

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBERLI RUIZ FERNANDES

**DETECÇÃO DE CISTOS de *Giardia* spp. e OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. EM
AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO TAMANDUÁ, PRINCIPAL RIO DE ABASTECIMENTO
PÚBLICO DA CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU - PR**

CURITIBA

2012

DÉBERLI RUIZ FERNANDES

**DETECÇÃO DE CISTOS de *Giardia* spp. e OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. EM
AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO TAMANDUÁ, PRINCIPAL RIO DE ABASTECIMENTO
PÚBLICO DA CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU - PR**

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

Orientadora: Profa. Dra. Edilene Alcântara de Castro
Co-orientadora: Profa. Msc. Leonilda Correia dos Santos

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Fernandes, Déberli Ruiz

Detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água do Rio Tamanduá, principal rio de abastecimento público de Foz do Iguaçu – PR. / Déberli Ruiz Fernandes. – Curitiba, 2012.

105 f.: il. ; 30cm.

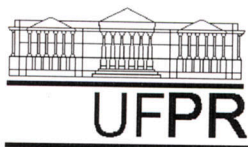
Orientador: Edilene Alcântara de Castro

Co-orientador: Leonilda Correia dos Santos

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Giardia 2. Cryptosporidium 3. Abastecimento de água nas cidades
I. Título II. Castro, Edilene Alcântara de III. Santos, Leonilda Correia dos
IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.65



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras de água do rio Tamanduá, principal rio de abastecimento público da cidade de Foz do Iguaçu – PR”

por

DÉBERLI RUIZ FERNANDES

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Prof^a. Dr^a. Edilene Alcântara de Castro (presidente)

Prof^a. Dr^a. Camila Nunes de Moraes Ribeiro

Prof^a. Dr^a. Rosângela Clara Paulino

Prof^a. Dr^a. Márcia Kiyoe Shimada
Membro suplente

Curitiba, 28 de fevereiro de 2012.

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, Eliseu e Juvenilia, pelo amor incondicional,
pelo apoio e por acreditar na educação e na prosperidade;*

À minha irmã Eloise, pela amizade e pelo exemplo;

Ao meu irmão Gabriel, pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde, pela força e pela paciência para terminar esse trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

À Itaipu Binacional, por abrir espaço para esta pesquisa.

À professora Dra. Edilene Alcântara de Castro, pela oportunidade e orientação, pela atenção dada e compreensão nos momentos difíceis.

À professora Msc. Leonilda Correia dos Santos, pela co-orientação, pela oportunidade, pela amizade e ajuda profissional.

Ao corpo docente deste curso de Pós-Graduação, pelo conhecimento.

À professora Dra. Rosangela Clara Paulino, pela atenção concedida, pelas correções paralelas, pelos conselhos que muito contribuíram para a organização do trabalho.

À professora Dra. Adriana Oliveira Costa, pela contribuição com seu conhecimento prático e teórico, e por fornecer gentilmente oocistos de *Cryptosporidium* spp.

À professora Dra. Giseli Klassen, pelo enorme conhecimento e por todas as vezes ter ajudado a resolver os problemas nas análises moleculares.

Às professoras Dra. Marcia Shimada e Dra. Débora do Rocio Klisiowics por gentilmente fornecer cistos de *Giardia* spp.

À Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro, pela amizade e pela ajuda nas reações de sequenciamento.

À querida secretária, Lu, pelo carinho.

Aos colegas de laboratório de Parasitologia Molecular: Sandra, Ricardo, China, Ju e Claudia, pelas risadas, amizade, companheirismo que sempre serão lembrados com muitas saudades.

Aos colegas do laboratório ambiental da Itaipu Binacional, Fabi, Camila, Batavo, Cris, Bruno, Michelle, Wanderlei, Luiz Antônio, Renê, Dona Oli e demais, pela ajuda no preparo dos materiais e por fazer do trabalho um momento agradável e divertido.

À todos os colegas de turma, pela experiência em conviver e pelas oportunidades de aprendizagem compartilhadas no decorrer do curso.

Às amigas de turma: Ale, Fran e Ju, pela amizade sincera, pela atenção concedida, pelo carinho recebido e pelas longas conversas agradáveis e divertidas.

Ao meu pai e meu irmão pela ajuda nas coletas das amostras.

Ao meu namorado Thiago Barreto, pelo amor, pelo apoio, pela cumplicidade, pelo respeito, pelo orgulho e pela amizade.

Aos meus amigos Priu, Rudy, Ana, Lu, Karla, Dani, July, Bruna, Djessica, Tassi, Cici, Ali, pela amizade verdadeira de uma vida inteira, pela compreensão da minha ausência, por todas as recepções calorosas e divertidas e por eu sempre poder contar com a amizade de vocês.

À minha companheira de apartamento Ju, por me fazer admirar a simplicidade alheia, por fazer dos meus finais de semana os mais divertidos, pela companhia de todos os dias, pela amizade que vou levar pra sempre.

À minha tia Maria, pelo socorro de todos os apuros, pelo amor incondicional, pelo exemplo de atitude e perseverança.

À CAPES, pela bolsa concedida

Por fim, ficam minhas desculpas aqueles que não foram lembrados.

“Só se é curioso na proporção de quanto se é instruído”

Jean Jacques Rousseau

RESUMO

A água é um elemento de extrema necessidade à vida, porém pode trazer riscos para a saúde do homem. Considerando os diferentes grupos de patógenos de veiculação hídrica, os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* são os que apresentam formas de disseminação mais resistentes aos processos de desinfecção da água. Assim, torna-se importante a pesquisa dos mesmos em fontes de água de abastecimento público, como é o caso do Rio Tamanduá, da cidade de Foz do Iguaçu – PR. Com o objetivo de avaliar a qualidade desse manancial foram analisadas amostras de água *in natura* em nove pontos diferentes. As coletas das amostras ocorreram em triplicata, com um intervalo de dois meses entre elas. Para as análises, 3 litros de água de cada ponto foram coletados e concentrados em membrana filtrante. O material concentrado na membrana foi recuperado e posteriormente submetido a centrifugação. A partir do sedimento recuperado, duas lâminas foram preparadas e coradas pelo método de Kinyoun para a pesquisa de *Cryptosporidium* e duas foram coradas com lugol para a pesquisa de *Giardia*. Além da pesquisa desses protozoários, foram feitas as análises recomendadas pela legislação vigente, como a quantificação da bactéria *Escherichia coli*. Em relação à quantificação dessa bactéria, a maior quantidade detectada foi 576 unidades formadoras de colônias por 100mL (UFC/100mL), deste modo a amostra apresenta-se dentro dos padrões estabelecidos pela resolução do CONAMA 357/2005. Com base na microscopia realizada, foi encontrada apenas uma estrutura compatível com o protozoário *Cryptosporidium* spp. na lâmina que correspondia ao ponto 6, mas não foram encontradas estruturas compatíveis com *Giardia*. Com a utilização da biologia molecular foi possível confirmar o resultado de diagnóstico para *Cryptosporidium parvum* no ponto 6 na primeira coleta, bem como a detecção de *Giardia duodenalis*, também no ponto 6, na primeira e na segunda coleta. Diante do exposto, as técnicas moleculares apresentaram-se mais sensíveis na detecção desses protozoários em amostras de água, evidenciando a presença dos mesmos na água do rio Tamanduá.

Palavras-chave: Água. *Cryptosporidium* spp. *Giardia* spp. Abastecimento público.

ABSTRACT

Water is an element of absolute necessity to life, but can introduce risks to human health. Considering the different groups of waterborne pathogens, protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* are those with more resistant forms of dissemination to the processes of water disinfection. Thus, it is important to search the same sources of public water supplies, such as Tamandua River, the city of Foz do Iguacu - PR. With the purpose to assess the quality of source water samples were analyzed in nature at nine different points. The collection of samples occurred in triplicate, with an interval of two months between them. For analysis, 3 liters of water each point were collected and concentrated in filter membrane. The concentrated material was recovered in the membrane and then subjected to centrifugation. From the sediment recovered, two slides were prepared and stained by the Kinyoun method for the detection of cryptosporidium and two were stained with lugol for the detection of *Giardia*. In addition to research these protozoa were done the analysis recommended by the legislation, as the quantification of the bacterium *Escherichia coli*. Regarding the quantification of this bacterium, the highest amount detected was 576 UFC/100mL. This way the samples were within the standards established by CONAMA Resolution 357/2005. Based on the performed microscopy, we found only a structure compatible with the protozoan *Cryptosporidium* spp. on the slide corresponding to point 6, but there were no structures compatible with *Giardia*. With the use of molecular biology was possible to confirm the diagnostic result for *Cryptosporidium parvum* at the point 6 in the first collection, and the detection of *Giardia duodenalis*, also at the point 6, at the first and second collection. Considering the above, molecular techniques were more sensitive in detecting these protozoa in water samples, indicating their presence in water of the Tamanduá river.

Keywords: Water. *Cryptosporidium* spp. *Giardia* spp. Public Supply.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> OBSERVADOS SOB AUMENTO DE 1000 X. A – OBSERVAÇÃO DOS OOCISTOS EM COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELEN; B – OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA COM CONTRASTE DE FASE; C – OOCISTOS OBSERVADOS POR MEIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	28
FIGURA 2 -	CICLO BIOLÓGICO DO <i>Cryptosporidium</i> spp	29
FIGURA 3 -	CISTOS DE <i>Giardia</i> OBSERVADOS SOB UM AUMENTO DE 400 VEZES. A – OBSERVAÇÃO EM MICROSCOPIA COM CONTRASTE DE FASE. B – OBSERVAÇÃO ATRAVÉS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA. C – OBSERVAÇÃO DE CISTOS CORADOS COM CORANTE FLUORESCENTE DAPI (4,6-diamidino 2-phenyl-indole dihydrochloride).....	38
FIGURA 4 -	TROFOZOÍTOS DE <i>Giardia</i> . A – TROFOZOÍTO OBSERVADO EM MICROSCÓPIO ÓPTICO APÓS COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA FÉRRICA. B – FOTOMICROGRAFIA FEITA A PARTIR DE MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA. C – DESENHO ESQUEMÁTICO EM 3 DIMENSÕES DO TROFOZOÍTO.....	39
FIGURA 5 -	CICLO BIOLÓGICO DA <i>Giardia</i> spp.....	40
FIGURA 6 -	LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU – PR.....	49
FIGURA 7 -	LOCALIZAÇÃO DO RESERVATÓRIO DE ÁGUA PARA ABASTECIMENTO PÚBLICO DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU, DE RESPONSABILIDADE DA COMPANHIA DE SANEAMENTO DO PARANÁ – SANEPAR E DEMAIS PONTOS DE COLETA DE AMOSTRA DE ÁGUA ENUMERADOS DE 1 A 9.....	51
FIGURA 8 -	LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTAS DE ÁGUA <i>IN NATURA</i> NO RIO TAMANDUÁ CORRESPONDENTE AOS PONTOS ENUMERADOS NA FIGURA 7.....	51
FIGURA 9 -	ESQUEMA APRESENTANDO AS ETAPAS DE EXECUÇÃO DO TRABALHO.....	52
FIGURA 10 -	APARATO UTILIZADO NA TÉCNICA DE MEMBRANA FILTRANTE.....	53
FIGURA 11 -	PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DO MATERIAL RETIDO APÓS FILTRAÇÃO A VÁCUO	54
FIGURA 12 -	SEDIMENTO RECUPERADO APÓS LAVAGEM DAS MEMBRANAS.....	55
FIGURA 13 -	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS OBTIDAS PELA INCUBAÇÃO DAS MEMBRANAS EM MEIO ENDO A 35°C POR 24 HORAS, SEGUIDA DE NOVA INCUBAÇÃO A 44°C	

	POR MAIS 24 HORAS	69
FIGURA 14 -	ESTRUTURA COMPATÍVEL COM A DO OOCISTO DE <i>Cryptosporidium</i> SOB M AUMENTO DE 1000x EM MICROSCOPIA ÓPTICA SOB UM AUMENTO DE 1000x E CORADO PELO MÉTODO DE KINYOUN	71
FIGURA 15 -	PONTO DE COLETA NÚMERO 6	71
FIGURA 16 -	GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO A EFICIÊNCIA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA UTILIZANDO O KIT COMERCIAL E A SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS DE PCR E N-PCR NA DETECÇÃO DE DNA DE <i>Cryptosporidium</i> , EVIDENCIANDO OS PRODUTOS AMPLIFICADOS A PARTIR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES XIAO - F E XIAO - R (PCR) E XIAO - 1 E XIAO - 2 (N-PCR), CONTENDO 1325 E 826 A 864 PARES DE BASES RESPECTIVAMENTE; 1KB: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR (INVITROGEN®); 150; 60; 15; 7,5; e 3,7: QUANTIDADE DE OOCISTOS / mL; C - : CONTROLE NEGATIVO...	75
FIGURA 17 -	GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO A EFICIÊNCIA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA UTILIZANDO O KIT COMERCIAL E A SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE PCR NA DETECÇÃO DE DNA DE <i>Giardia</i> , EVIDENCIANDO OS PRODUTOS AMPLIFICADOS A PARTIR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ABB97 - F E ABB220 - R CONTENDO 163 PARES DE BASES; 1KB: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR (INVITROGEN®); 300; 120; 12; 6; 3 E 1,2: QUANTIDADE DE CISTOS / mL; C - : CONTROLE NEGATIVO	76
FIGURA 18 -	GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO OS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR E N-PCR, DA ALÍQUOTA A, CONTENDO 1325 E 826 A 864 PARES DE BASES RESPECTIVAMENTE DIAGNOSTICANDO <i>Cryptosporidium</i> spp. NO PONTO 6 NA PRIMEIRA COLETA; 1KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA:1 AO 9A. C.I: CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+: CONTROLE POSITIVO; C-: CONTROLE NEGATIVO.....	77
FIGURA 19 -	GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO OS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR N-PCR, DA ALÍQUOTA B, CONTENDO ENTRE 826 A 864 PARES DE BASES DIAGNOSTICANDO <i>Cryptosporidium</i> spp NO PONTO 6 NA PRIMEIRA COLETA; 1KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA:1 A 9B. C.I: CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+: CONTROLE POSITIVO; C-: CONTROLE NEGATIVO.....	78
FIGURA 20 -	GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO PRODUTO AMPLIFICADO POR PCR, DA ALÍQUOTA A, CONTENDO 163 PARES DE BASES DIAGNOSTICANDO <i>Giardia duodenalis</i> NO PONTO 6 NA PRIMEIRA	

- COLETA; 1 KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA: 1 A 9A. C.I – CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+= CONTROLE POSITIVO. C-= CONTROLE NEGATIVO..... 78
- FIGURA 21 - GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO PRODUTO AMPLIFICADO POR PCR, DA ALÍQUOTA C, CONTENDO 163 PARES DE BASES DIAGNOSTICANDO *Giardia duodenalis* NO PONTO 6 NA PRIMEIRA COLETA; 1 KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA: 1 A 9C. C.I – CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+= CONTROLE POSITIVO. C-= CONTROLE NEGATIVO..... 79
- FIGURA 22 - GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO PRODUTO AMPLIFICADO POR PCR, DA ALÍQUOTA A, CONTENDO 163 PARES DE BASES DIAGNOSTICANDO *Giardia duodenalis* NO PONTO 6 NA TERCEIRA COLETA; 1 KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA: 1 A 9A. C.I – CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+= CONTROLE POSITIVO. C-= CONTROLE NEGATIVO..... 80
- FIGURA 23 - GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO PRODUTO AMPLIFICADO POR PCR, DA ALÍQUOTA C, CONTENDO 163 PARES DE BASES DIAGNOSTICANDO *Giardia duodenalis* NO PONTO 6 NA TERCEIRA COLETA; 1 KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA: 1 A 9A. C.I – CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+= CONTROLE POSITIVO. C-= CONTROLE NEGATIVO..... 80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	PADRÕES ESTABELECIDOS PELA RESOLUÇÃO 357 DO CONAMA REFERENTE À ÁGUA UTILIZADA PARA O ABASTECIMENTO PÚBLICO APÓS TRATAMENTO CONVENCIONAL	21
TABELA 2 -	PADRÃO MICROBIOLÓGICO DE POTABILIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO	22
TABELA 3 -	ESPÉCIES DE <i>Cryptosporidium</i> E PRINCIPAIS HOSPEDEIROS	27
TABELA 4 -	ESPÉCIES DE <i>Giardia</i> E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS	36
TABELA 5 -	NOVA PROPOSTA DE CLASSIFICAÇÃO DOS AGRUPAMENTOS DE <i>Giardia</i>	37
TABELA 6 -	RELAÇÃO DE REGISTROS DE OCORRÊNCIA DE <i>Cryptosporidium</i> E <i>Giardia</i> EM DIFERENTES FONTES DE ÁGUA	45
TABELA 7 -	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA TÉCNICA DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE <i>Cryptosporidium</i>	62
TABELA 8 -	REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>Cryptosporidium</i> E AS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NA PCR.....	62
TABELA 9 -	CONDIÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO USADA NA TÉCNICA DE PCR PARA PESQUISA DE <i>Cryptosporidium</i>	63
TABELA 10 -	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA TÉCNICA DE N-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE <i>Cryptosporidium</i>	63
TABELA 11 -	REAGENTES UTILIZADOS NA <i>NESTED</i> - PCR E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>Cryptosporidium</i>	64
TABELA 12 -	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA TÉCNICA DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE <i>Giardia</i>	64
TABELA 13 -	REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>Giardia</i> E AS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NA PCR	65
TABELA 14 -	CONDIÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO USADA NA TÉCNICA DE PCR PARA PESQUISA DE <i>Giardia</i>	65
TABELA 15 -	REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	67
TABELA 16 -	CONDIÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO USADA NO SEQUENCIAMENTO DE <i>Cryptosporidium</i>	67
TABELA 17 -	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS (TEMPERATURA E UMIDADE AMBIENTE, PH E TURBIDEZ DA ÁGUA) REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA COLETADAS EM TRÊS ETAPAS NOS NOVE PONTOS (P1 A P9) DO RIO TAMANDUÁ, FOZ DE IGUAÇÚ, PR, EM 2010.....	68

TABELA 18 -	QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS DE ACORDO COM OS NOVE PONTOS (P1 A P9) NAS TRÊS COLETAS REALIZADAS NO RIO TAMANDUÁ, FOZ DE IGUAÇÚ, EM 2010.....	70
TABELA 19 -	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> EM AMOSTRAS DE ÁGUA APÓS PURIFICAÇÃO EM CLORETO DE SÓDIO (KAR <i>et al</i> , 2010) E EM SACAROSE (PAULINO, 2005) REALIZADA EM DIFERENTES DILUIÇÕES (15 A 7500) E EM CINCO REPETIÇÕES.....	73
TABELA 20 -	COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM ÁGUA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE FLUTUAÇÃO EM NaCl E SACAROSE.....	73
TABELA 21 -	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE CISTOS DE <i>Giardia</i> EM AMOSTRAS DE ÁGUA APÓS PURIFICAÇÃO EM CLORETO DE SÓDIO (KAR <i>et al</i> , 2010) E EM SACAROSE (PAULINO, 2005) REALIZADA EM DIFERENTES DILUIÇÕES (15 A 7500) E EM CINCO REPETIÇÕES.....	74
TABELA 22 -	COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DE CISTOS DE <i>Giardia</i> . EM ÁGUA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE FLUTUAÇÃO EM NaCl E SACAROSE.....	74
TABELA 23 -	ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA POR FENOL-CLOROFÓRMIO E KIT COMERCIAL PELA AMPLIFICAÇÃO POR PCR E N-PCR DE DNA DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i>	75
TABELA 24	ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA POR FENOL-CLOROFÓRMIO E KIT COMERCIAL PELA AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE DNA DE CISTOS DE <i>Giardia</i>	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
	OBJETIVO GERAL	18
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	ENTEROPARASIToses E CONDIÇÕES DE SANEAMENTO BÁSICO.....	19
2.2	A ÁGUA E A IMPORTÂNCIA DA SUA QUALIDADE PARA OS SERES HUMANOS	20
2.3	DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA	24
2.4	<i>Cryptosporidium</i> spp.	25
2.4.1	Histórico	25
2.4.2	Taxonomia	26
2.4.3	Morfologia	27
2.4.4	Ciclo Biológico	29
2.4.5	Transmissão	30
2.4.6	Patogenia	30
2.4.7	Epidemiologia	31
2.4.8	Métodos diagnósticos da criptosporidiose	32
2.4.9	Tratamento	34
2.5	<i>Giardia</i> spp	34
2.5.1	Histórico	34
2.5.2	Taxonomia	35
2.5.3	Morfologia	37
2.5.4	Ciclo Biológico	39
2.5.5	Transmissão	40
2.5.6	Patogenia	41
2.5.7	Epidemiologia	41
2.5.8	Métodos diagnósticos da giardose	42
2.5.9	Tratamento	43
2.6	OCORRÊNCIA DE <i>Cryptosporidium</i> spp E <i>Giardia</i> spp EM DIVERSOS AMBIENTES AQUÁTICOS	43
2.7	MÉTODOS DE PESQUISA DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> spp E <i>Giardia</i> spp EM AMOSTRAS DE ÁGUA	46
3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	MUNICÍPIO DE COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	49
3.2	LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA - RIO TAMANDUÁ	49
3.3	COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA	50
3.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	52
3.4.1	Análise físico – químicos da água	53
3.4.2	Análise microbiológica da água	53

3.4.3	Análise parasitológica da água	54
3.4.3.1	Detecção dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> pelo método de Kinyoun	56
3.4.3.2	Detecção dos cistos de <i>Giardia</i> pelo método de Faust e colaboradores (1939)	56
3.4.4	Amostras de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> usadas como controle	56
3.5	OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> E CISTOS DE <i>Giardia</i> EM GRADIENTE DE SACAROSE E CLORETO DE SÓDIO.....	57
3.5.1	Purificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e cistos de <i>Giardia</i> em gradiente de sacarose (PAULINO, 2005 – modificado)	57
3.5.2	Purificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e cistos de <i>Giardia</i> em gradiente de Cloreto de Sódio (KAR <i>et al</i>, 2010 - modificado)	58
3.5.3	Análises estatísticas	59
3.6	ANÁLISES MOLECULARES	59
3.6.1	Extração de DNA	59
3.6.1.1	Extração de DNA pelo ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen™)	60
3.6.1.2	Extração de DNA pelo método clássico (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989)	60
3.6.1.3	Análise da eficiência da extração de DNA	61
3.6.2	Reação em Cadeia da Polimerase para detecção de DNA de <i>Cryptosporidium</i>	62
3.6.3	<i>Nested</i> – PCR para detecção de <i>Cryptosporidium</i>	63
3.6.4	Reação em Cadeia da Polimerase para detecção de DNA de <i>Giardia</i>	64
3.6.5	Teste de sensibilidade da PCR e controles positivo e negativo	65
3.6.6	Eletoforese em Gel de Agarose 1,6%	66
3.6.7	Reação de Sequenciamento	66
4	RESULTADOS	68
4.1	ANÁLISE FÍSICO – QUÍMICA DA ÁGUA	68
4.2	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	69
4.3	IDENTIFICAÇÃO DE <i>Cryptosporidium</i> E <i>Giardia</i> PELA MICROSCOPIA ÓPTICA...	70
4.4	TAXA DE RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> E CISTOS DE <i>Giardia</i> APÓS FILTRAÇÃO EM MEMBRANA	71
4.5	TAXA DE RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> E CISTOS DE <i>Giardia</i> APÓS PURIFICAÇÃO EM GRADIENTE DE SACAROSE E CLORETO DE SÓDIO	72
4.6	ANÁLISES MOLECULARES	74
4.6.1	Análise da eficiência dos métodos de extração de DNA	74
4.6.2	PCR e N-PCR das amostras	76
4.6.3	Resultados do Sequenciamento	81
5	DISCUSSÃO	82
6	CONCLUSÃO	88
7	PERSPECTIVAS	89
8	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

A água é um elemento de extrema necessidade para a vida, porém pode servir de veículo para vários agentes que podem trazer riscos à saúde do homem em função da sua má qualidade.

