL
  - Tween 20; - 0,25 mL
  - PBS pH 7,4. - 500 mL

6) TAMPÃO CITRATO:
  - Na_2HPO_4 - 7,10g
  - Ácido cítrico. - 5,19g
  - H_2O deionizada q.s.p - 1000 mL
  - Corrigir o pH para 5,0.

ANEXO 07:

Extração de glicoproteínas.

a) Centrifugar o soro obtido a 3700g por cinco minutos;
b) Separar o soro;
c) Adicionar Dextran Sulfato 5% na proporção 0,25%, gota a gota em temperatura ambiente sob agitação;
d) Adicionar Solução de Cloreto de Cálcio 11,1% na proporção de 1%, gota a gota sob agitação em banho de gelo;
e) Deixar em repouso em banho de gelo, durante 30 minutos sem agitar;
f) Centrifugar o material a 14.800g por 15 minutos;
g) Retirar o sobrenadante e guardar em câmara fria (2 a 8°C).

Soluções utilizadas:

1) DEXTRAN 5%:
  - Dextran - 5g
  - H_2O deionizada - 100 mL

2) CLORETO DE CÁLCIO 11,1%:

- $CaCl_2$ - 11,1g
- H_2O deionizada - 100 mL

ANEXO 08:

Precipitação com Sulfato de Amônio Saturado (SAS)

a) Dobrar o volume do soro com PBS ou tampão fosfato;
b) Colocar o mesmo volume de sulfato de amônio saturado (pH 7,6) para precipitação da Imunoglobulina;
c) Deixar em agitação por uma hora;
d) Centrifugar 30 minutos a 14.800g (repetir etapas b, c e d se necessário);
e) Suspender em 10mL PBS
f) Dialisar
   - colocar o saco em água e levar para aquecimento, retirando antes da fervura;
   - deixar dialisar durante 72 horas trocando o tampão a cada 12 horas.

Soluções utilizadas:

1) TAMPÃO FOSFATO 1M (SOLUÇÃO ESTOQUE):

- Solução A
  - Na_2HPO_4 - 141,96g
  - H_2O deionizada q.s.p - 1L
- Solução B:
  - NaH_2PO_4 - 137,99g
  - H_2O deionizada q.s.p - 1L

Adicionar a solução B na A até atingir pH 8,6

Usar a solução a 0,02M

2) SOLUÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO SATURADO:

- Sulfato de amônio - 141,96g
- H_2O deionizada q.s.p - 1L

- acertar pH para 7,2

ANEXO 09:

Conjugação do Anticorpo Policlonal com FITC Preparo do Conjugado para Testes de Imunofluorescência Direta

a) Centrifugar o material dialisado a 1.330g por 15 minutos a 4°;
b) Quantificar as proteínas;
c) Dissolver o FITC em tampão carbonato;
d) Adicionar a solução de FITC, gota a gota na suspensão de imunoglobulinas na proporção de 1,6 µg para cada 1mg;
e) Deixar a mistura sob agitação durante duas horas em temperatura ambiente, tomando-se o cuidado para não formar espuma;
f) Hidratar o sephadex G 25 durante quatro horas em água purificado;
g) Lavar cinco vezes em salina borato e transferir para coluna de filtração em gel (20 mL de gel para 1 mL de conjugado)
h) Eluir o conjugado com salina borato;
i) Dialisar o conjugado por 48 horas;
j) Centrifugar a 1.330 g, por 10 minutos a 4ºC;
k) Aliquotar e armazenar a -20ºC.

Coluna de Sephadex G 25

a) Pesar 10g e suspender 500mL de água deionizada;
b) Repousar por três horas;
c) Remover o sobrenadante e suspender o sephadex em 500mL de salina borato;
d) Repousar 30 minutos;
e) Repetir as etapas “c” e “d” cinco vezes;
f) Suspender o sephadex em 50mL de salina borato;

g) Preencher a coluna com pipeta (usar 10mL de gel para 2mL de conjugado).

Soluções utilizadas:

1) FITC:

- FITC - 1g
- tampão carbonato/bicarbonato - 100mL

2) Tampão carbonato/bicarbonato:

- Solução A
  - Na_2CO_3 - 21,2g
  - H_2O deionizada q.s.p - 100mL
- Solução B:
  - $NaHCO_3$ - 16,8g
  - H_2O deionizada q.s.p - 100mL

Adicionar a solução B na A até atingir pH 9,6

3) Tampão Borato:

- Ácido bórico - 6,821g
- Bórax (borato de sódio) - 8,6g
- NaCl - 8,32g
- H_2O deionizada q.s.p - 1000 mL

4) Salina Borato:

- Tampão borato - 15mL
- H_2O deionizada q.s.p - 1000 mL

ANEXO 10:

Reação de Imunofluorescência Direta (IFD)

a) Adsorção do antígeno na placa:
   - 20µL/pocinho, da solução de antígeno diluído em PBS, pH 7,2.
b) Armazenar a placa a 4ºC *overnight*:
   - incubação durante 14 horas.
c) Lavar a placa com a solução de lavagem:
   - repetir por três vezes.
d) Bloquear a placa:
   - usar 100µL/pocinho.
e) Incubar a placa em estufa a 37ºC por 60 min.
f) Lavar a placa com a solução de lavagem:
   - repetir por três vezes.
g) Diluir as amostras de soro:
   - diluir em tampão de incubação e adicionar 100µL/pocinho.
h) Incubar a placa em estufa a 37ºC por 60 min
i) Lavar com solução de lavagem
   - repetir por seis vezes.
j) Adicionar o conjugado:
   - diluir o conjugado em tampão de incubação e distribuir 100µL/pocinho.
k) Incubar a placa por 60 min. em estufa a 37ºC
l) Lavar a placa com solução de lavagem:
   - repetir por seis vezes.
m) Adicionar o substrato:
   - diluir 4 mg do substrato em tampão citrato pH 5,0 e acrescentar 4µL de H_2O_2.
n) Incubar a placa em estufa a 22ºC, por 20 min.
o) Parar a reação com o ácido sulfúrico:
   - usar 50 µL/pocinho de solução de H_2SO_4 a 5%.
p) Leitura da absorbância com o filtro de 492nm de comprimento de onda.

ANEXO 11:

Média das absorbâncias obtidas através da densidade ótica pela técnica de ensaio imunoenzimático - ELISA, realizado nos dois animais imunizados.

		Períodos de Colheita (em dias)						
Antígeno	"zero"	15	30	45	60	75	90	120
Solúvel	0,034	0,123	0,146	0,623	1,054	0,830	0,403	0,103
Particulado	0,023	0,167	0,188	0,899	1,103	0,703	0,431	0,178

ANEXO 12:

MÉTODO DE YANKO (1992)

a) Pesar 50g de lodo e misturar com 450mL de água de diluição em agitador. Se o lodo for líquido, colocar 400 a 500mL do mesmo e adicionar Tween 80 na proporção de 0,1% (v/v),
b) Depois de homogeneizar, filtrar em peneira de 48 mesh sobre um funil, para um béquer de 2L;
c) Lavar o recipiente onde foi homogeneizada a amostra várias vezes com água morna,
d) Deixar sedimentando overnight;
e) Aspirar o sobrenadante;
f) Passar o sedimento para tubos de centrífuga, lavando o béquer duas ou três vezes;
g) Equilibrar os tubos e centrifugar a 3000 rpm por cinco minutos;
h) Desprezar o sobrenadante e suspender o sedimento com solução de sulfato de zinco d=1,20, usando bastão de vidro;
i) Equilibrar os tubos e centrifugar a 3000 rpm por cinco minutos;
j) Decantar o sobrenadante com sulfato de zinco em um béquer, diluir com o mesmo volume de água destilada (ex: 150mL de sobrenadante + 150mL de água destilada) e deixar sedimentando por três horas ou overnight;
k) Aspirar o sobrenandante;

l) Passar para tubos de centrífuga, lavando o béquer;
m) Equilibrar os tubos e centrifugar a 1400rpm por três minutos (ou cinco);
n) Combinar os sedimentos em um único tubo (de 15mL) e centrifugar a 1400rpm por três minutos;
o) Suspender o sedimento em 7mL de solução de álcool-ácido (H_2SO_4 0,1N em ETOH 35%) e adicionar 2mL de éter;
p) Inverter várias vezes os tubos após tampá-los ventilando cada vez;
q) Equilibrar os tubos e centrifugar a 1800rpm por três minutos;
r) Retirar o sobrenadante com pipeta de Pasteur;
s) Suspender o sedimento em 4mL de H_2SO_4 0,1N;

Obs: a etapa "s" foi modificada para a extração de DNA, o sedimento foi ressuspenso em tampão de lise. Uma parte foi deixada em geladeira e utilizada para IFD e outra foi congelada para a posterior extração de DNA.

Soluções utilizadas:

1) Cloreto de magnésio

- cloreto de magnésio	-	8,11g
- água destilada q.s.p.	-	100mL

2) Tampão fosfato

- KH_2PO_4	-	3,4g
- água destilada q.s.p.	-	100mL

*ajustar pH 7,2±0,5

3) Água de diluição

- Tampão fosfato	-	1,25mL
- Cloreto de magnésio	-	5,0mL
- Tween 80	-	1,0mL
- água destilada q.s.p.	-	1000mL

*ajustar pH 7,2±0,1

4) Sulfato de zinco

- $ZnSO_4 . 7 H_2O$ - 454g
- p/ $ZnSO_4 . 1 H_2O$ - 283,4g
- água destilada q.s.p. - 1000mL

D=1200

5) Álcool 35%
- Álcool 95% - 36,84mL
- água destilada q.s.p. - 100mL

6) Solução H_2SO_4 0,1N
- H_2SO_4 (d=1,84) 96% - 1,41mL
- Água destilada - 500mL

7) Álcool-ácido
- H_2SO_4 (d=1,84) 96% - 1,41mL
- Álcool 35% - 500mL

8) Solução KCl para pHmetro
- KCl - 22.36g
- água destilada q.s.p. - 100mL

9) Tampão fosfato KH_2PO_4
- KH_2PO_4 - 3,4g
- água destilada q.s.p. - 100mL

*ajustar pH 7,2±0,5