Durante muito tempo, ela foi considerada um bem público de quantidade infinita, à disposição do homem por se tratar de um recurso natural autossustentável pela sua capacidade de autodepuração. Porém, o crescimento das cidades aumentou de tal forma a quantidade de esgotos lançados nos córregos, rios, represas e lagos próximo às aglomerações, que a capacidade de autodepuração desses corpos receptores foi superada pela carga poluidora dos efluentes (PHILIPPI, 2005).

Deste modo, encontrar uma fonte de água doce que não tenha suas características alteradas pelo homem é muito difícil, pois o lançamento de resíduos provenientes da atividade humana é um dos fatores relevantes na contaminação dos corpos d'água, constituindo um dos grandes problemas de saúde pública em diversas partes do mundo (AMARAL *et al.*, 1994).

Todavia, o esgoto, mesmo quando tratado ainda pode representar risco para o ambiente, pois os tratamentos comumente empregados podem não remover totalmente patógenos como, por exemplo, os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* (CACCIÒ *et al.*, 2003; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008).

A água pode afetar a saúde do homem, quando contaminada, por meio da ingestão direta ou indiretamente pelo consumo de alimentos ou bebidas preparados com água contaminada. Ainda, a contaminação pode ocorrer de forma acidental, durante atividades recreacionais ou profissionais (FUNASA, 2006).

Problemas relacionados com a qualidade da água constituem uma das mais graves ameaças para a saúde da população (MERTEN; MINELLA, 2002). A cada ano, dois milhões de pessoas morrem por adquirirem doenças que foram transmitidas pela água contaminada e estima-se que bilhões sofrem de doenças relacionadas a veiculação hídrica, sendo a maioria dessa população crianças menores de cinco anos de idade (OMS, 2009).

Considerando os diferentes grupos de patógenos de veiculação hídrica, os protozoários parasitos intestinais, como *Giardia* e *Cryptosporidium* são os que apresentam formas de disseminação mais resistentes aos processos de desinfecção da água. Vários surtos vêm 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 desses parasitos em águas superficiais destinadas ao consumo público, levando a uma subestimação de casos de criptosporidiose e giardose (CARVALHO, 2009).

Para que a população consuma uma água livre desses agentes causadores de doenças 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).

Os parasitos *Cryptosporidium* e *Giardia* estão inclusos na “Iniciativa das Doenças Negligenciadas” da Organização Mundial de Saúde (OMS), que busca estratégias de controle de doenças que ocorrem principalmente em países em desenvolvimento. Sabe-se que existem vários programas direcionados contra essas parasitoses intestinais, entretanto é visível a diferença do alcance destes programas em países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento, mesmo com a ajuda da OMS (SAVIOLI *et al.*, 2006).

Contudo, a proteção contra contaminações por dejetos de animais e humanos que podem conter grande variedade de bactérias, vírus, protozoários e helmintos constitui ainda o melhor método de assegurar água adequada para consumo. Falhas na proteção e no tratamento efetivo expõem a comunidade a riscos de contrair doenças infecciosas (FERREIRA *et al.*, 2000).

Embora existam melhores condições de vida, em chamados países em desenvolvimento, as taxas rumo ao progresso do saneamento básico estão inadequadas segundo a OMS (2009), a qual estima que 17% da população mundial ainda não tem acesso a essas medidas.

No Brasil, a progressiva contaminação de águas superficiais e subterrâneas ocorre devido a deficiente infraestrutura do sistema de esgotamento sanitário. O índice de atendimento total de água 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 menor, atingindo apenas 3,7% na região Norte e 55,9% na região Sudeste. No Paraná, este índice (46,4%) atinge menos da metade da população (BRASIL, 2007).

Em 2003, foi instituído no Brasil, o Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água de Consumo Humano (SISAGUA), instrumento de coleta de análises de dados a ser desenvolvido em âmbito nacional pelas áreas de vigilância ambiental em saúde. O SISAGUA foi baseado no Programa Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde relacionada à Qualidade da Água para Consumo Humano (VIGIAGUA) e incorporam as normas e parâmetros da Portaria do Ministério da Saúde n° 518/2004. Esta portaria

recomenda a inclusão de pesquisa de agentes causadores de doenças, como *Giardia* e *Cryptosporidium* para atingir o padrão de potabilidade da água (BRASIL, 2004). Porém, se a portaria 518 obrigasse as companhias de saneamento a monitorar estes protozoários haveria um aumento no custo de produção de água potável, pois os insumos para a execução das metodologias são importados e extremamente caros.

Assim, torna-se necessária a utilização de outras metodologias que proporcionem sensibilidade e especificidade para detectar estes protozoários em água com um custo mais acessível para o país fornecendo ao menos a opção de um controle de qualidade da água consumida.

Diante disso, o presente trabalho tem por objetivo a pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* no rio Tamanduá, principal manancial de abastecimento no município de Foz do Iguaçu – PR. Além disso, pretende-se comparar os resultados de técnicas de microscopia óptica com técnicas de biologia molecular, buscando o desenvolvimento da aplicabilidade de metodologias que sejam viáveis visando a melhor relação custo/benefício para aplicação pelas companhias de Saneamento.

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a qualidade da água do rio Tamanduá, o qual pertence a rede de abastecimento público na cidade de Foz do Iguaçu, quanto a padrões parasitológicos e microbiológicos e averiguar possível contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* e cistos *Giardia*, parasitos estes que podem comprometer a saúde de seres humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* nas amostras de água coletadas no rio Tamanduá.
- Pesquisar a presença de bactérias termotolerantes e *Escherichia coli*, nas amostras de água do rio Tamanduá, para a determinação do padrão microbiológico.
- Comparar a sensibilidade das técnicas de microscopia óptica e de biologia molecular, para a detecção dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENTEROPARASIToses E CONDIÇÕES DE SANEAMENTO BÁSICO

As enteroparasitoses possuem ecossistema infectivo com mecanismos de infecção passiva oral e/ou ativa cutânea e apresentam distribuição cosmopolita. Estas parasitoses intestinais são determinadas por macroparasitos como os helmintos ou microparasitos como os vírus, bactérias e protozoários (CARVALHEIRO, *et al.*, 1979; LUDWIG, 1999).

Geralmente as enteroparasitoses são amplamente difundidas tanto em áreas rurais quanto urbanas dos países de terceiro mundo, devido às más baixas condições sanitárias, e representam um papel importante nas taxas de morbidade e mortalidade, nas varias regiões brasileiras, mesmo nas áreas consideradas mais desenvolvidas como as regiões sudeste e sul do país (FERRARI *et al.*, 2004).

É verificável que tais óbices à saúde das populações estão diretamente relacionados com precariedade em saneamento básico e a consequente degradação ambiental. Nessa problemática também assumem relevância a escolaridade e o conhecimento sanitário da população (GIATTI *et al.*, 2004).

Assim, Jesus *et al.* (2004) relataram que a precariedade dos sistemas de saúde primária, ligada ao difícil acesso, poucos profissionais de saúde e dependências do sistema na busca voluntária pelos usuários, complementam a cultura inadequada da população com relação à necessidade de cuidados profiláticos de saúde. Além disso, empecilhos como custo de projetos e medidas técnicas efetivas, falta de projetos educativos com a participação da comunidade dificultam as medidas de controle e profilaxia (LUDWIG, 1999).

Contudo, supõe-se que exista um limiar socioeconômico, abaixo do qual as medidas de saneamento não são suficientemente profiláticas. As infecções por agentes parasitários também podem ocorrer em um domínio doméstico, onde a educação sanitária, as noções de higiene e aspectos culturais apresentam relevância na eliminação dessas doenças (GIATTI *et al.*, 2004).

De acordo com Teixeira (2002), durante muitos séculos as doenças parasitárias dominaram o quadro nosológico das populações. Esta situação foi revertida nos países que alcançavam o desenvolvimento industrial e melhoria das condições de vida da população, fatores que contribuíram para determinar profundas alterações no padrão

epidemiológico, tais como redução da mortalidade geral, infantil, por doenças transmissíveis e aumento da expectativa de vida da população.

Pesquisas populacionais sobre parasitos intestinais foram realizadas em diferentes regiões no Brasil com resultados diferentes, mostrando talvez as diferenças regionais socioeconômicas e culturais (LUDWIG, 1999).

Giatti *et al.* (2004) realizaram um estudo de prevalência de enteroparasitoses na população de São José da Bela Vista, Estado de São Paulo, e encontraram em 1.032 exames fecais 44,4% de positividade, atribuídos à baixa renda familiar, precárias condições de higiene do domicílio e pessoal, e ao pouco conhecimento da profilaxia de protozoários e helmintos.

Segundo Ludwig (1999), a retomada e conclusão dos serviços destinados ao tratamento e disposição dos esgotos seriam as mais importantes medidas para reverter tal situação de risco à Saúde Pública. Essas medidas associadas a um programa de educação sanitária visam ao esclarecimento e a mudança de hábitos da população local. Há a necessidade então do engajamento da população para se conseguir êxito em medidas de higiene e controle de doenças.

Sendo assim, verifica-se que em virtude das condições preponderantes existem grandes facilidades da perpetuação dos ciclos de transmissão de parasitos intestinais, entre outros de veiculação hídrica. A presença de tais condições preponderantes coloca os moradores locais, sobretudo as crianças, em risco de contrair doenças infecciosas e parasitárias (GIATTI *et al.*, 2004).

2.2 A ÁGUA E A IMPORTÂNCIA DA SUA QUALIDADE PARA OS SERES HUMANOS

A água desempenha papel fundamental na manutenção dos ecossistemas sendo indispensável para a sobrevivência de todos os seres. Cerca de três quartos da superfície do planeta Terra são recobertos por água, sendo que 97,30% do total são representados pelos oceanos, as quais são impróprias para o consumo, 2,34% por gelo e 0,36% de água potável, própria para o uso do ser humano (HELLER, 1998).

O Brasil apresenta 19% dos recursos hídricos de água doce disponíveis no mundo, ocupando o primeiro lugar entre os países com melhor reserva de recursos hídricos de água doce (BRASIL, 2002; OMS, 2009). Visando a preservação da água, vários códigos e leis foram promulgados. Em 1934, foi criado o Código das Águas e em 1981, foi instituída a Política Nacional do Meio Ambiente através da Lei Federal número 6.938 (BRASIL, 1997). A Lei Federal número 9.433, de 1997, instituiu a Política Nacional

de Recursos Hídricos (BRASIL, 1997). Em 2000, foi criada a Agência Nacional da Água, através da Lei Federal número 9.984 com o intuito de definir e implantar a Política Nacional de Recursos Hídricos e do Sistema de Gestão (BRASIL, 2005).

Os parâmetros de Qualidade de Água são características que traduzem os diferentes componentes presentes na água e que alteram seu grau de pureza, podendo a água ser retratada de uma maneira ampla e simplificada, em termos de suas características físicas, químicas e biológicas (VON SPERLING, 1996).

Os níveis de contaminação toleráveis e padrões sanitários de qualidade da água são estabelecidos em função do uso pretendido para a água (MACÊDO, 2004).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, na sua resolução 357 de 17 de março de 2005, classifica a água segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes, em treze classes de qualidade, sendo que a água utilizada para o abastecimento público após tratamento convencional é intitulada como classe dois. Esta classe de água deve estar em conformidade com os dados apresentados na tabela 1.

TABELA 1: PADRÕES ESTABELECIDOS PELA RESOLUÇÃO 357 DO CONAMA REFERENTE À ÁGUA UTILIZADA PARA O ABASTECIMENTO PÚBLICO APÓS TRATAMENTO CONVENCIONAL

Parâmetro	Quantidade Máxima Permitida
Corantes de fontes antrópicas	Ausente
Coliformes Termotolerantes	1.000 por 100 mililitros em 80% de 6 amostras
Cor verdadeira	até 75 mg Pt/L
Turbidez	até 100 UNT
Demanda Bioquímica de Oxigênio	em 5 dias a 20°C até 5 mg/L
Oxigênio Dissolvido	Não inferior a 5 mg/L
Cianobactérias	até 50000 cel/mL ou 5 mm ³ /L
Fósforo total	até 0,030 mg/L
Clorofila a	até 30 µg/L

UNT – UNIDADES NEFELOMÉTRICAS DE TURBIDEZ

FONTE: CONAMA. RESOLUÇÃO 357 DE 17 DE MARÇO DE 2005

Segundo PORTARIA n.1469, de 2000, e mais recentemente a PORTARIA n. 518, de 2004, ambas do Ministério da Saúde, no capítulo II - Do Padrão de Potabilidade - o ART.4 define água potável como sendo toda aquela para o consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça riscos à saúde.

Esta portaria é responsável pelo padrão de qualidade de água distribuída após tratamento, bem como estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Assim, a água distribuída deve estar em conformidade com o padrão microbiológico (Tabela 2).

TABELA 2: PADRÃO MICROBIOLÓGICO DE POTABILIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

PARÂMETRO	Volume por ml (VPM)
Água para consumo humano	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes	Ausência em 100 mL
Água na saída do tratamento	
Coliformes totais	Ausência em 100 mL
Água tratada no sistema de distribuição (reservatório de rede)	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes	Ausência em 100 mL
Coliformes totais	<p>Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês:</p> <p>Ausência em 100 mL em 95% da amostra examinadas no mês;</p> <p>Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês:</p> <p>Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100 mL.</p>

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, PORTARIA N. 1469.

Ainda no capítulo II, das definições no ART.4 se definem coliformes totais (bactérias do grupo coliforme). A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, embora vários outros gêneros e espécies pertençam ao grupo. Entretanto, a *Escherichia coli* é considerada o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos.

O § 8º do ART.11 estabelece que: “Em complementação, recomenda-se a inclusão de pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência, dentre outros, de enterovírus, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de

Cryptosporidium spp.” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Os parasitos *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. estão sendo alvo de preocupações recentes, tanto de autoridades vinculadas a saúde pública quanto da comunidade científica, pois os mesmos estão sendo transmitidos mediante consumo de água tratada e distribuída por sistemas de abastecimento (DIAS *et al.*, 2008).

Há muito tempo a participação da água como veículo de doenças de transmissão fecal-oral é conhecida. Já há algum tempo tem-se orientado o desenvolvimento de tecnologias de tratamento efetivo e mudanças nas políticas públicas de distribuição de água com qualidade adequada à população (BEVILACQUA *et al.*, 2002).

A crescente preocupação com a transmissão de protozoários via água proveniente de abastecimento público envolve ainda algumas dificuldades na busca do equacionamento do problema. Nieminsky, Schaffer e Ongerth (1995) reconhecem que as limitações dos processos convencionais de tratamento de água na remoção/inativação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* é parte dessa problemática. Já Bastos *et al.* (2000) assinalam que esta preocupação está envolvida com a insuficiência do controle tradicional da qualidade da água tratada que utiliza como indicador de contaminação apenas bactérias do grupo coliformes. Allen *et al.* (2000) relatam que o problema está nas limitações analíticas dos métodos disponíveis de pesquisa de protozoários em amostra de água. Craun *et al.* (1998) afirmam que há uma dificuldade em estimar riscos à saúde associados à presença desses protozoários em águas de consumo humano, principalmente quando em números reduzidos.

Conforme Dahi (1992) existem contaminantes que só afetam a aparência da água e podem ser detectados com uma simples investigação visual, enquanto outros não são tão evidentes, mas podem causar graves problemas para a saúde, podendo provocar até a morte. Como exemplos destes últimos, estão os defensivos agrícolas tóxicos, bactérias do grupo coliformes, protozoários entre outros.

A qualidade das águas muda ao longo do ano, em função de fatores meteorológicos e do eventual lançamento de poluentes e também das respectivas vazões. No entanto, a capacidade de autodepuração dos corpos receptores dos efluentes e a diluição da carga poluidora, pelo recebimento de afluentes com melhor qualidade, são os grandes aliados do homem na preservação da qualidade das águas. Essa recuperação, entretanto, atinge apenas os níveis de qualidade aceitável ou boa, sendo muito difícil a recuperação total (PHILIPPI, 2005).

Porém, o crescimento de aglomerados urbanos aumentou concomitantemente a geração de águas residuárias e a sua disposição imprópria de despejo no meio ambiente tem contribuído para a degradação de mananciais de abastecimento de água para

consumo humano (BEVILACQUA *et al.*, 2002). O tratamento inadequado ou o não tratamento tanto dos resíduos sólidos quanto das águas residuárias provocam a contaminação de mananciais usados para o abastecimento público por diferentes tipos de organismos (DIAS *et al.*, 2008).

Segundo Karanis *et al.* (2006), a poluição dos recursos hídricos é um grave problema para a saúde humana, pois pode veicular uma série de agentes infecto-parasitários. Além disso, o uso inadequado e muitas vezes irracional da água reflete o atual quadro de escassez e deterioração da sua qualidade (DIAS *et al.*, 2008).

2.3 DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA

As doenças podem ter origem hídrica por causa de substâncias diluídas durante as transformações que ocorrem no ciclo hidrológico. O flúor, nitrato, chumbo e outros metais pesados, são exemplos dessas substâncias, sendo que o flúor em excesso provoca fluorose; os nitratos, formação de metemoglobinemia; o chumbo, o saturnismo, entre outras intoxicações com outros metais pesados (PHILIPPI, 2005).

Por outro lado, a água é propícia para a proliferação de hospedeiros intermediários como, por exemplo, caramujos, larvas de mosquito, entre outros que transmitem vários agentes patogênicos. Desta forma os agentes patogênicos se beneficiam da falta de limpeza e higiene e se alojam nos seres humanos, causando enfermidades (PHILIPPI, 2005).

As doenças transmitidas pela água são resultantes predominantemente do ciclo de contaminação fecal/oral e seu controle tem recebido cada vez mais atenção em todo o mundo. Geralmente as parasitoses são amplamente difundidas tanto nas áreas rurais quanto urbanas dos países de terceiro mundo, devido às más condições sanitárias (STAMFORD, *et al.* 2005).

Richter e Salud (2000), citados por Macêdo (2004) relatam que a contaminação da água por dejetos provenientes do homem e de animais, além de solo e vegetais, representa a principal fonte de infecção. Nestes dejetos podem ser encontrados microrganismos patogênicos que podem causar doenças que atingem principalmente o trato gastrointestinal, levando a sintomas que vão desde uma simples dor de cabeça a febre tifóide.

De acordo com Rodrigues (2008) as infecções parasitárias intestinais são eventos comuns em nosso meio e ocorrem em todas as faixas etárias e níveis socioeconômicos. No entanto, as infecções causadas por agentes biológicos veiculados pela água possuem

elevada taxa de mortalidade em indivíduos com baixa resistência, especialmente os idosos e crianças abaixo de 5 anos (OPS, 2000). Segundo Rolim (2000) as doenças de veiculação hídrica causam cerca de 85% dessas enfermidades.

Dentre os parasitos transmitidos aos seres humanos, por intermédio da água, destacam-se os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* que permanecem viáveis por vários meses na água mesmo em temperaturas entre 4 e 10 °C (HSU; YEH, 2003). HELLER *et al.* (2004) citaram que as principais fontes de contaminação de mananciais por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia duodenalis* são os esgotos sanitários, bem como os dejetos e efluentes de atividades agropecuárias, principalmente nos países em desenvolvimento.

2.4 *Cryptosporidium* spp.

2.4.1 Histórico

O protozoário do gênero *Cryptosporidium* foi descrito em 1907 pelo parasitologista americano Ernest Edward Tyzzer (DUBEY *et al.*, 1990). O parasito foi encontrado pela primeira vez em glândulas gástricas de camundongos de laboratório e foi nomeado *Cryptosporidium muris*. Mais tarde o mesmo pesquisador americano observou estágios semelhantes ao encontrado pela primeira vez, no entanto, encontrou no intestino delgado de camundongos e por essa diferença o classificou como outra espécie denominada *Cryptosporidium parvum* (FAYER, 2010).

Em 1955, Slavin descreveu o primeiro surto de criptosporidiose em aves, acometendo perus jovens. O pesquisador observou estruturas similares ao *Cryptosporidium* no íleo dessas aves que apresentavam diarreia aguda, e associou o parasito como causa principal de morbidade e mortalidade em perus, nomeando esta espécie como *Cryptosporidium meleagridis*. No entanto, o interesse médico veterinário só foi despertado em 1971, quando o parasito foi encontrado pela primeira vez em bezerros causando diarreia intensa (LALLO, 1996; ALMEIDA, 2004).

Apenas em 1976, nos Estados Unidos da América, foram descritos pela primeira vez, por Nime *et al.* (1976), registros de criptosporidiose em seres humanos. Com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida em meados de 1980, casos de infecção por *Cryptosporidium* aumentaram significativamente causando quadros graves de diarreia crônica (FAYER *et al.*, 2000). Apesar da maioria dos

autores classificarem o *Cryptosporidium* como um patógeno oportunista, Nascimento *et al.* (2009) defendem que esse agente acomete também indivíduos imunocompetentes, tornando-se frequente o número de surtos envolvendo esse público.

2.4.2 Taxonomia

Taxonomicamente, o protozoário *Cryptosporidium* é classificado segundo Levine *et al.*(1980):

Sub-reino Protozoa Goldfuss, 1818, emend. von Siebold, 1845

Filo Apicomplexa Levine, 1970

Classe Sporozoea Leuckart, 1879

Subclasse Coccidia Leuckart, 1879

Ordem Eucoccidiorida Léger & Duboscq, 1910

Sub-ordem Eimeriorina Léger, 1911

Família Cryptosporiidae Léger, 1911

Existem outras proposições taxonômicas descritas para *Cryptosporidium*, sendo que suas diferenças ocorrem dependendo da sistemática a ser analisada. Por exemplo, Adl *et al.* (2005) utilizam uma proposta que difere da sistemática de Levine *et al.* (1980), adotando um sistema hierárquico sem a designação formal de categorias classificando em supergrupos e grupos. O *Cryptosporidium* é agrupado com ciliados, dinoflagelados, algas pardas e fungos zoospóricos em Chromalveolata. No entanto, a classificação de Levine continua sendo oficialmente adotada segundo Greca (2010).

Atualmente, o gênero *Cryptosporidium* apresenta 21 espécies e aproximadamente 40 genótipos. Para se chegar nesse número, o uso de métodos moleculares tem auxiliado na caracterização para a padronização da taxonomia (XIAO e CAMA, 2006; OSAKI, 2009). A tabela 3 mostra as espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros de acordo com o autor e ano de sua descrição.

TABELA 3: ESPÉCIES DE *Cryptosporidium* E PRINCIPAIS HOSPEDEIROS

Espécies de <i>Cryptosporidium</i>	Principais Hospedeiros	Autor e Ano da Descrição
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Bovinos; Camelos	Lindsay <i>et al.</i> , 2000
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Aves	Current <i>et al.</i> , 1986
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Bovinos	Fayer <i>et al.</i> , 2005
<i>Cryptosporidium canis</i>	Cães	Fayer <i>et al.</i> , 2001
<i>Cryptosporidium fayeri</i>	Canguru vermelho	Ryan <i>et al.</i> , 2008
<i>Cryptosporidium fragile</i>	Anfíbios	Jirku <i>et al.</i> , 2008
<i>Cryptosporidium felis</i>	Gatos	Iseki, 1979
<i>Cryptosporidium galli</i>	Aves	Pavlassek, 1999
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Humanos; Macacos	Morgan-Ryan <i>et al.</i> , 2002
<i>Cryptosporidium macropodum</i>	Canguru cinza	Power e Ryan, 2008
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Perus; Humanos	Slavin, 1955
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Peixes	Alvarez-Pellitero e Sitjà-Bobadilla, 2002
<i>Cryptosporidium muris</i>	Roedores	Tyzzar, 1910
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Bovinos; Outros ruminantes; Humanos	Tyzzar, 1912
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	Bovinos	Fayer <i>et al.</i> , 2008
<i>Cryptosporidium scophthalmi</i>	Peixes	Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> , 2004
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Serpentes	Levine, 1980
<i>Cryptosporidium suis</i>	Suínos	Ryan <i>et al.</i> , 2004
<i>Cryptosporidium varanii</i>	Lagarto monitor	Pavlassek <i>et al.</i> , 1995
<i>Cryptosporidium xiaoi</i>	Ovinos	Fayer e Santín, 2009
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Porquinho da Índia	Vetterling <i>et al.</i> , 1971

FONTE: OSAKI (2009)

2.4.3 Morfologia

O *Cryptosporidium* pertence ao filo Apicomplexa, pois apresenta um aparato apical secretor que está relacionado com a invasão tecidual (ABRAHAMSEN *et al.*, 2004).

As espécies de *Cryptosporidium* são parasitas entéricos que desenvolvem-se no epitélio da mucosa intestinal ou gástrica de diversos vertebrados, diferindo morfológicamente de todos os outros gêneros da subordem Eimeriorina, pois são esféricos ou ovóides, medindo de 3 a 8 µm de diâmetro e apresentando internamente quatro esporozoítos em formato de meia lua (Figura 1) (BORGES, ALVES e FAUSTINO,

2007; FAYER, 2004).

A parede externa do oocisto, que circunda os esporozoítos, proporciona proteção sob condições extremas de temperatura e umidade por vários meses, especialmente em países de clima temperado nos quais a temperatura em rios e lagos permanece baixa o ano todo (FAYER, 2004).

Os oocistos maduros contêm quatro esporozoítos não inclusos em um esporocisto e esta configuração estrutural única estabelece a principal característica taxonômica para identificação do gênero (PEREIRA, 2007).

Há a produção de dois tipos de oocistos, sendo um destes de parede espessa, eliminados na forma infectante através das fezes e resistentes às condições ambientais, permitindo a transmissão do parasito para outros animais; e aqueles de parede delgada, os quais se rompem no hospedeiro e liberam esporozoítos que invadem células epiteliais não infectadas, responsáveis por autoinfecções (BORGES, ALVES E FAUSTINO, 2007).

O *Cryptosporidium* é um protozoário intracelular e extracitoplasmático obrigatório pois o parasito localiza-se na superfície da microvilosidade da célula epitelial hospedeira. Essa localização proporciona proteção da resposta imunológica do hospedeiro (FAYER *et al.*, 2000). De acordo com Current e Garcia (1991), a localização desse parasito tem sido descrita como intracelular, pois ele reside dentro de um vacúolo parasitóforo sendo envolvido apenas pela membrana citoplasmática das células hospedeiras, e extracitoplasmático, pois está confinado na região das microvilosidades das células hospedeiras.

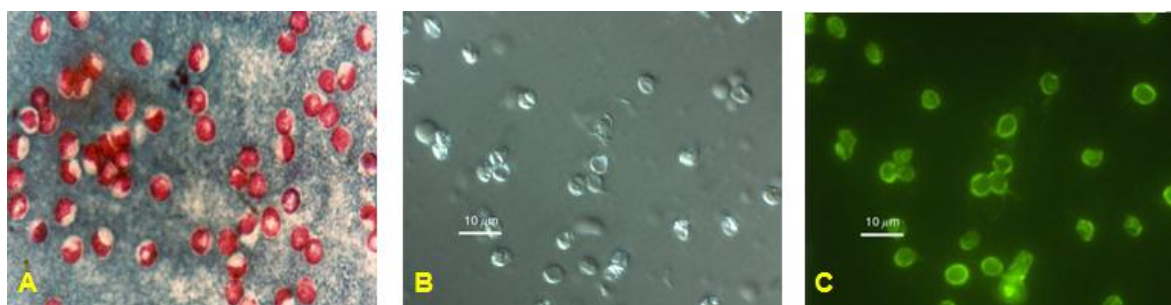


FIGURA 1 – OOCISTOS DE *Cryptosporidium* OBSERVADOS SOB AUMENTO DE 1000 X. A – OBSERVAÇÃO DOS OOCISTOS EM COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN; B – OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA COM CONTRASTE DE FASE; C – OOCISTOS OBSERVADOS POR MEIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.

FONTE: U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.

2.4.4 Ciclo Biológico

O ciclo de vida é do tipo monoxeno (Figura 2), com seis estágios de desenvolvimento no organismo hospedeiro: desencistamento, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede do oocisto e esporogonia (GELLIN e SOAVE 1992, DONNELLY e STENTIFORD 1997, SMITH e ROSE 1998). O mesmo se inicia com a ingestão de oocistos infectantes pelo hospedeiro onde dez oocistos ou menos podem induzir infecção. Após o desencistamento os esporozoítos são liberados no intestino e invadem as células epiteliais do trato gastrointestinal.

O desenvolvimento assexuado realiza-se por meio de duas gerações sucessivas de merogonia, liberando oito e quatro merozoítos respectivamente. Os quatro merozoítos liberados da segunda merogonia dão origem aos estádios de desenvolvimento sexuado, os micro e macrogametas os quais, após unirem-se dão origem ao zigoto. Em seguida esse zigoto sofre duas divisões, completando o ciclo com a formação do oocisto (TZIPORI e WARD, 2002; FAYER, 2004). Ao contrário da maioria dos coccídios, os oocistos de *Cryptosporidium* são eliminados já infectantes no meio ambiente, ou seja, esporulados (KHAN, 2008).

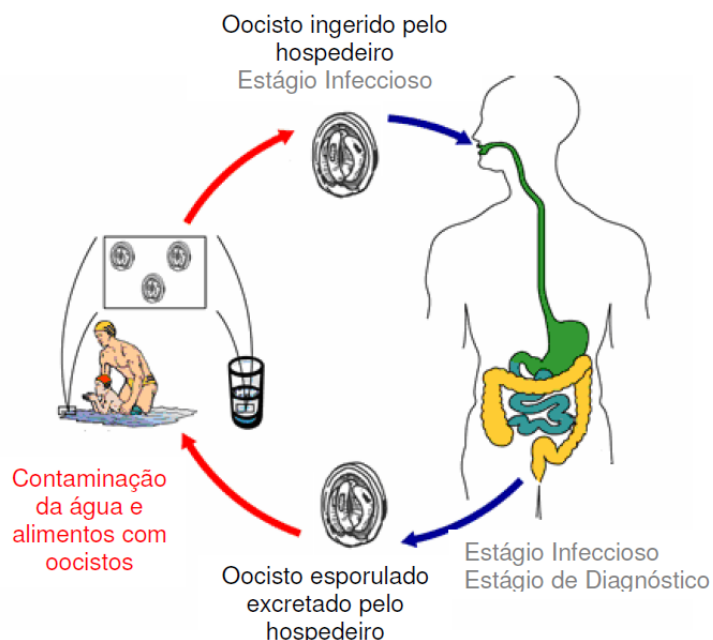


FIGURA 2 - CICLO BIOLÓGICO DO *Cryptosporidium* spp.

FONTE: U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.

2.4.5 Transmissão

A transmissão do protozoário *Cryptosporidium* ocorre pela propagação fecal-oral de oocistos. É uma doença que pode ser transmitida pelo contato direto entre pessoas, animais, pessoa-animal ou de forma indireta pelo consumo de água e alimentos contaminados (FAYER *et al.*, 2004). Segundo Overgaauw *et al.* (2009) a transmissão pode ocorrer também através do ar.

Diversas vias de transmissão já são conhecidas, sendo a ingestão de água contaminada a mais relatada em surtos de criptosporidiose. O contato com fezes de animais, particularmente cordeiros e bezerros também apresenta alto índice de infecção. E a transmissão antroponótica ocorre especialmente em crianças em creches e escolas (KHAN, 2008), essa população compreende um grupo de risco importante devido à deficiência de hábitos higiênicos e imaturidade imunológica (MILLER *et al.*, 1994).

Como já dito anteriormente, uma das principais rotas de transmissão é através da água. Embora a importância da rota tenha sido reconhecida, surtos continuam a ocorrer, mesmo porque, a ingestão de pequenas quantidades de oocistos é suficiente para causar infecção (FRANCO, ROCHA-EBERHARDT, CANTUSIO NETO, 2001). Isso vem ocorrendo devido a contaminação dos mananciais utilizados para o abastecimento público por efluentes de esgoto (FAYER *et al.*, 2000).

A água de recreação também é uma importante via de transmissão, pois o parasito apresenta uma resistência ao cloro e a ingestão acidental de água de piscina pode ocasionar infecção.

A disseminação de oocistos de *Cryptosporidium* por meio de alimentos contaminados pode ter aumentado devido a grande demanda de frutas e vegetais no mundo todo. A ingestão desses parasitos se deve ao fato desses alimentos serem consumidos, em sua maioria, crus. Deste modo, a baixa dose infectante, a falta de higienização e de tratamento térmico desses alimentos permite a ingestão e infecção por estes protozoários (SMITH *et al.*, 2006).

2.4.6 Patogenia

O *Cryptosporidium* causa uma infecção aguda autolimitante cujo principal sintoma é a diarreia em indivíduos imunocompetentes nos quais a doença tende a passar mais rapidamente dependendo das condições do hospedeiro como idade, exposição prévia, estresse e dos fatores relacionados ao parasito tais como dose infectante, viabilidade,

espécie e genótipo (TZIPORI e WARD, 2002).

No caso de indivíduos imunocomprometidos, como os portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), pacientes transplantados ou sob o tratamento para certos tipos de câncer, crianças mal nutridas, entre outros, o desenvolvimento de diarreia crônica pode persistir por longos períodos podendo levar ao óbito (BONATTI, 2007). Em indivíduos sadios normalmente é uma doença de remissão espontânea (HACHICH *et al.*, 2004).

A doença é caracterizada por sintomas como diarreia aquosa prolongada de coloração esverdeada ou incolor, sem muco ou sangue, vômitos, dor abdominal, náuseas e mais raramente anorexia, febre e mal-estar (WIEBBELLING, 2002). Pode ocorrer também dor de cabeça, dores musculares, indisposição, fraqueza, fadiga, perda de peso e uma variedade de problemas respiratórios (CURRENT e GARCIA, 1991).

A criptosporidiose tem duração média de 10 dias, porém em indivíduos imunodeprimidos os sintomas são crônicos com uma diarreia aquosa que pode durar meses (MELO *et al.*, 2002).

Embora o parasito possa ser difundido por todo o trato gastrointestinal ou extra intestinal, o local principal de instalação é o intestino delgado. Ocorre uma invasão do bordo luminal dos enterócitos levando ao deslocamento da borda dos microvilos e perda de epitélio de superfície, causando mudanças na arquitetura dos vilos, com atrofia vilosa, destruição e hiperplasia das células da cripta, e infiltração de células inflamatórias na lâmina própria (CHALMERS e DAVIES, 2010).

2.4.7 Epidemiologia

As pesquisas epidemiológicas indicam que a infecção em seres humanos por *Cryptosporidium* spp. é distribuída mundialmente nas populações urbana e rural tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (MEINHARDT, 1996).

Baseado na detecção de oocistos em amostras fecais, a prevalência da infecção por *Cryptosporidium* em humanos nos países africanos mostrou-se entre 2,6 e 21,3%. Já na América Central e América do Sul o índice ficou entre 3,2 e 31,5%. Nos países asiáticos a prevalência foi entre 1,3 e 13,1%. No entanto, os índices encontrados na Europa e na América do Norte provam que países desenvolvidos apresentam melhores índices quando comparados aos países em desenvolvimento com prevalência entre 0,1 e 14,1% e 0,3 e 4,3%, respectivamente (FAYER, 2004).

Estudos realizados com crianças que apresentavam 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).

Outro grupo de risco representado pelos imunossuprimidos mostram quadros mais severos da criptosporidiose. Na região do triângulo mineiro, Oliveira-Silva *et al.*, (2007) analisaram 359 amostras de fezes de pacientes com SIDA e encontraram 8,6% de positividade. Nesse mesmo trabalho foi possível mostrar o caráter oportunista do *Cryptosporidium*, pois houve uma frequência maior desse protozoário em pacientes que apresentavam diarreia e baixos níveis de linfócitos.

Mundialmente, o *Cryptosporidium parvum* tem sido reconhecido como um dos maiores contaminantes das águas de consumo, contaminação esta frequentemente associada aos altos índices de morbidade e mortalidade relacionados à presença de oocistos na água (GARRIDO, 2005).

A contaminação de oocistos de *C. parvum* e *C. hominis* em águas superficiais ou de abastecimento público assume um papel importante no comprometimento ambiental e na saúde pública (CAREY *et al.*, 2004), haja visto que inúmeros casos já foram registrados em diferentes países, inclusive no Brasil (HELLER *et al.*, 2004).

Desde a década de 80 tem sido crescente a preocupação em relação a doenças de veiculação hídrica causadas por estes protozoários. Eles são responsáveis por mais de 100 surtos de gastroenterite nos últimos 25 anos nos Estados Unidos, Canadá e em países da Europa (MARKEL, JOHN e KROTOSKI, 2003).

2.4.8 Métodos Diagnósticos da Criptosporidiose

De acordo com Vasquez *et al.* (1986), não existe unanimidade para recomendar uma técnica como sendo a melhor no diagnóstico da criptosporidiose. Porém, vale ressaltar que inúmeros métodos vêm sendo utilizados na atualidade como: métodos microscópicos, imunológicos e moleculares.

Cada método apresenta uma sensibilidade diferente, no entanto apresentam vantagens e desvantagens discrepantes como custo e aplicabilidade da técnica e por isso deve-se escolher a técnica a ser utilizada dependendo da finalidade do diagnóstico.

O diagnóstico microscópico consiste da identificação do parasito por meio do microscópico óptico. Para facilitar a identificação, métodos de concentração baseados em princípios de flutuação ou centrifugo-flutuação são utilizados. Para isto, diferentes gradientes empregados, dentre eles incluem flutuação em solução saturada de açúcar,

sulfato de zinco ou cloreto de sódio além da sedimentação utilizando solução de éter-formalina e acetato-formalina (CURRENT e GARCIA, 1991).

Para a visualização dos oocistos, após concentração, são utilizadas técnicas de coloração especiais, como: Ziehl-Neelsen ou Kinyoun modificado que são colorações álcool ácido-resistentes, dimetil sulfóxido com carbol-fucsina, coloração a quente de safranina com azul de metileno, coloração modificada de Kohn, coloração modificada de Koster que coram os oocistos em vermelho e o corante de contraste ao fundo (FAYER *et al.*, 2000; ALMEIDA, 2004; JEX *et al.*, 2008). Segundo Xiao e Cama (2006), as colorações álcool ácido-resistentes são as mais utilizadas.

Além da microscopia, que detecta oocistos presentes nas fezes, também há o diagnóstico histopatológico que detecta o *Cryptosporidium* nas microvilosidades da mucosa intestinal (CURRENT e GARCIA, 1991). Os cortes histológicos mostram estágios endógenos do parasito, no entanto a coloração utilizada não é a mesma utilizada no esfregaço de fezes, pois se utiliza hematoxilina-eosina ou Giemsa. Os parasitos podem ser prontamente identificados por suas características e localização dentro de vacúolos parasitóforos como um corpo basofílico pequeno e esférico (CHALMERS; DAVIES, 2010).

Métodos imunológicos também são utilizados para o diagnóstico da criptosporidiose. Esses métodos incluem testes com anticorpo monoclonal fluorescente, reações de aglutinação com látex, hemoaglutinação passiva reversa, imunoserologia usando a detecção de imunoglobulinas por IF ou ELISA e ensaios imunocromatográficos qualitativos de fase sólida (FAYER *et al.*, 2000).

A técnica de imunofluorescência direta (IFD) apresenta uma alta especificidade e sensibilidade segundo Jex *et al.* (2008). Esta técnica consiste de anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianeto de fluoresceína. Esses anticorpos reconhecem epítomos específicos presentes na superfície dos oocistos. Essa técnica tem como desvantagem a dependência do número de oocistos na amostra, levando a um alto grau de falso-negativo.

Os ensaios imunocromatográficos utilizados para detectar coproantígenos apresentam uma especificidade alta segundo Jex *et al.* (2008), porém podem apresentar uma sensibilidade menor que a da microscopia. Do mesmo modo, as técnicas para o sorodiagnóstico apresentam baixa sensibilidade devido ao período da janela imunológica, já que esses métodos pesquisam anticorpos contra os parasitos. No entanto, são técnicas bastante simples, rápidas e específicas, muito importante em estudos epidemiológicos (FAHEY, 2003).

Desta forma, métodos de detecção com maior sensibilidade vêm aos poucos sendo empregados, dentre eles a reação em cadeia da polimerase (FAYER *et al.*, 2005), pois possibilita detectar sequências específicas do DNA do parasito contribuindo para a elucidação da epidemiologia da criptosporidiose (HADJUSEK *et al.*, 2004; HUGHES-HANKS *et al.*, 2005).

2.4.9 Tratamento

A maioria das pessoas imunocompetentes se recupera sem a necessidade de tratamento. Até o presente, nenhum protocolo terapêutico foi descrito para combater as infecções por *Cryptosporidium*. No entanto, a reposição eletrolítica e o suporte nutricional são recomendados como parte do tratamento (CAREY *et al.*, 2004).

A administração de alguns fármacos como paramomicina e o nitazoxanide, tem sido utilizada, sendo o primeiro um antimicrobiano que reduz a excreção de oocistos (STEINER *et al.*, 1997) enquanto que o segundo tem ação antiprotozoária (ABAZA *et al.*, 1998).

Segundo Abreu *et al.* (2003) pesquisas estão sendo desenvolvidas com a utilização do colostro bovino hiperimune anti *C. parvum* como uma estratégia terapêutica promissora. Além disso, mais de 200 substâncias terapêuticas têm sido testadas contra *Cryptosporidium* incluindo antibióticos, antimaláricos, antiparasitários, antifúngicos e antivirais, sendo que algumas não têm tido sucesso na terapia (SCHNYDER *et al.*, 2009).

Em pacientes com SIDA têm sido utilizados medicamentos antirretrovirais o quais estão se mostrando eficazes por reduzir a frequência e gravidade desta doença em pacientes com HIV. Estes efeitos foram atribuídos à recuperação da imunidade do hospedeiro (ROSSIGNOL, 2010).

2.5 Giardia spp.

2.5.1 Histórico

O protozoário *Giardia* foi observado pela primeira vez por Antony van Leeuwenhoek em 1661, no entanto somente em 1859 esse parasito foi descrito detalhadamente por Vilem Lambl (MEYER, 1990).

Filice, (1952), diferenciou três espécies ao observar características morfológicas distinguíveis ao microscópio óptico como a forma dos corpos medianos, o formato e o comprimento dos trofozoítos. Assim, três espécies passaram a ser reconhecidas: *Giardia duodenalis*, *G. agilis* e *G. muris* (MONIS *et al.*, 1999). Anos mais tarde, com o emprego do microscópio eletrônico, outras espécies de *Giardia* foram descritas: *G. psittaci*, *G. microti* e *G. ardeae* (ERLANDSEN *et al.*, 1996).

2.5.2 Taxonomia

Por um longo período, a ordem taxonômica respeitou a classificação de Honiberg *et al.* (1964). Esta foi publicada pelo comitê da Sociedade de Protozoologistas após reconhecer a necessidade de revisar a classificação dos organismos do filo Protozoa (Paulino, 2005). Assim, esta classificação foi organizada em:

Filo Protozoa Goldfuss, 1818, emend. von Siebold, 1845
 Subfilo Sarcomastigophora Honiberg & Balamuth, 1963
 Super classe Mastigophora Diesing, 1866
 Classe Zoomastigophorea Calkins, 1909
 Ordem Diplomanadida Wenyon, 1926

Mais tarde, com o advento da microscopia eletrônica, Levine *et al.* (1980) revisaram a classificação de Honiberg *et al.* (1964) e propuseram um novo esquema de classificação a qual foi adotada como classificação oficial.

Sendo assim, taxonomicamente, o protozoário *Giardia* é classificado segundo Levine *et al.* (1980):

Sub-reino Protozoa Goldfuss, 1818, emend. von Siebold, 1845
 Filo Sarcomastigophora Honiberg & Balamuth, 1963
 Subfilo Mastigophora Diesing, 1866
 Classe Zoomastigophora Calkins, 1909
 Ordem Diplomadida Wenyon, 1926 emend. Brugerolle, 1975
 Subordem Diplomonadina Wenyon, 1926 emend. Brugerolle, 1975
 Família Hexamitidae Kent, 1880

Uma proposta mais recente, considerando as informações obtidas desde 1980, por meio da microscopia eletrônica, e acrescentando estudos filogenéticos moleculares, Adl *et al.* (2005) apresentaram uma nova proposta de classificação:

Fornicata Simpson, 2003

Eopharyngia Cavalier-Smith, 1993

Diplomonadida Wenyon, 1926, emend. Brugerolle *et al.*, 1975

Giardiinae Kulda & Nohynkova, 1978

Contudo, convém ressaltar que a classificação de LEVINE *et al.* (1980) ainda é a classificação oficialmente adotada.

Atualmente seis espécies são conhecidas que se encontram em diferentes hospedeiros. A tabela 4 mostra quais são essas espécies em seus respectivos hospedeiros.

TABELA 4: ESPÉCIES JÁ RECONHECIDAS COMO GÊNERO *Giardia* E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS

Espécie	Hospedeiro
<i>Giardia duodenalis</i>	Homem, mamíferos silvestres e domésticos
<i>Giardia agilis</i>	Anfíbios
<i>Giardia muris</i>	Roedores
<i>Giardia ardeae</i>	Aves
<i>Giardia psittaci</i>	Aves
<i>Giardia microti</i>	Roedores

FONTE: Adaptado de Thompson (2004).

Giardia duodenalis é a única espécie que parasita o homem. No entanto é frequentemente encontrada em outros mamíferos, incluindo animais de estimação e gado. Uma quantidade considerável de dados mostra que *G. duodenalis* deve ser considerada como um complexo de espécies, cujos membros apresentam pouca variação em sua morfologia. Todavia, com base em análises genéticas, apenas a espécie *Giardia duodenalis* pode ser atribuída a pelo menos sete conjuntos distintos (A-G) (CACCIÒ e RYAN, 2008).

Esses mesmos autores ainda analisaram mais de mil isolados de *Giardia* de humanos de diferentes localizações geográficas, examinado por PCR de DNA extraído diretamente das fezes, demonstrando que em quase todos os casos, apenas os agrupamentos A e B de *Giardia duodenalis* estão associados com infecções humanas.

Os demais genótipos são específicos de animais (MONIS *et al.*, 1999; READ *et al.*, 2004).

Recentemente, Monis *et al.* (2009), separaram os diferentes agrupamentos de *Giardia* em novas espécies. A tabela 5 mostra essa classificação mostrando que alguns dos genótipos podem ser considerados novas espécies, o que pode afetar o posicionamento das autoridades frente ao potencial zoonótico e a ameaça a saúde humana.

TABELA 5: NOVA PROPOSTA DE CLASSIFICAÇÃO DOS AGRUPAMENTOS DE *Giardia*

Espécie (Agrupamento)	Hospedeiro
<i>Giardia duodenalis</i> (A)	Homem e outros primatas, cães, gatos, bovinos, roedores e outros mamíferos silvestres
<i>Giardia entérica</i> (B)	Homem e outros primatas, cães, algumas espécies de mamíferos silvestres
<i>Giardia agilis</i>	Anfíbios
<i>Giardia muris</i>	Roedores
<i>Giardia psittaci</i>	Aves
<i>Giardia ardeae</i>	Aves
<i>Giardia microti</i>	Roedores
<i>Giardia canis</i> (C e D)	Cães e outros canídeos
<i>Giardia cati</i> (F)	Gatos
<i>Giardia bovis</i> (E)	Bovinos, ovinos e suínos
<i>Giardia simondi</i> (G)	Ratos

FONTE: ADAPTADO DE MONIS *et al.* (2009).

2.5.3 Morfologia

Giardia é um protozoário flagelado que parasita o intestino de quase todas as classes de vertebrados. Trata-se de um organismo anaeróbio, porém aerotolerante, de organização celular simples, com ausência de mitocôndrias e perixomos, mas com um sistema secretório vesicular primitivo (THOMPSON, 2004).

Esse protozoário apresenta duas formas evolutivas: os cistos e os trofozoítos (ADAM, 1991).

Os cistos são estruturas ovais de 8 a 14 µm de comprimento e 7 a 10 µm de largura. Apresentam membrana cística, dois a quatro núcleos, dois pares de corpos

medianos e axonemas (Figura 3). Esses cistos são as formas infectantes e resistentes e são eliminados através das fezes do hospedeiro podendo contaminar o ambiente e permanecendo viáveis por longos períodos (FAUBERT, 2000).

Sua resistência pode ser atribuída à presença de parede cística composta de uma camada filamentosa externa de 0,3 a 0,5 μm , que contém proteínas e galactosamina, além de uma camada membranosa interna com duas membranas (CAPIZZI-BANAS *et al.*, 2002).

Os trofozoítos apresentam dimensões de 12 a 15 μm de comprimento por 6 a 8 μm de largura. Exibe formato piriforme, simetria bilateral, dorso convexo, porção ventral côncava, dois núcleos, um par de axonemas, corpos medianos, disco adesivo ventral e quatro pares de flagelos (Figura 4). Essa forma evolutiva é móvel e não invasiva podendo ser encontrado no intestino do hospedeiro e em fezes liquefeitas (THOMPSON, 2004).

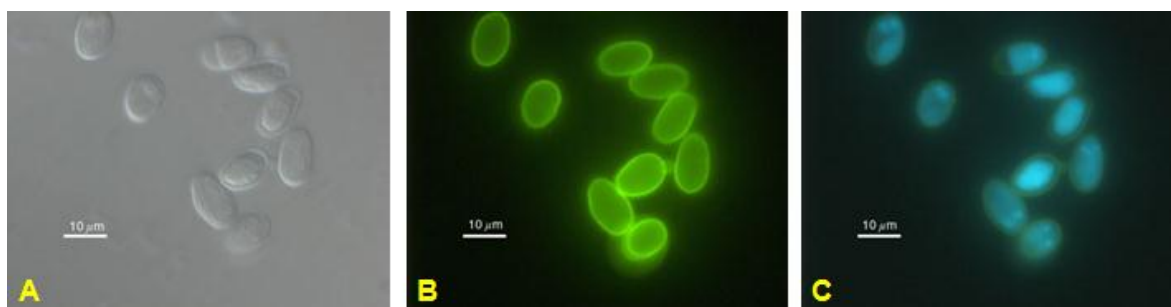


FIGURA 3 - CISTOS DE *Giardia* OBSERVADOS SOB UM AUMENTO DE 400 X. A – OBSERVAÇÃO EM MICROSCOPIA COM CONTRASTE DE FASE. B – OBSERVAÇÃO ATRAVÉS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA. C – OBSERVAÇÃO DE CISTOS CORADOS COM CORANTE FLUORESCENTE DAPI (4,6-diamidino 2-phenyl-indole dihydrochloride).

FONTE: U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.



FIGURA 4 - TROFOZOÍTOS DE *Giardia*. A – TROFOZOÍTO OBSERVADO EM MICROSCÓPIO ÓPTICO APÓS COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA FÉRRICA. B – FOTOMICROGRAFIA FEITA A PARTIR DE MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA. C – DESENHO ESQUEMÁTICO EM 3 DIMENSÕES DO TROFOZOÍTO. FONTE: AWWA (1991); DIESCHATZEN (2008); 3D SCIENCE ZYGOTE MEDIA GROUP.

2.5.4 Ciclo Biológico

A infecção do hospedeiro se inicia com a ingestão de cistos através de água ou alimentos contaminados ou pelo contato pessoa-pessoa (THOMPSON, 2004). O período de incubação desses cistos varia de 3 a 25 dias (SMITH *et al.*, 2006). O ambiente ácido do estômago inicia o processo de desencistamento que ocorre no duodeno. De cada cisto saem dois trofozoítos que aderem à parede do intestino e passam a se alimentar por pinocitose e se reproduzem por divisão binária longitudinal (MELO *et al.*, 2002). Depois inicia-se o processo de encistamento que ocorre na porção final do intestino delgado, onde os flagelos se encurtam, o citoplasma se condensa e ocorre a produção de uma membrana cística. Posteriormente as estruturas internas se duplicam resultando dois trofozoítos que permanecem ligados pelo citoplasma no interior do cisto (SCHMIDT & ROBERTS, 1981). Esses cistos são eliminados de maneira intermitente nas fezes do hospedeiro, permanecendo no ambiente e reiniciando o ciclo (Figura 5) (FAUBERT, 2000).

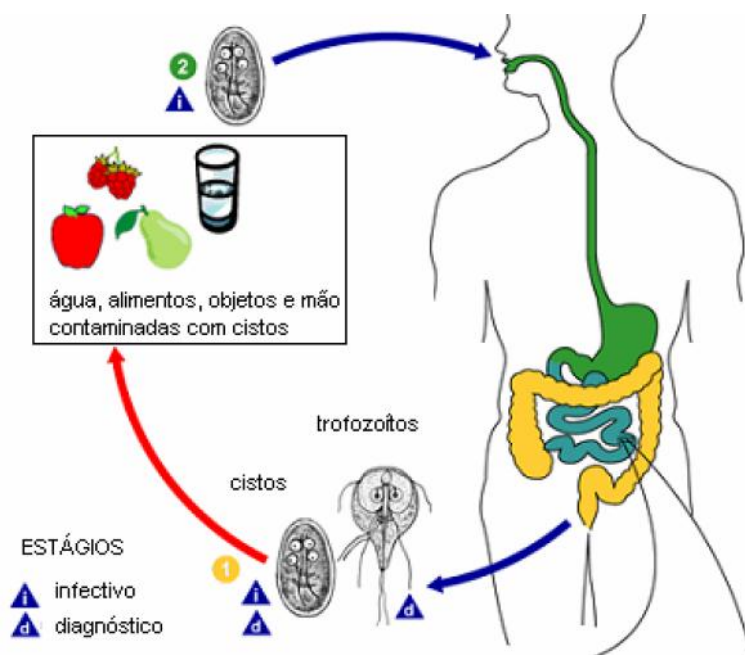


FIGURA 5: CICLO BIOLÓGICO DE *Giardia* spp.

FONTE: U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.

2.5.5 Transmissão

A transmissão de *Giardia* é por via fecal-oral pela ingestão de cistos. Nos humanos, a dose infectante é de cerca de 10-100 cistos (FURNESS *et al.*, 2000). A transmissão de *Giardia* diretamente de pessoa a pessoa pode ocorrer em ambientes onde as condições de higiene são precárias. Já a transmissão indireta ocorre pela ingestão de cistos em água ou alimentos contaminados (SCHMIDT e ROBERTS, 1981).

Os cistos são imediatamente infectantes quando excretados nas fezes e são a única forma de infecção deste protozoário. São notavelmente resistentes, podendo sobreviver por longos períodos no ambiente (SMITH *et al.*, 2006). Ortega e Adam (1997), dizem que este protozoário apresenta resistência à cloração, ao congelamento e ao aquecimento de até 60 °C, permanecendo viáveis durante dois meses no meio exterior quando em condições favoráveis. Todavia, Cardoso *et al.* (2003) atribuem a sua sobrevivência a temperaturas baixas.

Existe considerável debate quanto à transmissão zoonótica de *Giardia duodenalis*. Várias espécies animais foram consideradas como potenciais reservatórios, incluindo gado, animais de estimação e animais aquáticos (CACCIO e RYAN, 2008).

A transmissão de *Giardia duodenalis* através da ingestão de água de lazer está bem documentada. De fato, dos 325 surtos de doenças parasitárias associados à água, o

protozoário *Giardia duodenalis* foi relatado até agora como o agente causal em cerca de 40% (KARANIS, KOURENTI e SMITH, 2007).

2.5.6 Patogenia

A giardose apresenta um aspecto clínico diversificado com pacientes sintomáticos ou assintomáticos. Em geral, uma diarreia prolongada caracterizada por mal-estar, náuseas, vômitos, flatulências, fraqueza, perda de peso, desidratação e cólicas abdominais são os principais sintomas apresentados (MARKEL, JOHN e KROTOSKI, 2003; ECKMANN, 2003).

É considerada a causa mais comum de gastroenterite no mundo (FRANCO, ROCHA-EBERHARDT e CANTUSIO NETO, 2001) e a gravidade da doença é determinada pela interação entre a virulência do parasito e do desenvolvimento, nutrição e estado imunológico do hospedeiro (CACCIÒ e RYAN, 2008).

Dentre os agrupamentos de *Giardia duodenalis* que são considerados patogênicos para o ser humano há um estudo sobre a possível associação entre os agrupamentos A e B em relação à gravidade da doença, no entanto essa associação tem se mostrado até agora inconsistente. Porém, alguns estudos têm associado o agrupamento B como não sintomático em crianças menores de 5 anos de idade. Em um estudo em Bangladesh foi relatado que pacientes infectados com parasitos do agrupamento A apresentam uma probabilidade de ter diarreia duas vezes maior do que pacientes infectados com o agrupamento B e que infecções pelo agrupamento B foram estatisticamente associados com infecção assintomática por *Giardia* (SAHAGUN *et al.*, 2007).

2.5.7 Epidemiologia

Giardia duodenalis tem uma distribuição global, causando uma estimativa de 280 milhões de casos por ano. Na Ásia, África e América cerca de 200 milhões de pessoas têm giardose sintomática com cerca de 500.000 novos casos a cada ano (CACCIÒ e RYAN, 2008).

Trata-se do parasito intestinal mais comum em países desenvolvidos, sendo que a incidência de giardose, nos Estados Unidos, é estimada em 2,5 milhões de casos por ano (FURNESS *et al.*, 2000).

A prevalência de indivíduos com exames de fezes positivos para este parasito é diferente em países desenvolvidos, quando comparados com países em desenvolvimento, sendo que no primeiro a mesma apresenta-se entre 2 e 5% e no segundo 20 a 30% (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Estudos epidemiológicos têm enfatizado a pobreza, má higiene pessoal e falta de saneamento adequado como fatores, desempenhando papéis importantes na alta prevalência de giardose (MAHDY *et al.*, 2008).

No Brasil, inúmeros trabalhos foram realizados em diferentes localidades com prevalência que variaram de 21,4% em São Paulo (MASCARINI e DONALÍSIO, 2006) a 50,7% no Paraná (PITNER *et al.*, 2007).

Outro estudo no Brasil aponta uma prevalência de 4% a 30% da infecção causada por *Giardia*. Esses dados são de infecções adquiridas através da ingestão de cistos contidos em águas de rede pública com defeitos no sistema de tratamento e em ambientes coletivos como enfermarias, escolas e outros (MELO *et al.*, 2002).

Karanis *et al.* (2007) relataram que em 325 surtos de diarreia associados a transmissão de protozoários patogênicos através da água, 32% estavam relacionados à contaminação de sistemas de abastecimento por *Giardia duodenalis*. De modo que são ditos resistentes ao sistema de tratamento, há uma necessidade de monitorar o lançamento de esgoto em mananciais de abastecimento público, pois segundo Savioli *et al.* (2006) e Cacciò *et al.* (2003), esses efluentes são as principais fontes de contaminação por cistos de *Giardia*.

2.5.8 Métodos de Diagnóstico para Giardose

Os mesmos métodos de concentração são os mesmos usados no diagnóstico de criptosporidiose, sendo que para este protozoário o Método de Faust e colaboradores como princípio de centrifugo-flutuação em Sulfato de Zinco é o mais utilizado (CARDOSO *et al.*, 2003).

A sensibilidade da microscopia é um pouco limitada e depende de um microscopista treinado (SCHUURMAN *et al.*, 2007). A diferença no diagnóstico microscópico de giardose e de criptosporidiose, é que para detectar os cistos de *Giardia* não são necessários corantes especiais, pois esse protozoário apresenta um tamanho maior com estruturas bastante características visíveis na coloração pelo lugol (GOMES *et al.*, 2002).

Além destes métodos tradicionais de microscopia, a Imunofluorescência com anticorpos monoclonais, e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (CACCIÒ *et al*, 2003; PAULINO *et al.*, 2005), têm sido utilizados por diversos autores por apresentarem maior sensibilidade que os métodos tradicionais (GASPARI *et al.*, 2006). Além disso, as ferramentas de biologia molecular são importantes para a epidemiologia molecular baseado em análise filogenética e diferenciação entre genótipos de *G. duodenalis* (THOMPSON *et al.*, 2000).

2.5.9 TRATAMENTO

Atualmente, para o tratamento da giardose, dá-se absoluta prioridade aos compostos imidazólicos como tinidazol, com doses únicas de 50mg/kg a 2g para crianças e adultos respectivamente e Metronidazol, com doses de 15mg/kg/dia a 250mg três vezes ao dia durante um período de sete a dez dias (CHIEFFI, GRYSCHK E NETO, 2011). De acordo com esses mesmos autores, são disponíveis, ainda, outros derivados imidazólicos (nimozarol, secnidazol, ornidazol) que possuem a mesma eficácia dos demais e podem ser administrados no mesmo esquema do tinidazol. Concomitantemente com o tratamento utilizando fármacos, sugere-se um tratamento de suporte visando hidratação e reposição de nutrientes (CAREY *et al.* 2004).

Embora as drogas disponíveis para o tratamento da giardose sejam bastante eficazes, pacientes que apresentam certos tipos de imunodeficiências, como insuficiência de IgA secretora, costumam responder mal ao tratamento (CHIEFFI, GRYSCHK E NETO, 2011).

2.6 OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp E *Giardia* spp EM DIVERSOS AMBIENTES AQUÁTICOS

Vários surtos causados pelos parasitos *Cryptosporidium* e *Giardia* através da veiculação hídrica têm sido relatados em indivíduos imunocompetentes em várias partes do mundo, com isso vem despertando a atenção em diversos países de se pesquisar a presença desses microrganismos em amostras de água para abastecimento público, já que os mesmos oferecem resistência ao tratamento com cloro oferecido pelas companhias de saneamento (KHAN, 2008).

Assim, pesquisas têm sido realizadas em vários países visando determinar a

contaminação por esses protozoários, em águas superficiais brutas, com o objetivo de se ter conhecimento das densidades desses organismos nessas amostras.

Em um estudo de ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* no rio Atibaia em Campinas, no Brasil, foi possível detectar esses protozoários em todas as amostras coletadas usando o método de filtração em membrana e imunofluorescência direta (FRANCO; ROCHA-EBERHARDT e CANTUSIO NETO, 2001).

Em um trabalho de Dias *et al.*, (2008), no município de Viçosa, em Minas Gerais, foi possível detectar uma média de 3,62 oocistos / L de *Cryptosporidium* e 3,93 cistos / L de *Giardia* na bacia hidrográfica do Ribeirão São Bartolomeu.

NEWMAN *et al.* (2004), em Fortaleza, e GAMBA *et al.* (1997), no município de Itaquaquecetuba-SP, descreveram a ocorrência de *Cryptosporidium* em águas de poços utilizadas para o consumo, observando a ocorrência de 22,2% (18) e 100% (8) do total de amostras analisadas, respectivamente.

Em um estudo de identificação de patógenos de interesse humano realizado nas águas que margeiam a cidade do Rio Grande – RS, os autores identificaram oocistos de *Cryptosporidium* em 4,2% das 48 amostras e não encontraram *Giardia* (COSTA; MENDOZA-SASSI, 2007).

Na Espanha, foi realizado um trabalho coletando amostras na bacia hidrográfica do rio Tambre antes e depois de seis estações de tratamento. Em um total de 128 amostras foi possível detectar *Cryptosporidium* em 87,5 e 75% nos afluentes e efluentes respectivamente, enquanto que *Giardia* apresentou-se positiva em 100% das amostras. Nesse mesmo trabalho, foram quantificadas as concentrações encontradas desses parasitos, onde, nos afluentes, a concentração de *Cryptosporidium* variou de 0 a 10,5 oocistos por litro e a de *Giardia* ficou entre 1 e 12,8 cistos por litro. Já nos efluentes a concentração variou de 0 a 3 oocistos de *Cryptosporidium* e 0,5 e 4 cistos de *Giardia* por litro de água. Esse estudo prova que mesmo depois da etapa de tratamento ainda é possível detectar a presença desses protozoários (CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008).

Comumente tem sido relatada a presença dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* em amostras de águas superficiais e esgoto que incluem os afluentes, efluentes e resíduos gerados no tratamento como lodo de esgoto (ARMON *et al.*, 2002). Em relação à transmissão hídrica desses protozoários, está confirmado que o consumo de água não tratada ou de água contaminada com esgoto favorece a infecção do homem por estes parasitos (HOQUE *et al.*, 2002; JAKUBOWSKI & GRAUN, 2002).

Um estudo mostrou que em condições operacionais ótimas, a remoção de cistos de *Giardia* e oocistos *Cryptosporidium*, após a etapa de filtração, fica em torno de 99% (FRICKER e CRABB, 1998), o que indica que pequena parcela destes organismos

podem passar por esse obstáculo. Em outro estudo, Carmena *et al.* (2007), analisaram amostras de água de torneira, tratada apenas por cloração, de água bruta e água tratada de pequenas estações de tratamento de água, que adotavam processos de filtração rápida e/ou cloração e detectaram *Giardia* e *Cryptosporidium* numa média de 26,8%, 42,5% e 19,2% respectivamente para os locais de coleta.

Em seguida, na tabela 6, é apresentada uma relação de registros de ocorrência de oo/cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em diversos ambientes aquáticos.

TABELA 6: RELAÇÃO DE REGISTROS DE OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* E *Giardia* EM DIFERENTES FONTES DE ÁGUA

Autor (s)	Local	Patógeno	Amostra
ROSE (1998)	EUA	C	Rios e lagos
COLBOURNE (1989)	Inglaterra	C	ETA
KFIR <i>et al.</i> (1995)	África do Sul	CG	Água bruta e potável
CRABTREE <i>et al.</i> (1996)	EUA	CG	Água de cisternas
ZUCKERMAN <i>et al.</i> (1997)	Israel	CG	Água fluvial
JOHNSON <i>et al.</i> (1997)	Havaí	CG	Água marinha
STATES <i>et al.</i> (1997)	EUA	CG	Poço artesiano
HO e TAM (1998)	Hong-Kong	CG	Água fluvial
HANCOCK <i>et al.</i> (1998)	EUA	CG	Água subterrânea
DIAS JUNIOR (1999)	Araras - SP	CG	Rio de abastecimento
HSU <i>et al.</i> (1999)	Taiwan	CG	Água fluvial
RÉ (1999)	Araras - SP	CG	Reservatório de abastecimento
HANCOCK <i>et al.</i> (2000)	EUA	CG	Água subterrânea
HACHICH <i>et al.</i> (2000)	São Paulo - SP	CG	Reservatório de abastecimento
FRANCO <i>et al.</i> (2001)	Campinas - SP	CG	Rio de abastecimento
ARORA <i>et al.</i> (2001)	EUA	CG	Água bruta
HASHIMOTO <i>et al.</i> (2002)	Japão	CG	Água bruta e tratada
BERINO e DELUCA (2003)	Porto Alegre - RS	CG	Rio de abastecimento

FONTE: ADAPTADO DE BERINO (2004). C – *Cryptosporidium*; G - *Giardia*

2.7 MÉTODOS DE PESQUISA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* E CISTOS DE *Giardia* EM AMOSTRAS DE ÁGUA

O reconhecimento do *Cryptosporidium* e da *Giardia* como responsáveis por diversos surtos associados ao consumo ou contato com águas contaminadas por seus oo/cistos, gerou um grande interesse na pesquisa de sua ocorrência em amostras de

águas (BUTLER e MAYFIELD, 1996) e no desenvolvimento de metodologias mais sensíveis, simples, econômicas, rápidas, reprodutíveis e específicas para sua detecção, uma vez que não há um método padronizado para isto (JAKUBOWSKI *et al.*, 1996).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) desenvolveu o método 1623, para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de água. Esse método consiste de filtração, separação imunomagnética e microscopia de imunofluorescência. (FONTAINE e GUILLOT, 2003).

No entanto esse método apresenta algumas limitações como a perda de oocistos e cistos em suas diferentes etapas no procedimento e principalmente o seu alto custo. Além disso, os anticorpos utilizados não são específicos para as espécies, deste modo, são incapazes de distinguir as espécies que infectam animais e outras que não apresentam riscos à saúde do homem, eles apenas fazem a detecção (MONIS e SAINT, 2001; SOBA *et al.*, 2006; TROTZ-WILLIAMS, 2006). Desta maneira, uma variedade de técnicas tem sido desenvolvida no intuito de detectar *Cryptosporidium* e *Giardia*.

Os métodos convencionais empregados na detecção desses protozoários em amostras de água são compostos de três etapas: concentração, purificação e detecção (ANCENO *et al.*, 2007).

A concentração da amostra é necessária uma vez que esses parasitos podem ocorrer em baixas densidades no meio ambiente. Métodos de concentração por filtração, utilizando membranas de diferentes materiais e diferentes porosidades, centrifugação, cartuchos filtrantes ou ainda precipitação química, foram descritos e propostos como métodos de concentração (JAKUBOWSKI *et al.*, 1996).

A filtração utilizando membranas tem sido descrita como método com maior eficiência de concentração para pesquisas de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em amostras de água (GRACZYK *et al.* 1997).

ZUCKERMAN *et al.* (1999) também indicaram como método alternativo de concentração para grandes volumes de água, a centrifugação de fluxo contínuo, com deposição de sedimento no fundo do tubo e aspiração do sobrenadante.

A purificação serve para minimizar a quantidade de interferentes, sejam eles fragmentos orgânicos e inorgânicos, ou outros microrganismos além dos que estão sendo pesquisados diminuindo a turbidez e facilitando a visualização (CAREY *et al.*, 2004). O processo de purificação pode ser feito por separação imunomagnética, gradiente de densidade de Percoll-sucrose ou soluções de sais (JAKUBOWSKI *et al.*, 1996).

A detecção consiste na identificação a qual é a base para o diagnóstico (HSU *et al.*, 2000) e pode ser realizada pela microscopia, determinação colorimétrica, imunofluorescência e técnicas moleculares (EATON *et al.*, 2005).

Apesar de uma grande variedade de estudos mais sofisticados estarem sendo realizados e testados para pesquisa de oocistos e cistos em água como citometria de fluxo, cultura de células, métodos colorimétricos, ELISA, PCR, métodos imunoenzimáticos e eletroquimioluminescência, a imunofluorescência permanece como um dos métodos mais indicados para pesquisa desses parasitos (VESEY *et al.*, 1993; FAYER, 2004). No entanto, os métodos moleculares apresentam um maior grau de sensibilidade e de especificidade adequado ao tipo de amostra (THOMPSON, 2004).

Esses métodos moleculares são baseados na detecção dos ácidos nucleicos, como a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), e têm sido desenvolvidos para amostras ambientais a fim de melhorar a sensibilidade e rapidez na detecção de oocistos e cistos de protozoários. (JAKUBOWSKI *et al.*, 1996; JOHNSON *et al.*, 1995). Além disso, são métodos que garantem especificidade e facilidade na interpretação dos resultados (MCGLADE *et al.*, 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que pode ser definida como um método rápido de amplificação de segmentos alvos da molécula de DNA ou RNA. Sua especificidade decorre da precisão com que os oligonucleotídeos iniciadores hibridam com o DNA alvo. Com a PCR pode-se amplificar sequências que estão presentes em números extremamente baixos de cópias em uma amostra (LEETZ *et al.*, 2007), conferindo-lhe assim uma alta sensibilidade. A mesma é aplicável quando há pouca quantidade de oocistos e cistos, melhorando a sensibilidade de detecção, e permitindo diferenciar espécies e genótipos (CHALMERS; DAVIES, 2010). A técnica permite amplificar milhares de vezes uma única molécula de DNA alvo. Devido a sua grande sensibilidade e especificidade, ela tem sido usada em amostras clínicas e ambientais (ALMEIDA, 2004).

Uma das variações da PCR é a Nested-PCR. Esta é um método sensível, no qual o produto amplificado na primeira PCR é submetido a um segundo processo de amplificação, utilizando um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores complementares às sequências internas do segmento já amplificado. O segundo par de iniciadores usados sempre amplifica uma sequência menor de que o primeiro par. Este procedimento torna a reação da PCR mais específica e sensível (ALMEIDA, 2004; HUBER, 2007; OSAKI, 2009).

A PCR-RFLP (*Restricion Fragment Length Polymorphism*) é usada para amplificar uma região de um gene de interesse. Seu princípio é a digestão dos produtos da PCR ou da Nested-PCR por enzimas de restrição. Estas enzimas clivam o DNA em sítios específicos, resultando em fragmentos de diferentes tamanhos que podem ser visualizados pela eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Este método detecta

variações mínimas num gene onde uma única substituição de base pode criar um sítio capaz de ser digerido pelas endonucleases, ou abolir o sítio de restrição (ALMEIDA, 2004; HUBER, 2007). Essa técnica é atualmente aplicada para a determinação de espécies e genótipos (HUBER, 2007; JEX *et al.*, 2008).

O sequenciamento de DNA é uma técnica que determina a sequência de nucleotídeos de um determinado fragmento alvo ou do genoma de um organismo, possibilitando a identificação das espécies de patógenos analisando as regiões específicas do genótipo através da bioinformática (LEETZ *et al.*, 2007). A análise da sequência de DNA permite-nos identificar as variações genéticas ou polimorfismos entre as espécies de organismos e continua sendo o padrão-ouro para detectar essas variações (JEX *et al.*, 2008).

Assim, a diversidade e complexidade de métodos para detecção destes parasitos na água têm dificultado e criado polêmica entre os pesquisadores. Entretanto, há um consenso entre os pesquisadores, em que a identificação de um determinado parasito deve ser confirmada com mais de um método (GOMES *et al.*, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MUNICÍPIO DE COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

O município de Foz do Iguaçu está localizado no extremo oeste do estado do Paraná fazendo divisa com Paraguai e Argentina (Figura 6). Possui uma área territorial de 589,00 km² e com uma população de 258.543 habitantes. Apresenta uma altitude de 173 m e clima subtropical úmido mesotérmico com temperaturas médias anuais que variam entre 33 e 40 °C no verão, podendo atingir temperaturas abaixo de zero durante a passagem de frentes frias (FOZ DO IGUAÇU, 2010; Secretaria Municipal de Comunicação Social - SMCS, 2010).



FIGURA 6 – LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU – PR
FONTE: FOZ DO IGUAÇU (2010).

3.2 LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA – RIO TAMANDUÁ

A Bacia do rio Tamanduí constitui o principal manancial para abastecimento público no município de Foz do Iguaçu. Esta Bacia percorre os municípios de Foz do

Iguaçu e Santa Terezinha de Itaipu e possui uma área de 14.534,09 hectares. Da nascente até a estação de captação da SANEPAR possui uma extensão de 11.300 m e largura média de 10 m. O rio cruza regiões periféricas no sentido sudoeste até desaguar no final da bacia do baixo Iguaçu, na jusante das quedas.

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

Para averiguar a qualidade da água do rio Tamanduá perante padrões microbiológicos, parasitológicos e físico-químicos, amostras de água *in natura* foram coletadas. Os locais de coleta foram previamente delimitados em nove pontos (numerados de 1 a 9) estrategicamente escolhidos devido a proximidade da estação de captação da Sanepar e da frequência de banhistas devido ao fácil acesso (Figuras 7 e 8).

Foram realizadas três coletas com um intervalo de dois meses entre uma e outra. A primeira coleta ocorreu no mês de maio, a segunda no mês de julho e a última no mês de setembro, todas durante o ano de 2010. As amostras foram coletadas em dois recipientes diferentes. Para a pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* utilizou-se embalagens plásticas de cinco litros, descontaminadas em lâmpada ultravioleta, por três horas. Já para a identificação de bactérias, as amostras foram coletadas em frascos de vidro, previamente descontaminados, com capacidade de 250 mL contendo agente quelante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O volume coletado foi o máximo permitido pela embalagem.

Para o transporte das amostras até o local de realização das análises, as mesmas foram identificadas e armazenadas em caixas térmicas, conforme instruções da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB (1997).

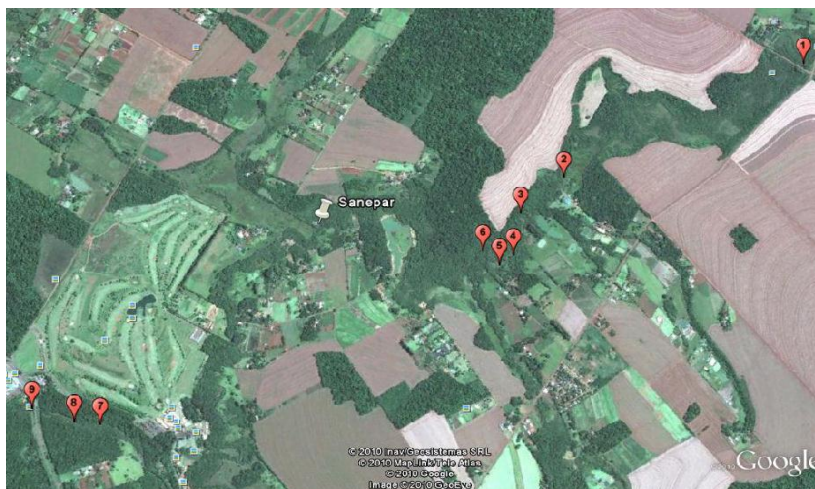


FIGURA 7 – LOCALIZAÇÃO DO RESERVATÓRIO DE ÁGUA PARA ABASTECIMENTO PÚBLICO DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU, DE RESPONSABILIDADE DA COMPANHIA DE SANEAMENTO DO PARANÁ (SANEPAR) E PONTOS DE COLETA DE AMOSTRA DE ÁGUA ENUMERADOS DE 1 A 9.

FONTE: GOOGLE EARTH, 2010



FIGURA 8 – LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA *IN NATURA* NO RIO TAMANDUÁ. CORRESPONDENTES AOS PONTOS ENUMERADOS NA FIGURA 7.

FONTE: O AUTOR

3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

Para a execução do trabalho, a análise da água foi dividida em duas etapas (Figura 9). A primeira etapa consistiu de análises físico-químicas, microbiológicas e parasitológicas, utilizando técnicas bioquímicas e de microscopia óptica. Estas foram realizadas no Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu – PR. A segunda etapa consistiu na aplicação de técnicas de biologia molecular para comparar a especificidade e sensibilidade das técnicas de microscopia óptica. Estas foram realizadas no laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

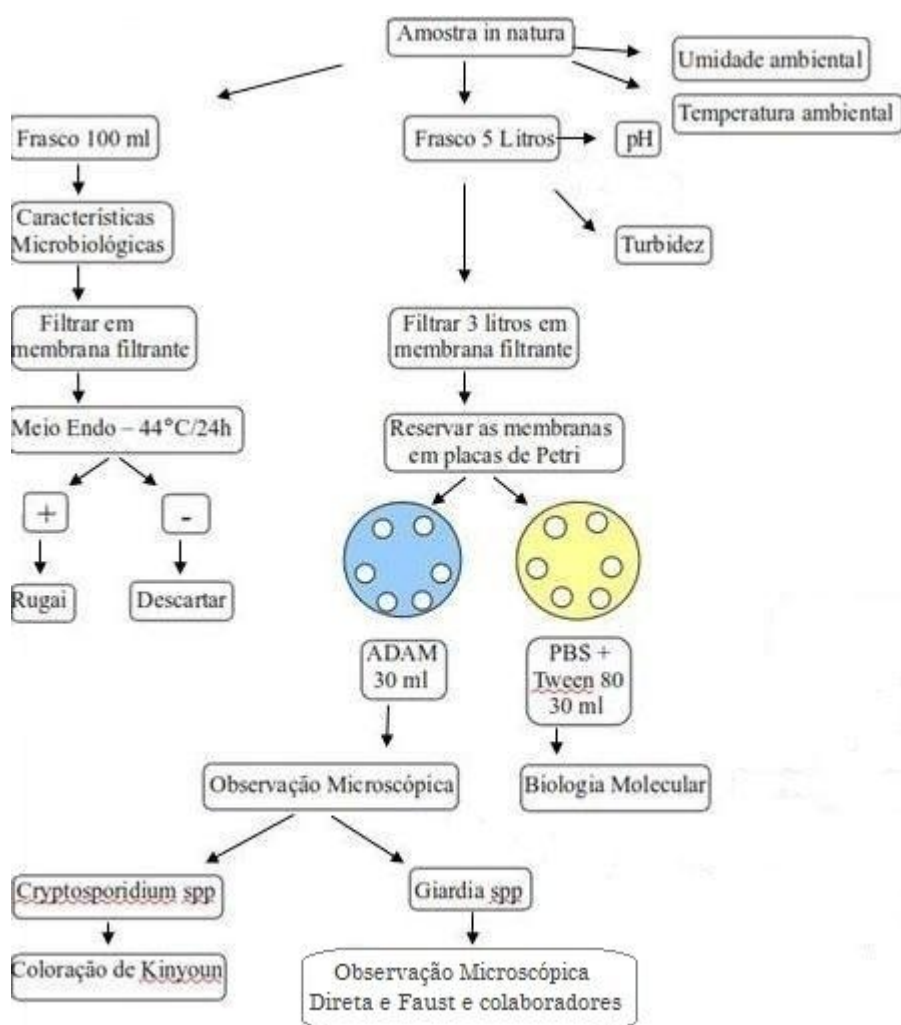


FIGURA 9 – ESQUEMA APRESENTANDO AS ETAPAS DE EXECUÇÃO DO TRABALHO

FONTE: O AUTOR

3.4.1 Análise físico – química da água

Para a determinação da umidade relativa do ar foi utilizado um higrômetro e para temperatura um termômetro, sendo ambos os aparelhos digitais da marca Instrutherm. Os aparelhos foram aproximados aos locais de coleta permitindo a detecção da umidade relativa do ar e a temperatura local.

A determinação do pH (potencial de Hidrogênio) da água realizou-se através do método eletrométrico, em uma alíquota de 100 mL do volume total coletado utilizando o medidor de pH por calibração HI 221 da marca HANNA instrutherm.

Para a determinação da turbidez da água foi utilizado um turbidímetro da marca Solar, modelo SL 2K.

3.4.2 Análise microbiológica da água

A quantificação de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* foi determinada utilizando a técnica da membrana filtrante (Figura 10). A técnica consistiu na filtragem de 100 mL da amostra através de membrana filtrante com porosidade de 0,45 μm , e transferência da mesma para uma placa de Petri contendo meio de cultura Ágar Endo (AE) para coliformes. Em seguida foram incubadas por 24 horas a 35 °C para pesquisa *E. coli* e, posteriormente, a 44 °C para coliformes termotolerantes. Foi feito também um controle negativo, onde 100 mL de água deionizada, esterilizada em autoclave e deixada no micro-ondas durante três minutos (ADAM¹), foram filtradas em uma nova membrana e esta transferida para AE e incubadas sob as mesmas temperaturas que as amostras.

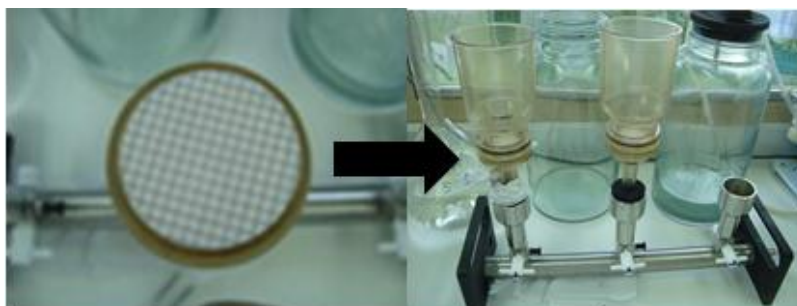


FIGURA 10 – APARATO UTILIZADO NA TÉCNICA DE MEMBRANA FILTRANTE

FONTE: O AUTOR:

1 – ADAM: Abreviação utilizada para se referir à água deionizada, esterilizada em autoclave e deixada no micro-ondas durante três minutos. É utilizado o micro-ondas para estourar a estrutura do parasito, pois mesmo depois de ser inviabilizado com o processo de esterilização em autoclave, a estrutura pode permanecer e oferecer um resultado falso positivo.

Após o período de incubação, as colônias que se desenvolveram foram classificadas conforme sua coloração e contadas com o auxílio de uma lupa. As diferentes colorações variaram de rosa a vermelho-escuro com brilho verde metálico.

Para a identificação das espécies, as colônias foram transferidas para meio de Rugai (Newprov) seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Foram visualizadas as características bioquímicas como, por exemplo, a produção de gás, sacarose e H₂S, reação ao indol e motilidade. Para a quantificação das mesmas realizaram-se os cálculos para que os resultados pudessem ser expressos em UFC 100 mL (unidades formadoras de colônia por 100 mL) e assim serem comparados com os permitidos pela legislação vigente.

3.4.3 Análise parasitológica da água

Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* utilizou-se 3 litros de água que foram filtradas a vácuo em membrana de celulose de 0,45 µm da Millipore. As membranas saturadas após a filtração foram colocadas em placas de Petri esterilizadas onde foram lavadas para desprender o material retido (Figura 11).

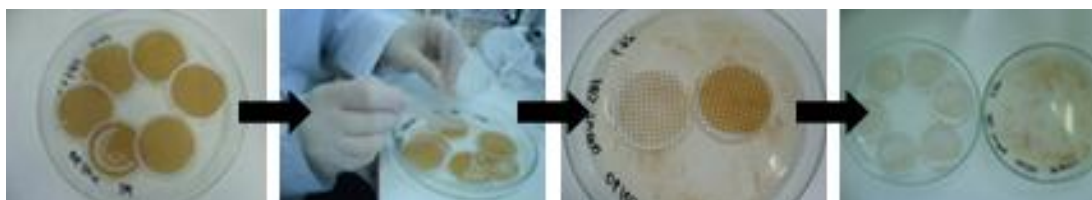


FIGURA 11 – PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DO MATERIAL RETIDO APÓS FILTRAÇÃO A VÁCUO.

FONTE: O AUTOR

Foram utilizadas 12 membranas para a filtração total de três litros, sendo estas trocadas a cada 250 mL aproximadamente. O procedimento de lavagem das membranas foi dividido em lavagem utilizando ADAM para técnicas de microscopia e PBS (*Phosphate Buffer Saline*) + *Tween 80* para técnicas de biologia molecular. Para isto, as membranas utilizadas foram separadas em duas placas de Petri, ou seja, seis membranas foram lavadas com ADAM e as demais com PBS + *Tween 80*. Para recuperar o material retido na membrana após a filtração, foram utilizadas ponteiros de 5 mL para raspar o sedimento sobre a membrana.

O volume do líquido utilizado para a lavagem foi de 30 mL para cada placa. Após a lavagem, transferiu-se o líquido utilizado para três tubos esterilizados. Deste modo os tubos foram identificados com o número do ponto coletado acrescentando A, B ou C e informando qual foi o líquido de lavagem utilizado (Figura 12).

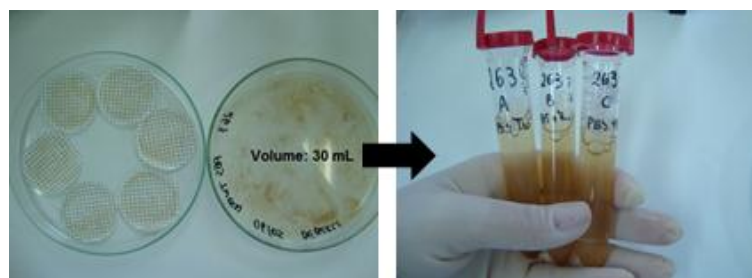


FIGURA 12 – SEDIMENTO RECUPERADO APÓS LAVAGEM DAS MEMBRANAS
FONTE: O AUTOR

Os tubos foram submetidos à centrifugação durante 10 minutos a 4000g desprezou-se o sobrenadante, deixando aproximadamente 1 mL do sedimento. Aqueles contendo *PBS + Tween 80* como líquido de lavagem, tiveram o sedimento transferido para microtubos do tipo *Eppendorf* e centrifugados novamente durante 10 minutos a 4000g. Em seguida foram congelados para posterior realização das técnicas de biologia molecular.

Para a pesquisa microscópica de oocistos de *Cryptosporidium* foram preparadas duas lâminas contendo cada uma 100 μ L do sedimento resultante da centrifugação. Estas foram coradas pelo método de Kinyoun e observadas em microscópio óptico em aumento de 1000 vezes, sob imersão.

Já para a pesquisa de cistos de *Giardia*, o sedimento foi observado em microscópio através de exame direto corado com lugol e através da técnica de Faust e colaboradores (1939) com o princípio de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco com densidade de 1.180. Para este protozoário foram analisadas duas lâminas, uma para cada técnica com um volume aproximado de 20 μ L de sedimento em cada uma.

Sendo assim, foram feitas duas lâminas para a pesquisa de *Cryptosporidium* e duas para a pesquisa de *Giardia*. No entanto, foi feito uma triplicata em cada ponto coletado, sendo assim, para cada ponto de coleta foram analisados 6 lâminas para a pesquisa de *Cryptosporidium* e 6 para a pesquisa de *Giardia*. De modo que foram escolhidos nove pontos para a coleta da amostra, é possível dizer que foram feitas 162 lâminas para a pesquisa de cada protozoário.

3.4.3.1 Detecção dos oocistos de *Cryptosporidium* pelo método de Kinyoun

Para a detecção dos oocistos foi utilizada a técnica de coloração álcool – ácido resistente, que é um dos métodos mais recomendados para a detecção dos oocistos de *Cryptosporidium* (RIGO; FRANCO, 2002). Para realizar este método foi confeccionado esfregaço fino utilizando 100 µL do sedimento, resultante da centrifugação, e seco a temperatura ambiente. Depois de seco, o sedimento foi fixado em álcool metílico por 5 minutos e seco novamente. Em seguida a lâmina foi submersa em fucsina básica a 6 % durante 3 minutos e enxaguada em ADAM. Depois a lâmina foi descorada com ácido clorídrico 0,5 % em álcool etílico 70 % durante 2 minutos. E por último, a lâmina foi coberta por azul de metileno durante 1 minuto, lavada com ADAM e seco a temperatura ambiente. Depois de preparada, a lâmina foi analisada em microscópio óptico sob um aumento de 1000 x.

3.4.3.2 Detecção dos cistos de *Giardia* pelo método de Faust e colaboradores (1939)

Ao sedimento foram adicionados 10 mL de ADAM e centrifugou-se a suspensão durante um minuto a 4000g. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e acrescentado solução de sulfato de zinco (densidade 1,180) até que atingisse 10 mL de volume e centrifugado por um minuto a 4000g. Após esta centrifugação, formou-se uma película de onde foram retiradas as amostras com auxílio de alça de platina previamente flambada e colocada em lâminas, corada com lugol e coberta com lamínula para análise ao microscópio óptico em 400 x aumento.

3.4.4 Amostras de *Cryptosporidium* e *Giardia* usadas como controle

Parte dos oocistos de *Cryptosporidium* foi adquirido 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. Outra parte desses oocistos foi obtida a partir de fezes de bezerros infectados naturalmente, purificados por técnica de gradiente de sacarose, gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Adriana Oliveira Costa da Universidade Federal de Minas Gerais. Os cistos de *Giardia*, obtidos a partir de fezes humana, foram cedidos pelas

Professoras Dra. Débora do Rocio Klisiowicz e Dra. Marcia Kiyoe Shimada do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

O controle positivo foi utilizado para confirmar a aplicabilidade e sensibilidade da técnica de membrana filtrante. Para este fim, duas amostras de material fecal purificadas com gradiente de sacarose foram utilizadas para contaminação experimental da água. Ambas apresentavam 7500 oocistos / mL de *Cryptosporidium* e 7500 cistos / mL de *Giardia*.

Em seguida, 750 oocistos de *Cryptosporidium* e 750 cistos de *Giardia* foram utilizados para contaminar separadamente três litros de água ultrapura. Após homogeneização, a água contaminada experimentalmente foi submetida à filtração em membrana e teve seu processamento idêntico ao utilizado com as amostras de água do rio Tamanduá para posterior cálculo do índice de recuperação de oocistos e cistos.

Do mesmo modo, foi realizado um controle negativo utilizando água deionizada, esterilizada em autoclave e passada no micro-ondas por três minutos a fim de descartar a hipótese de contaminação do material utilizado.

3.5 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS OOCISTOS DE *Cryptosporidium* E CISTOS DE *Giardia* EM GRADIENTE DE SACAROSE E CLORETO DE SÓDIO

Os mesmos oocistos e cistos utilizados no controle de membrana no item anterior foram previamente contados para a realização de diferentes diluições para verificar a sensibilidade da purificação seguida de extração de DNA e submetida à reação em cadeia pela polimerase (PCR).

As diluições utilizadas para o teste de sensibilidade para detecção de DNA de *Cryptosporidium* foram: 15, 60, 150, 300, 1500 e 7500 oocistos/mL. Já para *Giardia* as diluições foram: 12, 120, 300, 400, 800 e 1200 cistos/mL. Em seguida, todas essas diluições foram submetidas à purificação em gradiente de sacarose (1 M) e de cloreto de sódio (d= 1.180) e novamente contadas para averiguar o índice de recuperação após purificação. Esse procedimento foi repetido cinco vezes para posterior análise estatística.

3.5.1 Purificação de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em gradiente de sacarose (PAULINO, 2005 – modificado)

Foi preparada uma suspensão de sacarose 1 M (densidade específica 1,11) e

colocado 5 mL da suspensão em tubos de plástico com capacidade para 15 mL. O sedimento armazenado em microtubos do tipo *Eppendorf* foi suspenso em 3 mL de água ultra pura (miliQ) e lavado 4 vezes (4000g por 15 minutos). Depois foi novamente suspenso em 3 mL de água ultrapura. Em seguida, o mesmo foi depositado lentamente sobre a solução de sacarose, escorrendo o material pela parede do tubo com ajuda de uma pipeta de *Pasteur*. O tubo contendo a suspensão de sacarose e a amostra foi submetido a uma centrifugação de 3000g durante 20 minutos. Posteriormente, os cistos/ooquistos foram removidos da interface água-sacarose e transferidos para novos tubos de 15 mL onde foram suspensos em 12 mL de água ultrapura e centrifugados a 4000g durante 10 minutos. Depois dessa centrifugação foi desprezado o sobrenadante deixando apenas 1mL aproximadamente de sedimento o qual foi transferido e armazenado em microtubos de 2,0 mL do tipo *Eppendorf* e lavado com água ultra pura 3 vezes a 12.000g durante 5 minutos.

Logo após a etapa de purificação, o sedimento foi diluído em 0,5 mL de água ultrapura para contagem dos ooquistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*.

A modificação da técnica proposta pelo autor ocorreu nos volumes das soluções, no tempo e velocidade de rotação durante a centrifugação e a suspensão da amostra por agitação manual ao invés da agitação mecânica.

3.5.2 Purificação de ooquistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em gradiente de cloreto de sódio (KAR *et al*, 2010 - modificado)

Foi preparada uma solução de cloreto de sódio (densidade específica de 1,180) e adicionado 10 mL da mesma em tubos plásticos com capacidade para 15 mL. O sedimento armazenado em microtubos do tipo *Eppendorf* foi suspenso em 1 mL de água ultra pura e depositado lentamente pela parede do tubo sobre a suspensão de NaCl. Em seguida o material foi homogeneizado lentamente, por inversão do tubo duas vezes. Sobre o mesmo foi depositado cuidadosamente 1 mL de água ultrapura gelada para precipitação. Toda essa suspensão foi submetida a uma centrifugação de 2300g durante 10 minutos. Após a centrifugação foi formada uma interface entre a água fria e o NaCl e com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* a interface foi recuperada e transferida para outro tubo plástico de 15 mL. Foram adicionados aproximadamente 10 mL de PBS ao novo tubo plástico contendo a interface recuperada e em seguida essa suspensão foi centrifugada apenas uma vez a 2300g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado deixando restar apenas 1 mL de sedimento o qual foi transferido e armazenado em

microtubos do tipo *Eppendorf*. O objetivo de centrifugar apenas uma vez após adição do PBS é minimizar a perda de material e o autor propõe duas etapas de centrifugação.

O sedimento resultante da purificação foi utilizado para contagem dos oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*.

3.5.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney (U-test), utilizando o software PAST versão 2.1 (HAMER, 2003).

Foram realizadas análises comparando os índices de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em água após purificação em gradiente de sacarose e NaCl. As análises serviram para comparar os dois métodos de purificação e identificar qual o método é estatisticamente significativo perante a porcentagem de recuperação dos parasitos.

3.6 ANÁLISES MOLECULARES

As amostras filtradas que foram lavadas com PBS + *Tween* 80 foram transportadas ao laboratório de parasitologia molecular para que fossem purificadas, submetidas à extração de DNA, seguida de PCR, N-PCR (Nested – PCR) e sequenciamento.

3.6.1 Extração de DNA

Foram utilizados dois protocolos de extração: fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989) e outro com Kit de extração de DNA ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen™).

Tanto as amostras de água *in natura* (sem ter sido purificada) contaminadas experimentalmente com oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, quanto as amostras de água purificadas em gradiente de sacarose e cloreto de sódio, foram submetidas aos dois protocolos de extração de DNA.

3.6.1.1 Extração de DNA pelo ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen™)

O procedimento deste método consiste na adição de 1 mL de tampão de lise ao sedimento das amostras que foram submetidos a 15 ciclos de congelamento (- 80 °C) e descongelamento (55 °C). O objetivo dessa etapa é romper a parede dos protozoários com o intuito de otimizar e melhorar a ação esperada do Kit.

Em seguida, foram adicionados 20 µL de proteinase K, agitado mecanicamente e incubado a 55 °C em banho-maria sob agitação. O tempo de incubação desta etapa foi de 2 horas para *Cryptosporidium* e 3 horas para *Giardia*. Após incubação, 10 µL de RNase A foram adicionados, homogeneizados cuidadosamente por inversão e incubados a temperatura ambiente por 2 minutos.

Após essas etapas, 120 µL de solução de partículas magnéticas foram adicionadas nas amostras, homogeneizando-as 5 vezes com o auxílio de uma pipeta e, em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão de purificação e homogeneizado 10 vezes. Os tubos foram colocados na estante magnética por dois minutos e o sobrenadante foi, então, retirado e descartado. Depois os tubos foram retirados da estante e as partículas magnéticas foram lavadas 2 vezes com 1 mL de tampão de lavagem.

Novamente os tubos foram colocados na estante magnética por 2 minutos ou até o clareamento da amostra. Depois o sobrenadante foi descartado e foi adicionado sobre as partículas 150 µL de tampão de eluição, seguido de homogeneização e incubação por 5 minutos a 55 °C. Os tubos foram levados até a estante magnética por 2 minutos e o material eluído foi transferido para microtubos de 0,6 mL e armazenados no congelador a - 20 °C.

3.6.1.2 Extração de DNA pelo método clássico (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Primeiramente foi adicionado 1 mL de PBS (pH 7,4) ao sedimento que foi submetido a 15 ciclos de congelamento e descongelamento (- 80 °C e 55 °C, respectivamente). Em seguida a amostra foi submetida à agitação mecânica e centrifugada a 3500g durante 15 minutos. Depois foi retirado o máximo de sobrenadante e descartado, deixando apenas o sedimento. Foram adicionados 450 µL de tampão de lise (o mesmo utilizado no Kit de extração), 50 µL de SDS 10 % e 6 µL de proteinase K. Toda essa suspensão foi novamente agitada e incubada a 56 °C em banho-maria por 5

horas. Depois deste período, a proteinase foi inativada a 90 °C. Assim que esfriada, foram adicionados 2 µL de RNase, agitado e incubado por mais 2 horas a 37 °C.

Em seguida, foi feita a desproteinização e remoção dos restos celulares adicionando 1 mL de fenol homogeneizando por 15 minutos e depois centrifugado a 12000g por 5 minutos a 20 °C. Com o auxílio de uma pipeta foi retirado o máximo de sobrenadante e transferido para outro tubo onde foi adicionado fenol-clorofórmio, homogeneizado por 10 minutos e novamente centrifugado a 12000 g por 5 minutos a 20 °C. Mais uma vez o sobrenadante foi removido cuidadosamente e transferido para outro tubo onde foi adicionado 500 µL de clorofórmio e homogeneizado lentamente por 10 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 9000 g por 5 minutos a 20 °C, retirado o sobrenadante e transferido para novo microtubo de 2 mL.

Por último, o DNA foi precipitado adicionando 600 µL de etanol absoluto, homogeneizado delicadamente, adicionado 30 µL de acetato de sódio a 3 M (10 %), homogeneizado novamente e mantido no congelador (- 20 °C), por um período de 12 horas. Depois foi centrifugado a 12000 g, por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e, em seguida, foram adicionados 300 µL de etanol 70 % e centrifugado a 12000 g, por 15 minutos, a 4 °C. Foi descartado o sobrenadante por inversão e os tubos foram colocados em estufa a 37 °C, para secagem. Depois que o DNA estava totalmente seco, o mesmo foi suspenso manualmente em 100 µL de TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0). Posteriormente o DNA foi armazenado no congelador à 20 °C negativos.

3.6.1.3 Análise da eficiência da extração de DNA.

Para ter um controle de extração de DNA, foram utilizadas algumas diluições menores do que as que foram usadas para o teste de sensibilidade para detecção de DNA de *Cryptosporidium* e *Giardia* após purificação. Sendo assim foram utilizadas diluições de, 1,5; 3,7; 7,5; 15; 60 e 150 oocistos de *Cryptosporidium*/mL e 1,2; 3; 6; 12; 120 e 300 cistos de *Giardia*/mL. As amostras diluídas foram submetidas à extração de DNA pelo Kit comercial e, posteriormente, utilizadas para PCR. O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1,6 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Após determinar a eficiência da extração de DNA utilizando o Kit comercial da Invitrogen a partir de amostras purificadas em NaCl, todas as extrações de DNA das amostras de água do rio Tamandúá foram realizadas concomitantemente com amostras de oocistos e cistos purificados a fim de se obter um controle positivo de extração.

9.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase para detecção de DNA de *Cryptosporidium*

Para a amplificação de DNA de *Cryptosporidium* foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene 18SSU rRNA. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados amplificam uma região hipervariável de 1325 pb na PCR (XIAO *et al.*, 1999). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, bem como os componentes e as condições de amplificação utilizadas para a detecção de DNA de *Cryptosporidium* na amostra de água são mostrados nas tabelas 7, 8 e 9.

TABELA 7: OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA TÉCNICA DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *Cryptosporidium*

	INICIADORES	SEQUÊNCIA 5'→3'	TAMANHO DO FRAGMENTO
PCR	XIAO F	TTCTAGAGCTAA TACATCCG	1325 pb*
	XIAO R	CCCATTTCTTCGAAACAGGA	

FONTE: XIAO *et al.*, 1999.

TABELA 8: REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Cryptosporidium* E AS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NA PCR.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO DE USO	VOLUME POR REAÇÃO
Tampão - 10 X	1X	2,5 µL
MgCl ₂ - 50 Mm	3 mM	1,5 µL
dNTP - 10 Mm	0,2 mM	0,5 µL
Primer F - 10 pmol/µL	20 pmol/µL	2,0 µL
Primer R - 10 pmol/µL	20 pmol/µL	2,0 µL
Taq Platinum Polimerase – 5U/µL	1,25 U	0,25 µL
Triton – 100%	0,1%	0,25 µL
Água ultrapura	qsp*	11,0 µL
DNA	-----	5 µL
Volume final	-----	25 µL

*qsp – quantidade suficiente para

TABELA 9: CONDIÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO USADA NA TÉCNICA DE PCR PARA PESQUISA DE *Cryptosporidium*

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	94 °C	3 minutos
35 ciclos	94 °C	45 segundos
	55 °C	45 segundos
	72 °C	1 minuto
1 ciclo	72 °C	7 minutos

A amplificação foi realizada em termociclador (Bio-Rad®) no laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica e os produtos da amplificação foram armazenados a - 20 °C até a realização da eletroforese.

3.6.3 Nested – PCR para detecção de *Cryptosporidium*

Para melhorar a sensibilidade da PCR, foi realizada uma Nested-PCR utilizando-se um segundo par de oligonucleotídeos iniciadores localizados internamente à região hipervariável do gene 18SSU rRNA. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na N-PCR amplificam um fragmento com tamanho entre 826 a 864 pb (Tabela 10) (XIAO *et al.*, 1999).

A Nested-PCR amplifica um fragmento interno daquele que foi amplificado na PCR convencional. Para isto, utiliza-se um par de iniciadores diferente do primeiro, deste modo, amplifica-se uma sequência menor do que o primeiro par.

Os componentes utilizados para a segunda amplificação são mostrados na tabela 11 e a condição utilizada está na tabela 9.

TABELA 10: OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA TÉCNICA DE N-PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *Cryptosporidium*

INICIADORES	SEQUÊNCIA 5'→3'	TAMANHO DO FRAGMENTO
N-PCR	XIAO 1 (R) AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	826 a 864 pb
	XIAO 2 (F) GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	

FONTE: XIAO *et al.*, 1999.

TABELA 11: REAGENTES UTILIZADOS NA *NESTED* - PCR E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Cryptosporidium*.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO DE USO	VOLUME POR REAÇÃO
Tampão - 10 X	1X	2,5 µL
MgCl ₂ - 50 mM	3 mM	1,5 µL
dNTP - 10 mM	0,2 mM	0,5 µL
Primer F - 10 pmol/µL	20 pmol/µL	2,0 µL
Primer R - 10 pmol/µL	20 pmol/µL	2,0 µL
Taq Platinum Polimerase – 5U/µL	1,25 U	0,25 µL
Triton – 100%	0,1%	0,25 µL
Água ultrapura	qsp*	13,0 µL
DNA (produto de PCR)	----	3 µL
Volume final	----	25 µL

*qsp – quantidade suficiente para

3.6.4 Reação em Cadeia da Polimerase para detecção de *Giardia*

A PCR utilizada para amplificação do DNA de *Giardia* foi realizada utilizando um par de oligonucleotídeos indicadores que permite a amplificação do gene responsável pela produção da proteína HSP de *Giardia duodenalis* (ABBASZADEGAN, *et al.*,1993 *apud* ROCHELLE *et al.*,1997) gerando um produto de 163 pares de base.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores bem como os componentes e as condições de amplificação utilizadas para a detecção de DNA de *Giardia* na amostra de água são mostrados nas tabelas 12, 13 e 14.

TABELA 12: OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA TÉCNICA DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *Giardia*.

	INICIADORES	SEQUÊNCIA 5'→3'	TAMANHO DO FRAGMENTO
PCR	ABB97 F	AGGGCTCCGGCATAACTTTCC	163 pb
	ABB220 R	GATCTGTGACCCGTCCGAG	

FONTE: ABBASZADEGAN, *et al.*,1993 *apud* ROCHELLE *et al.*,1997

TABELA 13: REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Giardia* E AS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NA PCR.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO DE USO	VOLUME POR REAÇÃO
Tampão - 10 X	1X	6 µL
MgCl ₂ - 50 mM	2,5 mM	3 µL
dNTP - 10 mM	0,2 mM	2,4 µL
Primer F - 10 pmol/µL	12,0 pmol/µL	1,2 µL
Primer R - 10 pmol/µL	12,0 pmol/µL	1,2 µL
Taq Platinum Polimerase – 5U/µL	1,25 U	0,25 µL
Água ultrapura	qsp*	39,95 µL
DNA	----	6 µL
Volume final	----	60 µL

*qsp – quantidade suficiente para

TABELA 14: CONDIÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO USADA NA TÉCNICA DE PCR PARA PESQUISA DE *Giardia*.

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	94 °C	2 minutos
	94 °C	1 minuto
40 ciclos	56 °C	1 minuto
	72 °C	2 minutos
1 ciclo	72 °C	5 minutos

A amplificação foi realizada em termociclador (Bio-Rad®) no laboratório de parasitologia molecular do Departamento de Patologia Básica e os produtos da amplificação foram armazenados a - 20 °C até a realização da eletroforese.

3.6.5 Teste de sensibilidade da PCR e controles positivo e negativo

As amostras extraídas do item 9.6.1.3 foram utilizadas como controles positivos e uma alíquota de água ultra pura esterilizada em autoclave foi utilizada como controle negativo com a finalidade de avaliar a sensibilidade da técnica de PCR, eliminando os riscos de resultados falso-negativos, falso-positivos ou de contaminações indesejadas.

Na PCR e N-PCR para a pesquisa de *Cryptosporidium*, utilizou-se como controle positivo amostra que continha DNA de 1500 oocistos / mL. Já para PCR realizada na pesquisa de *Giardia*, foi utilizado amostra que continha DNA de 1200 cistos / mL.

3.6.6 Eletroforese em Gel de Agarose 1,6%

Os produtos amplificados foram visualizados após a eletroforese em gel de agarose preparado a 1,6 % em tampão TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM).

No gel foram aplicados 5 µL dos produtos de PCR ou N-PCR junto com 1 µL de azul de bromofenol. A corrente elétrica aplicada foi de 60 V quando realizada em cuba de eletroforese pequena e 70 V nas cubas grandes.

Para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados utilizou-se um marcador de peso molecular (massa molecular de DNA) de 1 kb (Invitrogen™).

Após a separação dos produtos de PCR e N-PCR por eletroforese, o DNA foi corado com brometo de etídio durante 20 minutos e visualizado em fonte ultravioleta com exposição de 10 segundos e, em seguida, o gel foi fotografado para documentação.

3.6.7 Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Big Dye da Applied Biosystems 3130®. Os produtos amplificados foram quantificados no *Nanodrop® ND – 1000 spectrophotometer* e normalizados a 125 ng/µL com um volume final de 50 µL. A partir dessa diluição, 10 µL do volume total foram purificados com 2 µL de enzima exosap. Depois de adicionada a enzima, a suspensão foi incubada a 37 °C por 1 hora e depois a enzima foi inativada recebendo um choque térmico através da incubação a 80 °C durante 20 minutos (COSTA-RIBEIRO, 2006).

Para a reação de sequenciamento, 1 µL do produto purificado foi utilizado para uma concentração final de 125 ng/µL. Os componentes e as condições de amplificação utilizadas são mostrados nas tabelas 15 e 16.

TABELA 15: REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

REAGENTES	VOLUME POR REAÇÃO
Tampão Big Dye	1 µL
Big Dye	1 µL
Primer F ou R	1 µL
Produto Amplificado 125ng/µL)	1 µL
Água ultrapura	6 µL
Volume final	10 µL

TABELA 16: CONDIÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO USADAS NO SEQUENCIAMENTO DE *Cryptosporidium*.

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96 °C	1 minuto
	96 °C	10 segundos
25 ciclos	50 °C	5 segundos
	60 °C	4 minutos
1 ciclo	4 °C	∞

Depois da reação de sequenciamento, foi feita a precipitação do DNA segundo Costa-Ribeiro (2006). Para isto, foram adicionados 80 µL de isopropanol (65 %), homogeneizado e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente. Depois, foi centrifugado a 19000 g por 25 minutos. Em seguida o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e sobre o sedimento que restou foram adicionados 200 µL de etanol a 70 %. Novamente o material foi centrifugado a 19000g durante 10 minutos e todo o sobrenadante foi removido e deixando o *pellet* restante secar. Depois de seco, o mesmo foi suspenso em 3 µL de formamida e colocado no sequenciador.

As sequências foram obtidas e analisadas através do programa Staden Package, utilizando o Pregap 4 e o Gap4. Depois de formada a sequência consenso, a mesma foi exportada para o programa MEGA “Molecular Evolutionary Genetics” v. 4.1. e posteriormente submetidas ao Blast para confirmação dos resultados.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE FÍSICO – QUÍMICA

As características físico-químicas analisadas foram temperatura e umidade ambiente, pH e turbidez da água, sendo que as duas primeiras foram obtidas no local da coleta e as demais logo que chegaram ao laboratório. A tabela 17 refere-se aos resultados obtidos nessas análises.

O ponto 6 apresentou em todas as coletas os maiores valores de turbidez (tabela 17). Esse resultado corroborou com os resultados de detecção dos protozoários nesse ponto.

TABELA 17: ANÁLISES FÍSICO–QUÍMICAS (TEMPERATURA E UMIDADE AMBIENTE, PH E TURBIDEZ DA ÁGUA) REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA COLETADAS EM TRÊS ETAPAS NOS NOVE PONTOS (P1 A P9) DO RIO TAMANDUÁ, FOZ DE IGUAÇÚ, PR, EM 2010.

	Pontos de coleta	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
1° Coleta	Temperatura (°C)	27,2	26,3	27,4	29,9	32,6	30,4	24,8	24,2	26,6
	Umidade	48%	59%	53%	43%	40%	47%	66%	65%	54%
	pH	6,87	6,83	6,91	6,81	6,66	6,89	7,00	7,09	6,99
	Turbidez (UNT**)	15,9	16,7	13,1	15,5	14,6	24,3*	11,8	10,9	19,2
2° Coleta	Temperatura (°C)	23,4	24,0	24,0	25,4	25,5	22,8	21,2	21,6	21,0
	Umidade	69%	59%	64%	59%	55%	69%	76%	79%	79%
	pH	6,82	6,88	6,85	6,65	6,63	6,65	6,49	6,82	7,23
	Turbidez (UNT)	8,71	9,26	8,97	9,42	9,13	9,63*	6,56	7,54	6,33
3° Coleta	Temperatura (°C)	26,4	26,7	26,2	26,8	27,3	25,3	27,0	27,0	28,4
	Umidade	43%	40%	42%	56%	39%	45%	37%	35%	43%
	pH	6,96	6,89	6,90	6,90	6,97	6,95	7,01	7,00	7,02
	Turbidez (UNT)	6,24	6,61	6,97	8,49	7,64	8,65*	6,43	6,47	6,27

* Maiores níveis de turbidez

** Unidades Nefelométricas de Turbidez

FONTE: O AUTOR

4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As características macroscópicas mostraram a presença de três tipos diferentes de colônias de bactéria apresentando diferentes cores: rosado, vermelho e vermelho com brilho verde metálico (Figura 13).

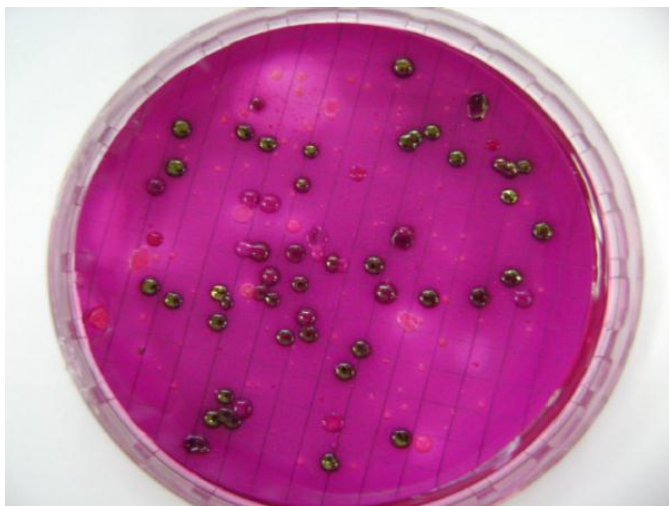


FIGURA 13 – CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS OBTIDAS PELA INCUBAÇÃO DAS MEMBRANAS EM MEIO ENDO A 35°C POR 24 HORAS, SEGUIDA DE NOVA INCUBAÇÃO A 44°C POR MAIS 24 HORAS.

FONTE: O AUTOR.

Foram encontrados três tipos de bactérias: *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp. e *Proteus vulgaris* identificadas pela prova bioquímica. A tabela 18 apresenta os resultados com o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada tipo de bactéria e em cada ponto coletado.

TABELA 18: QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS DE ACORDO COM OS NOVE PONTOS (P1 A P9) NAS TRÊS COLETAS REALIZADAS NO RIO TAMANDUÁ, FOZ DE IGUAÇÚ, EM 2010.

	1º Coleta			2º Coleta			3º Coleta		
	(05/2010)			(07/2010)			(09/2010)		
	EC	EB	PV	EC	EB	PV	EC	EB	PV
P1	576	384	-	170	149	21	231	180	21
P2	384	288	-	341	192	63	242	195	21
P3	480	240	-	234	127	21	244	211	42
P4	336	192	-	234	85	42	213	192	63
P5	288	144	-	319	127	42	207	192	21
P6	240	96	-	384	192	21	209	144	38
P7	240	96	-	362	234	42	228	96	42
P8	336	144	-	384	63	21	181	144	63
P9	336	192	-	277	231	38	231	149	21

EC: *Escherichia coli*; EB: *Enterobacter* sp; PV: *Proteus vulgaris*;

FONTE: O AUTOR

A bactéria prevalente foi a *Escherichia coli*, com quantidades que variaram de 170 a 576 UFC/100mL. O ponto 1 apresentou maior número de colônias seguido do ponto 3, ambos na primeira coleta.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* E *Giardia* PELA MICROSCOPIA ÓPTICA

Foram analisadas um total de 162 lâminas para cada protozoário. Apenas uma lâmina apresentou uma estrutura bastante compatível com a do *Cryptosporidium* (Figura 14). Esta lâmina corresponde ao ponto 6 (Figura 15) da primeira coleta. No entanto, como trata-se de um protozoário de tamanho bastante reduzido, sem estruturas internas visíveis ao aumento analisado (1000 x), foi preciso confirmar o resultado através de técnicas mais sensíveis e específicas como a PCR.

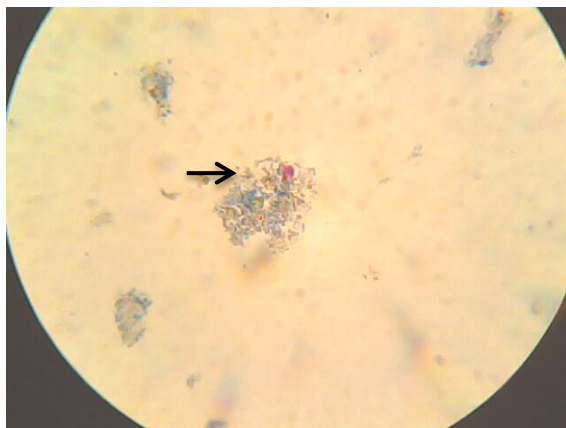


FIGURA 14 – ESTRUTURA COMPATÍVEL COM A DO OOCISTO DE *Cryptosporidium* EM MICROSCOPIA ÓPTICA SOB UM AUMENTO DE 1000x E CORADO PELO MÉTODO DE KINYOUN

FONTE: O AUTOR



FIGURA 15 – PONTO DE COLETA NÚMERO 6

FONTE: O AUTOR

Para a pesquisa de cistos de *Giardia*, foram lidas 81 lâminas preparadas diretamente com o sedimento recuperado. Depois foi realizada a técnica de Faust e colaboradores e analisadas mais 81. Apenas com a microscopia não foi possível encontrar nenhuma estrutura compatível com a do cisto desse protozoário.

4.4 TAXA DE RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* E CISTOS DE *Giardia* APÓS FILTRAÇÃO EM MEMBRANA

Foram utilizadas duas amostras controle para a contaminação experimental de

dois volumes de 3 L de água ultra pura. Uma amostra controle possuía 7500 oocistos de *Cryptosporidium* / mL e a outra 7500 cistos de *Giardia* / mL. No entanto, apenas 100 µL de cada amostra controle foram utilizados para fazer a contaminação dos dois volumes de água, ou seja, apenas 750 oocistos e cistos / mL.

A partir do sedimento recuperado (volume de 1 mL), foi feita a contagem da taxa de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*. O volume do sedimento total (1 mL) foi homogeneizado e apenas 20 µL foram utilizados para o preparo das lâminas. Nestes 20 µL foi possível contar 11 oocistos de *Cryptosporidium* e 13 cistos de *Giardia* e, obtendo-se assim um índice de recuperação de 73,34 % e 86,67 %, respectivamente. A contagem dos oocistos de *Cryptosporidium* foi realizada em microscopia com contraste de fase.

No controle negativo não foi encontrada nenhuma estrutura que fosse compatível com a dos protozoários, descartando a hipótese de contaminação do material.

4.5 TAXA DE RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* E CISTOS DE *Giardia* APÓS PURIFICAÇÃO EM GRADIENTE DE SACAROSE E CLORETO DE SÓDIO

As diluições utilizadas para verificar a eficiência na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* foram: 15, 60, 150, 300, 1500 e 7500 oocistos / mL. Para *Giardia*, foram: 12, 120, 300, 400, 800 e 1200 cistos / mL.

Depois de purificadas tanto através do gradiente de sacarose quanto em cloreto de sódio, todas as diluições foram novamente contadas. Esse processo foi repetido 5 vezes para fazer uma análise estatística (tabelas 20 e 22) com os índices de recuperação que estão expressos em porcentagem (tabelas 19 e 21).

Para ambos os protozoários, o melhor método de purificação de amostra de água foi através de gradiente de NaCl, pois apresentou uma porcentagem de recuperação melhor quando comparada com a recuperação dos oocistos e cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia*, respectivamente, após purificação em gradiente de sacarose

TABELA 19: PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* EM AMOSTRAS DE ÁGUA APÓS PURIFICAÇÃO EM CLORETO DE SÓDIO (KAR *et al*, 2010) E EM SACAROSE (PAULINO, 2005) REALIZADA EM DIFERENTES DILUIÇÕES (15 A 7500) E EM CINCO REPETIÇÕES.

Repetições / Diluições	1	2	3	4	5
15	66,6'0,0"	80,0'0,0"	80,0'0,0"	80,0'0,0"	66,6'0,0"
60	83,3'0,0"	66,6'0,0"	66,6'0,0"	83,3'0,0"	66,6'0,0"
150	86,6'0,0"	73,3'0,0"	86,6'0,0"	80,0'0,0"	80,0'0,0"
300	86,6'0,0"	76,6'0,0"	80,0'0,0"	86,6'0,3"	83,3'0,0"
1500	84,6'0,5"	84,6'0,3"	87,3'0,9"	86,0'0,7"	85,3'0,8"
7500	79,7'1,0"	77,8'0,8"	79,6'0,9"	72,6'0,7"	76,2'0,8"

* Resultados em porcentagem (%). (') Resultados para NaCl. (") Resultados para Sacarose.
 FONTE: O AUTOR.

TABELA 20: COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. EM ÁGUA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE FLUTUAÇÃO EM NaCl E SACAROSE.

	NaCl	Sacarose	p<0,05*
15	11,2 ± 1,09	-	-
60	44 ± 5,47	-	-
150	122 ± 8,37	-	-
300	248 ± 13,04	-	-
1500	1284 ± 16,73	10 ± 3,53	*
7500	5792 ± 218,79	67,8 ± 8,41	*

(-) não foi possível comparar. (*) resultado significativo.
 FONTE: O AUTOR.

Para a análise da eficiência de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em água observou-se diferenças significativas somente nas diluições 1500 e 7500, nas demais não foi possível realizar as comparações devido o índice de recuperação em sacarose ter sido nulo. No entanto, em números absolutos, a recuperação através da técnica de purificação em gradiente de NaCl foi maior.

TABELA 21: PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE CISTOS DE *Giardia* EM AMOSTRAS DE ÁGUA APÓS PURIFICAÇÃO EM CLORETO DE SÓDIO (KAR *et al*, 2010) E EM SACAROSE (PAULINO, 2005) REALIZADA EM DIFERENTES DILUIÇÕES (15 A 7500) E EM CINCO REPETIÇÕES.

Repetições/Diluições	1	2	3	4	5
12	83,3'0,0"	91,6'0,0"	83,3'0,0"	75,0'0,0"	75,0'0,0"
120	95,0'0,0"	93,3'0,0"	81,6'0,0"	85,8'0,0"	90,8'0,0"
300	86,6'0,6"	93,4'1,3"	80,0'0,0"	76,6'0,0"	80,0'0,0"
400	85,0'1,2"	90,0'2,7"	87,5'2,2"	80,0'1,7"	80,0'1,2"
800	82,5'0,0"	72,5'3,1"	76,2'2,6"	73,7'2,0"	72,5'1,7"
1200	82,5'1,3"	86,6'2,5"	85,0'2,4"	81,6'1,5"	80,8'0,0"

* Resultados em porcentagem (%). (') Resultados para NaCl. (") Resultados para Sacarose.

FONTE: O AUTOR

TABELA 22: COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DE CISTOS DE *Giardia* sp. EM ÁGUA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE FLUTUAÇÃO EM NaCl E SACAROSE.

	NaCl	Sacarose	p<0,05*
12	9,8 ± 0,84	-	-
120	107,2 ± 6,61	-	-
300	250,0 ± 20,0	1,2 ± 1,79	*
400	338,0 ± 17,89	7,4 ± 2,61	*
800	604,0 ± 33,62	15,2 ± 9,52	*
1200	1000 ± 29,15	18,8 ± 12,39	*

(-) não foi possível comparar. (*) resultado significativo.

FONTE: O AUTOR.

Para cistos de *Giardia* presentes em água foram observadas diferenças significativas entre as duas técnicas nas seguintes diluições: 300, 400, 800 e 1200. As diluições 12 e 120 não foram testadas, pois a recuperação de cistos em sacarose foi nula. Os resultados comprovam a maior eficiência da técnica de concentração por NaCl quando comparada a de sacarose para cistos de *Giardia* presentes em água.

4.6 ANÁLISES MOLECULARES

4.6.1. Análise da eficiência dos métodos de extração de DNA

Comparando os dois métodos de extração de DNA (fenol – clorofórmio e Kit comercial), o Kit comercial apresentou melhor desempenho tanto por apresentar maior

sensibilidade quanto por possuir manuseio mais rápido e simplificado. Foi possível detectar o DNA do protozoário a partir da diluição de 15 e 1,5 oocistos de *Cryptosporidium*, respectivamente pela PCR e N-PCR (Tabela 23 e Figura 16). Para o teste de sensibilidade para a detecção do DNA de *Giardia*, a diluição de 3 cistos foi suficiente para a detecção (Tabela 24 e Figura 17).

TABELA 23: ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA POR FENOL-CLOROFÓRMIO E KIT COMERCIAL PELA AMPLIFICAÇÃO POR PCR E N-PCR DE DNA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium*.

		Oocistos de <i>Cryptosporidium</i>						
		Diluições	1,5	3,7	7,5	15	60	150
PCR	Kit comercial		-	-	-	+	+	+
	Fenol-clorofórmio		-	-	-	-	+	+
N-PCR	Kit comercial		+	+	+	+	+	+
	Fenol-clorofórmio		-	-	-	+	+	+

(-): SEM AMPLIFICAÇÃO; (+): PRESENÇA DE PRODUTO AMPLIFICADO
 FONTE: O AUTOR.

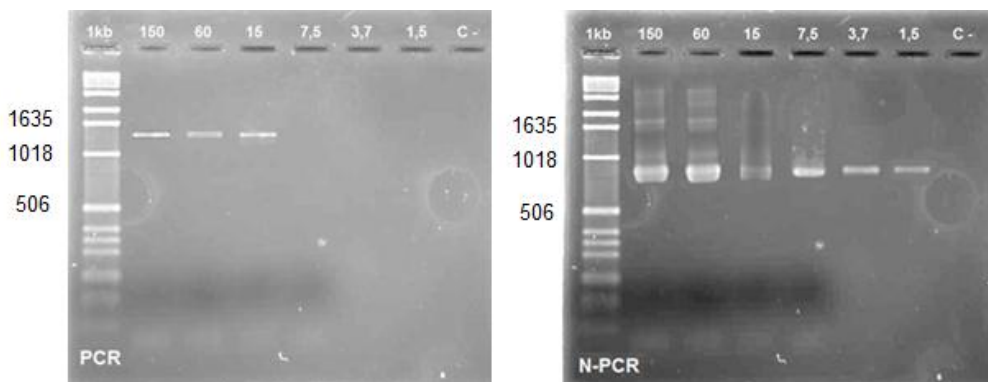


FIGURA 16 – GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO A EFICIÊNCIA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA UTILIZANDO O KIT COMERCIAL E A SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS DE PCR E N-PCR NA DETECÇÃO DE DNA DE *Cryptosporidium*, EVIDENCIANDO OS PRODUTOS AMPLIFICADOS A PARTIR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES XIAO - F E XIAO - R (PCR) E XIAO - 1 E XIAO - 2 (N-PCR), CONTENDO 1325 E 826 A 864 PARES DE BASES RESPECTIVAMENTE; 1KB: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR (INVITROGEN®); 150; 60; 15; 7,5; e 3,7: QUANTIDADE DE OOCISTOS / mL; C - : CONTROLE NEGATIVO.

TABELA 24: ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA POR FENOL-CLOROFÓRMIO E KIT COMERCIAL PELA AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE DNA DE CISTOS DE *Giardia*.

	Cistos de <i>Giardia</i>					
Diluições	1,2	3	6	12	120	300
Kit comercial	-	+	+	+	+	+
Fenol-clorofórmio	-	-	-	+	+	+

(-): DETECÇÃO NEGATIVA; (+): DETECÇÃO POSITIVA
 FONTE: O AUTOR

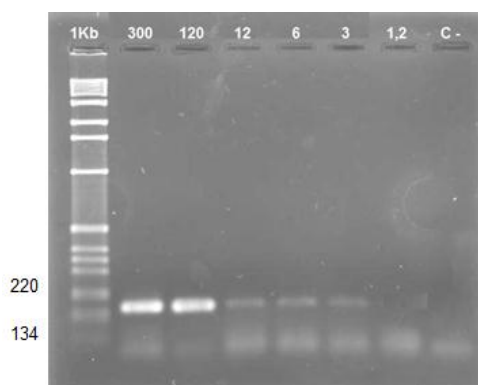


FIGURA 17 - GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO A EFICIÊNCIA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA UTILIZANDO O KIT COMERCIAL E A SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE PCR NA DETECÇÃO DE DNA DE *Giardia*, EVIDENCIANDO OS PRODUTOS AMPLIFICADOS A PARTIR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ABB97 - F E ABB220 - R CONTENDO 163 PARES DE BASES; 1KB: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR (INVITROGEN®); 300; 120; 12; 6; 3 E 1,2: QUANTIDADE DE CISTOS / mL; C - : CONTROLE NEGATIVO.

4.6.2 PCR e N-PCR das amostras

Para a amostra de água de cada ponto de coleta, a PCR foi realizada duas vezes obtendo-se uma duplicata para ambos os protozoários. Cada sedimento recuperado após filtração em membrana foi dividido em três alíquotas denominadas A, B e C. A alíquota A, teve o DNA utilizado para fazer PCR para os dois parasitos servindo como repetição, a B para *Cryptosporidium* e a C para *Giardia*.

Na primeira coleta a técnica de PCR permitiu a detecção de DNA de *Cryptosporidium* e de *Giardia* no ponto de coleta número 6.

Para a detecção de DNA de *Cryptosporidium*, foi necessário fazer também N-PCR. No entanto na alíquota A, foi possível detectar presença de DNA deste protozoário

apenas com a PCR, porém na sua duplicata correspondente (B) não apareceu banda, necessitando assim, fazer a N-PCR (Figuras 18 e 19).

Depois de fazer N-PCR, as duas alíquotas correspondentes do ponto 6 (A e B) mostraram-se positivas, podendo desta forma dizer que foi possível detectar amplificação de DNA de *Cryptosporidium* na amostra de água deste ponto.

Apenas com base no resultado da PCR, a alíquota B seria dada como negativa em todos os pontos de coleta.

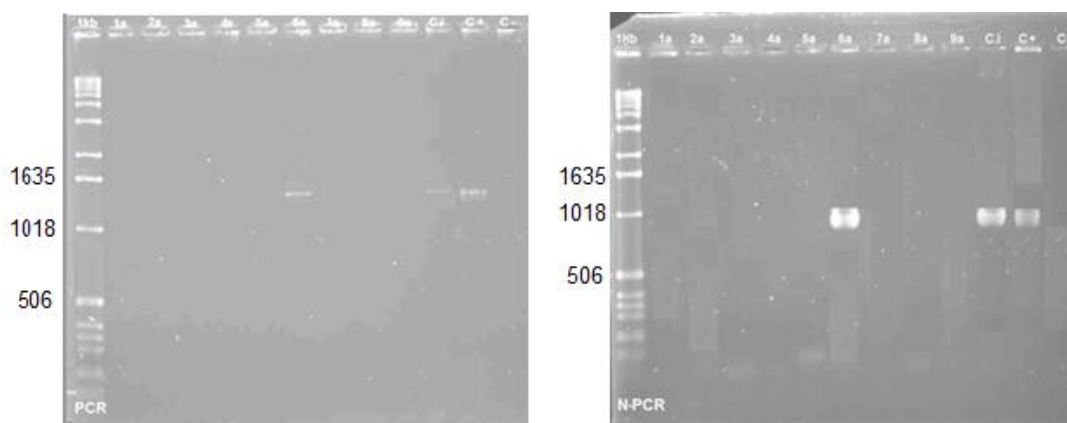


FIGURA 18 – GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO OS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR E N-PCR, DA ALÍQUOTA A, CONTENDO 1325 E 826 A 864 PARES DE BASES RESPECTIVAMENTE DIAGNOSTICANDO *Cryptosporidium* spp. NO PONTO 6 NA PRIMEIRA COLETA; 1KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA:1 AO 9A. C.I: CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+: CONTROLE POSITIVO; C-: CONTROLE NEGATIVO.

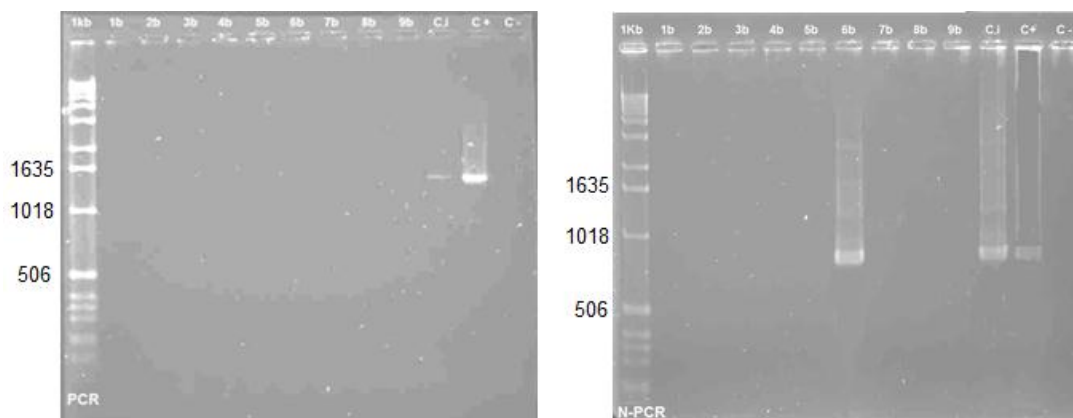


FIGURA 19 – GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO OS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR N-PCR, DA ALÍQUOTA B, CONTENDO ENTRE 826 A 864 PARES DE BASES DIAGNOSTICANDO *Cryptosporidium* spp NO PONTO 6 NA PRIMEIRA COLETA; 1KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA:1 A 9B. C.I: CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+: CONTROLE POSITIVO; C-: CONTROLE NEGATIVO.

No diagnóstico de *Giardia* foi possível detectar a presença do DNA desse protozoário a partir da técnica de PCR tanto na alíquota A quanto na alíquota C, ambas no ponto 6 (figura 20 e 21).

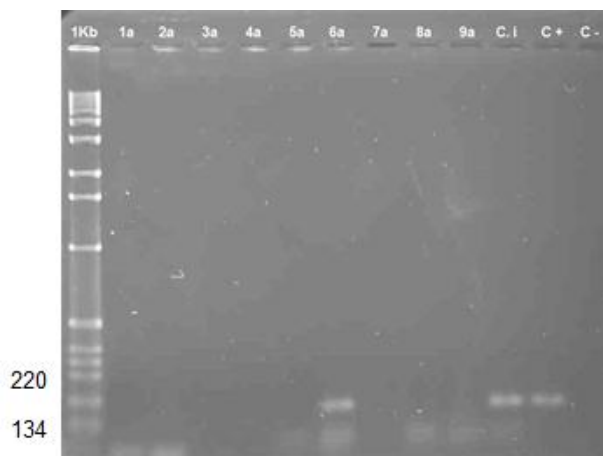


FIGURA 20 – GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO PRODUTO AMPLIFICADO POR PCR, DA ALÍQUOTA A, CONTENDO 163 PARES DE BASES DIAGNOSTICANDO *Giardia duodenalis* NO PONTO 6 NA PRIMEIRA COLETA; 1 KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA:1 A 9A. C.I – CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+= CONTROLE POSITIVO. C-= CONTROLE NEGATIVO.

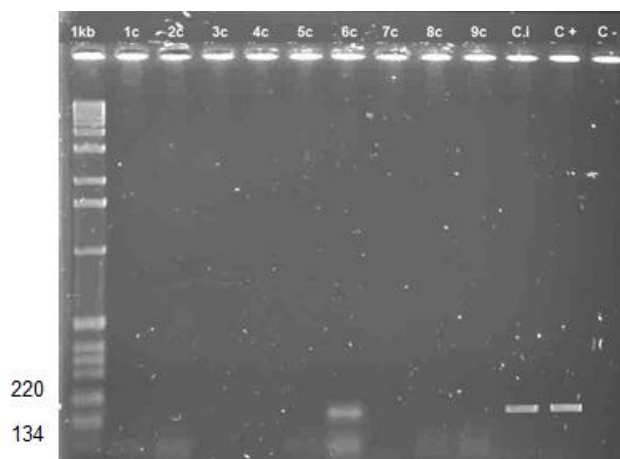


FIGURA 21 – GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO PRODUTO AMPLIFICADO POR PCR, DA ALÍQUOTA C, CONTENDO 163 PARES DE BASES DIAGNOSTICANDO *Giardia duodenalis* NO PONTO 6 NA PRIMEIRA COLETA; 1 KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA:1 A 9C. C.I – CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+= CONTROLE POSITIVO. C-= CONTROLE NEGATIVO

Na segunda coleta não houve detecção de DNA de nenhum dos protozoários pesquisados em nenhuma das alíquotas. Contudo, os controles positivos, tanto de extração quanto de PCR, funcionaram. É possível afirmar, portanto, que as amostras foram negativas descartando a possibilidade de um resultado falso negativo. Então a metodologia aplicada estava de acordo e nenhum erro ocorreu já que os controles positivos apresentaram-se coerentes.

Na terceira e última coleta não foi possível detectar DNA de *Cryptosporidium* em nenhuma das amostras. No entanto, os controles positivos novamente apresentaram-se coerentes, descartando assim, a possibilidade de resultados falsos negativos.

Com relação à *Giardia*, nas amostras da terceira coleta, a PCR permitiu a detecção de DNA novamente no ponto 6 em suas duas alíquotas (A e C), ou seja, nas duas repetições (Figuras 22 e 23).

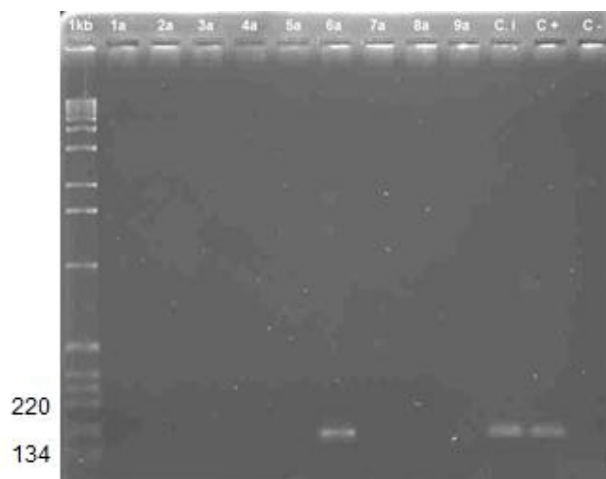


FIGURA 22 - GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO PRODUTO AMPLIFICADO POR PCR, DA ALÍQUOTA A, CONTENDO 163 PARES DE BASES DIAGNOSTICANDO *Giardia duodenalis* NO PONTO 6 NA TERCEIRA COLETA; 1 KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA: 1 A 9A. C.I – CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+= CONTROLE POSITIVO. C-= CONTROLE NEGATIVO.

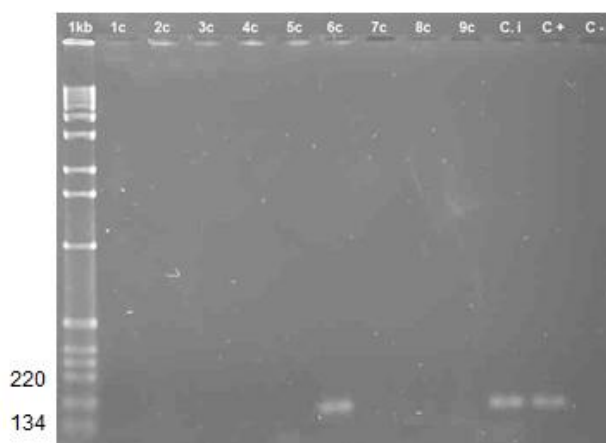


FIGURA 23 - GEL DE AGAROSE 1,6 % MOSTRANDO PRODUTO AMPLIFICADO POR PCR, DA ALÍQUOTA C, CONTENDO 163 PARES DE BASES DIAGNOSTICANDO *Giardia duodenalis* NO PONTO 6 NA TERCEIRA COLETA; 1 KB – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PONTOS DE COLETA: 1 A 9A. C.I – CONTROLE INTERNO DE EXTRAÇÃO; C+= CONTROLE POSITIVO. C-= CONTROLE NEGATIVO.

Diante do apresentado, o ponto 6 foi o único que apresentou contaminação por ambos os protozoários pesquisados, sendo que foi possível detectar *Cryptosporidium* apenas na primeira coleta e a detecção de *Giardia* ocorreu na primeira e na última coleta.

4.6.3 Resultados do Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento apenas das amostras que se apresentaram positivas para *Cryptosporidium* spp. após realizadas a PCR e a N-PCRA. De modo que apenas no ponto 6 na primeira coleta foi possível detectar esse protozoário, somente uma amostra teve seu produto de amplificação sequenciado, além dos controles de extração de DNA e de PCR para aumentar a confiabilidade do resultado.

A sequência obtida foi analisada pelo algoritmo (ferramenta *on line*) BLAST. Essa ferramenta mostrou que a sequência analisada apresentou identidade genotípica compatível com *Cryptosporidium parvum*, apresentando 99 % de similaridade (nº de acesso no *GenBank*: JN247404.1). Os controles também apresentaram 99 % de máxima identidade com a esta espécie.

Não foi realizado o sequenciamento dos produtos amplificados utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ABB97 – F e ABB220 – R, pois de acordo com o algoritmo BLAST, este par de iniciadores foram depositados para a espécie *Giardia duodenalis* apresentando 100 % de grau de cobertura e 100 % de máxima identidade (nº de acesso no *GenBank*: X16738.1). Além disso, para este iniciador um produto de *Giardia muris* poderia ser detectado com 526 pb e não 163 pb como o que foi encontrado neste trabalho.

5 DISCUSSÃO

Mundialmente, os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* têm sido reconhecidos como um dos maiores contaminantes das águas de consumo, contaminação esta frequentemente associada aos altos índices de morbidade (GARRIDO, 2005).

A maioria dos agentes veiculados por água, tal qual *Cryptosporidium* e *Giardia*, apresentam difícil detecção e enumeração com acurácia pelas técnicas empregadas na rotina. Este problema decorre, particularmente, das baixas concentrações das formas infectantes encontradas na água (LEMARCHAND e LEBARON, 2003). Contudo, é possível elevar a sensibilidade aumentando o número de amostras ou de coletas.

Outro ponto relevante na identificação reside na dificuldade do reconhecimento desses parasitos devido aos fatores ambientais adversos que podem alterar a morfologia dos cistos e oocistos (CARTUSIO-NETO, 2004). Assim, usar métodos específicos como os imunológicos ou moleculares isoladamente ou de forma complementar pode melhorar a qualidade do diagnóstico dos parasitos em água.

As técnicas de detecção desses protozoários 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 parasitos são frequentemente encontrados no ambiente em baixas concentrações. Em seguida ocorre a purificação, onde os mesmos são separados de outros debris e por fim, são identificados (HSU *et al.*, 2000)

A metodologia utilizada no presente trabalho montou um esquema de análise enquadrando-se dentro da resolução 274 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (2000). Essa resolução, no artigo 7º, recomenda que os métodos de amostragem e análise das águas devem ser os especificados nas normas aprovados pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (EATON *et al.*, 2005), o qual respeita os três estágios descritos anteriormente, ou seja, concentração, purificação e análise da amostra.

Além disso, foram realizadas análises para estabelecer os padrões físico-químicos e microbiológicos, conforme a resolução 357 do CONAMA (2005), que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento.

Em relação às características físico-químicas, as amostras coletadas apresentaram resultados condizentes com os padrões permitidos pela resolução, onde na seção 1, no artigo 4º, parágrafo 3, permite que a água utilizada para o abastecimento público, após tratamento convencional, apresente turbidez de até 100 unidades nefelométricas de turbidez (UNT) e potencial de hidrogênio (pH) entre 6,0 e 9,0. Então,

diante do apresentado, a água do rio Tamanduí analisada neste trabalho, em todos os pontos de coleta, apresenta-se de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação vigente.

Os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras de águas do rio Tamanduí também se apresentaram de acordo com a resolução 357 do CONAMA uma vez que o maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) encontrado foi 576 UFC/ mL e resolução permite encontrar até 1000 UFC/100mL.

Esses resultados podem ser atribuídos à excelente preservação deste rio que apresenta cerca de 16% da área da bacia ocupada por florestas, incluindo mata ciliar e vegetação de várzea, o que provavelmente contribui para a manutenção da qualidade da água deste manancial (FOZ DO IGUAÇU, 2010).

Em relação aos métodos de purificação, pode-se dizer que o gradiente de NaCl foi o melhor por apresentar um protocolo de execução fácil e com melhor aplicabilidade. Com isso, foi poupada a perda excessiva de material. A facilidade no manuseio está relacionada com a fase de recuperação da interface e a aplicabilidade está atribuída às etapas de lavagem reduzidas quando comparadas ao método de purificação em gradiente de sacarose.

Por se tratar de uma amostra transparente (água), que está associada à uma solução que também é transparente (solução de sacarose), a interface não fica evidente dificultando a sua visualização. Essa etapa é mais simplificada quando se trata de uma amostra fecal, por exemplo, pois a interface fica com uma coloração amarelada devido aos componentes do bolo fecal.

Todavia, o método de purificação utilizando o gradiente de NaCl possui uma melhor eficiência na fase de recuperação da interface, pois a mesma ocorre apenas na superfície e o volume da amostra aplicada é conhecido, assim, mesmo que a visibilidade esteja prejudicada, a recuperação é mais fácil.

Kar *et al.* (2010) compararam diferentes métodos de purificação em amostra de fezes e provaram que a purificação utilizando gradiente de NaCl também foi a melhor aplicada.

BERINO (2004) defende o uso da purificação, pois a mesma elimina substâncias orgânicas que inibem a amplificação por PCR, visto que na fase de amplificação a sensibilidade da técnica de PCR pode ser afetada especialmente em amostra de água, tornando o isolamento e a obtenção de um DNA purificado uma sequência de etapas bastante difíceis (RAMIREZ e SREEBASAN, 2006).

Leetz *et al.* (2007) compararam a sensibilidade da amplificação de DNA de pequenas quantidades de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* por PCR antes

e após a purificação, onde a taxa de detecção variou de 10^4 oocistos a 10 cistos respectivamente. Assim, o aumento da capacidade de detecção foi atribuído a realização da etapa de purificação realizada no início da extração de DNA.

Os resultados dos trabalhos de Berino (2004) e Leetz *et al.* (2007) corroboram com o resultado do presente trabalho que apresentou bom desempenho após a realização da purificação com NaCl, pois as extrações de DNA realizadas sem a purificação das amostras, que foram contaminadas experimentalmente, não funcionaram.

Ao final da extração de DNA diretamente com Kit comercial, era nítido que o material eluído era bastante impuro, pois apresentava uma coloração amarelada e um aspecto turvo. Do mesmo modo, a extração pelo método clássico utilizando fenol – clorofórmio não funcionou quando realizada diretamente da amostra, ou seja, sem a purificação prévia.

Mesmo depois de realizar a PCR, não foi possível detectar amplificação do DNA extraído diretamente da amostra, sendo que os controles, positivo e negativo, da PCR funcionaram em todas as reações, mostrando que a técnica de PCR, de fato, estaria funcionando, pois as amostras controle possuíam um DNA puro e adequado, fazendo com que a banda correspondente aos protozoários pesquisados ficasse evidenciada. No entanto, as amostras de água que foram contaminadas experimentalmente, mas não foram purificadas, apresentavam-se negativas. Então pode-se concluir que a purificação foi extremamente necessária para eliminar o material orgânico que poderia estar interferindo nas extrações e conseqüentemente negativando a PCR.

Em relação à extração de DNA, o melhor método foi o Kit comercial o qual demonstrou melhor desempenho e aumentou a sensibilidade da PCR e da N-PCR, pois foi possível detectar DNA de uma média de 15 oocistos / mL de *Cryptosporidium* após PCR e 1,5 oocistos / mL após N-PCR. Para *Giardia*, a sensibilidade de detecção de DNA foi de aproximadamente 3 cistos / mL quando aplicado a técnica de PCR.

Os resultados do presente trabalho são semelhantes aos dados do trabalho de Osaki (2009) que também realizou extração de DNA utilizando o mesmo Kit comercial sendo possível detectar DNA de até cinco oocistos de *Cryptosporidium* através da técnica de PCR e quantidades inferiores a cinco oocistos quando realizado N-PCR.

No diagnóstico microscópico para a detecção dos protozoários pesquisados, foi possível detectar apenas um oocisto de *Cryptosporidium* pelo método de Kinyoun em apenas um ponto de coleta, que foi o ponto 6 e somente na primeira coleta. Esse resultado corrobora com o resultado obtido através da PCR e do N-PCR que também detectou a presença de *Cryptosporidium* apenas no ponto 6 referente à amostra da primeira coleta. Diante disso, pode-se dizer que a técnica de microscopia e a de biologia

molecular realizaram a mesma função: a detecção do protozoário *Cryptosporidium*.

Entretanto, o diagnóstico microscópico não teve a mesma eficiência na detecção de *Giardia*, não sendo possível detectar estrutura compatível com a do cisto deste protozoário em nenhuma amostra de água coletada. Porém, ao realizar a PCR, foi possível detectar DNA de *Giardia* em um ponto coletado em duas fases de coleta (primeira e última coleta de amostra de água). Mas ainda assim, autores como ZAJAC *et al.* (2002) e THOMPSON (2004) estão certos de que os métodos tradicionais de microscopia aliados aos métodos de concentração (centrifugação e flutuação em Sulfato de Zinco), continuam sendo um indicadores confiáveis de detecção de cistos de *Giardia*.

Contudo, existem fatores limitantes das técnicas microscópicas e/ou de coloração, como o tamanho reduzido dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*, que podem ser confundidos com matérias orgânicas coradas ou não, demonstrando assim, a importância de um técnico treinado (FAHEY, 2003). Outros métodos de microscopia, como a análise por imunofluorescência direta, apresentam uma maior sensibilidade e especificidade (ARROWOOD e STERLING, 1989), entretanto possuem o mesmo inconveniente de depender do número de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* na amostra, levando a possibilidade de falso-negativos.

Todavia, a detecção de *Cryptosporidium* somente com base na microscopia não oferece dados que possam mudar o contexto do resultado, pois apenas a microscopia não é capaz de identificar a espécie. Conforme a tabela de Osaki (2009) no item 5.2, diversas espécies de *Cryptosporidium* não têm como hospedeiro o ser humano e sua identificação só é possível com técnicas de PCR e sequenciamento. Deste modo, encontrar e identificar a espécie *Cryptosporidium parvum*, a qual parasita o ser humano, em amostras de água utilizadas para o abastecimento público é importante para estabelecer medidas de detecção e remoção pelas autoridades sanitárias.

A PCR mostrou ter maior sensibilidade e especificidade, pois com a utilização desta técnica foi possível detectar também o protozoário *Giardia duodenalis*, que não foi diagnosticado com base apenas na microscopia, nem pela análise direta do sedimento, nem pelo método de Faust e colaboradores. Esse resultado comprova que a PCR mostrou maior sensibilidade e especificidade do que a microscopia.

Diversos autores utilizaram as ferramentas de biologia molecular para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em amostra de água (JIANG *et al.*, 2005, CAREY *et al.*, 2004, HASHIMOTO *et al.*, 2006, PILAI 2009) e para a identificação de novas espécies, quando associadas ao sequenciamento, ou diferenciação das espécies em genótipos (FAYER *et al.*, 2008; FAYER e SANTIN, 2009).

Além da detecção do parasito, as metodologias em nível molecular também são

aplicadas no estudo da sistemática e ecologia dos parasitos, em particular sua taxonomia, genética de populações, epidemiologia, evolução biológica e interação com seus hospedeiros (ALMEIDA, 2004).

Por hora, no presente trabalho, a PCR mostrou-se eficiente na pesquisa dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de água ambiental, com uma boa sensibilidade e especificidade, sendo possível detectar esses parasitos no ponto de coleta número 6.

É provável que a detecção desses protozoários no ponto seis tenha se dado ao fato do local apresentar características diferentes dos demais pontos. A principal característica é que esse ponto consiste de um desvio artificial do curso natural do rio, onde a água circula mais lentamente. Isso deve ter facilitado a concentração dos protozoários e conseqüentemente sua detecção. Além disso, esse desvio foi feito de concreto para receber banhistas nas temporadas de calor. Então, além desse ponto ter sido de fácil acesso para as coletas, ele fica exposto aos banhistas sem haver um controle sanitário.

No Brasil são escassas as pesquisas de contaminação da água pelos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*, porém os trabalhos existentes têm demonstrado a presença de oocistos e cistos destes protozoários em água de abastecimento público e indicam a necessidade de um monitoramento da qualidade dessa água visando o bem estar e a saúde da população (HELLER, *et al.*, 2004).

Em um levantamento realizado pela CETESB, foi documentada a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas superficiais de 28 mananciais do Estado de São Paulo, com positividade de 5% para oocistos e 31,5% para cistos, sendo a captação do Rio Atibaia considerada um dos pontos críticos no Estado, com densidade de 521 cistos /L (HACHICH *et al.*, 2004).

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. MACHADO (2006) obteve 5 % das amostras analisadas contaminadas com *Cryptosporidium* nas águas superficiais da região metropolitana de Recife.

No município de Araras – SP, 66,7% de 12 amostras colhidas, no manancial que abastece esse município, apresentaram-se positivas para *Giardia* (DIAS JUNIOR, 1999). FRANCO *et al.* (2001) investigaram a ocorrência desse protozoário no rio Atibaia, rio este que abastece a cidade de Campinas – SP e obtiveram positividade em todas as amostras coletadas.

Em relação ao sequenciamento, o mesmo foi realizado apenas nas amostras que

apresentaram positividade para *Cryptosporidium* spp. após PCR e N-PCR. Neste caso foi necessário realizar a reação de sequenciamento, pois os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de amplificação não são espécie específicos (XIAO *et al.*, 1999) Assim, ao realizar o sequenciamento pode-se chegar à espécie, que conforme dito anteriormente apresenta tamanha relevância em ter esse conhecimento.

No caso de *Giardia*, o par oligonucleotídeos iniciadores ABB97 e ABB220 identificam *Giardia duodenalis* com um fragmento de 163 pb enquanto que *Giardia muris* aparece um fragmento de 526 pb (ABBASZADEGAN, *et al.*, 1993 *apud* ROCHELLE *et al.*, 1997), Como o fragmento que apareceu nas amostras e no controle positivo foi de 163pb não foi necessário sequenciar os produtos amplificados por PCR, uma vez que a mesma bastou para diagnosticar a espécie. Diante do apresentado, pode-se concluir que não há uma metodologia padrão para a detecção dos protozoários pesquisados no presente trabalho em amostras de água. Sendo assim, quando possível, os alvos moleculares 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 (SMITH *et al.*, 2006). No entanto, esses métodos são os mais variados e possuem complementariedade, porém com níveis de sensibilidade e especificidade diferentes.

Segundo MORGAN (2000), as vantagens das técnicas moleculares residem na sensibilidade e especificidade excelentes, na sua rapidez e na possibilidade de trabalhar com grande número de amostras. O custo destas técnicas está diminuindo, mas há necessidade de melhorar a transferência de tecnologia para os laboratórios de países em desenvolvimento, de modo que eles possam aplicar diretamente tais técnicas de diagnóstico (THOMPSON, 2004).

Com isso, a escolha da metodologia ideal para a amostra atrelada à escolha estratégica dos locais de coleta, bem como o aumento do volume da amostra, é possível elevar a sensibilidade da técnica escolhida. Além do mais, a utilização de técnicas que proporcionem a concentração adequada dos protozoários pesquisados pode facilitar a detecção desses parasitos.

6 CONCLUSÃO

- O rio Tamanduá da cidade de Foz do Iguaçu – PR, apresenta-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente, enquadrando-o como qualificado para o abastecimento público segundo a resolução 357 do CONAMA (2005).
- Em contrapartida, foi possível detectar os protozoários *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*, os quais são microrganismos patogênicos para o ser humano, no ponto de coleta número 6, local este, descaracterizado pelo homem para receber banhistas em épocas de calor, o que pode ser uma fonte de infecção oferecendo riscos à saúde pública.
- O gradiente de NaCl mostrou-se eficaz na purificação de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* a partir de amostras de água.
- A etapa de purificação é importante antes do processo de extração de DNA, pois resulta em um material mais limpo diminuindo a interferência nas técnicas moleculares como a PCR.
- O método de extração de DNA pelo Kit ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen™) apresentou melhor eficiência na extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp quando comparado com os outros métodos testados.
- O diagnóstico molecular mostrou-se mais eficiente quando comparado com os métodos parasitológicos clássicos, apresentando maior sensibilidade e especificidade para ambos os protozoários pesquisados.

7 PERSPECTIVAS

A qualidade da água utilizada para o abastecimento público tem sido intensamente deteriorada. Diante dessa problemática, a saúde e o bem estar do homem está exposta ao risco de infecção por uma infinidade de patógenos veiculados pela água, dentre eles, os protozoários, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

No entanto, são escassos os dados relacionados à ocorrência de surtos ocasionados pelos patógenos acima citados e os dados existentes se concentram em estudos realizados em centros de pesquisas ou instituições de ensino superior.

Apesar de haver poucos registros de surtos dessas parasitoses no Brasil, é necessário um controle e um monitoramento obrigatório das águas para consumo público pelas companhias de saneamento, já que o presente trabalho demonstrou a contaminação da água do rio Tamanduá, o qual é a principal fonte de abastecimento do município de Foz do Iguaçu – PR, por protozoários que podem ser patogênicos para o ser humano e que o tratamento convencional da água não é capaz de eliminar.

Uma vez que foi possível detectar a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. na água do rio Tamanduá, o próximo passo será avaliar melhor o ponto de coleta número 6, o qual apresenta modificações antrópicas, coletando um maior volume da amostra e procurar outros pontos que apresentem características similares ao ponto 6, que mostrou-se positivo para a presença dos protozoários acima citados.

Algumas características que podem ser levadas em consideração são: o fluxo lento da água do rio e o fácil acesso de banhistas que podem representar uma fonte de contaminação, já que a balneabilidade local não oferece nenhum tipo de controle sanitário.

Outra proposta é a utilização de outra ferramenta de biologia molecular, como a PCR-RFLP, que poderá permitir uma avaliação da variabilidade genética dos protozoários encontrados.

Além disso, é necessário que seja feito uma otimização do processo de purificação da amostra, para que esse método possa ser realizado antes da análise microscópica, visando uma queda de custo na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de água. Assim, as companhias de saneamento poderiam acrescentar às análises realizadas rotineiramente, que são exigidas pela legislação, a pesquisa desses protozoários, oferecendo um controle de qualidade de água distribuída ainda maior.

8 REFERÊNCIAS

ABAZA, H., EL-ZAYADI, A.R., KABIL, S.M. & RISK, H. Nitazoxanide in the treatment of patients with intestinal protozoan and helminthic infections: a report n 546 patients in Egypt. **Current Therapeutc Research**. v. 9, n.2, p.116-121, 1998.

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.

ABREU, V.J.S., CARDOSO, A.L., PENA, H.F.J., GENNARI, S.M., SINHORINI, I. & DAMY, S.B. Avaliação da eficácia do colostro do colostro bovino hiperimune na infecção experimental de roedores com *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.40, p.191-198, 2003.

ADAM, R.D. The biology of *Giardia* spp. **Microbiology Research**. v.55, n.4, p.706-732, 1991.

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

ALLEN, M.J.; CLANCY, J.L.; RICE, E.W. The plain, hard truth about pathogen monitoring. **Journal AWWA**. v.92, p.64-76, 2000.

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

ALMEIDA, A.A. DELGADO, M.L. SOARES, S.C. CASTRO, A.O. MOREIRA, M.J. MENDONÇA, C.M. CANADA, N. B. DA COSTA, J.M. Genotype analysis of *Giardia* isolated from assymptomatic children in northern Portugal. **Journal Eukaryotic Microbiology**. v.53, p.177-178, 2006.

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

36, p. 33-38, 1994.

ANCENO, A.J.; KATAYAMA, H. HOUP, E.R. CHAVALITSHEWINKOON-PERMITR, P. CHULUUN, B. SHIPIN, O.V. IMS-free DNA extraction for the PCR-based quantification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in surface and waste water. **International Journal of Environmental Health Research**. v.17, n.4, p.297-310, 2007.

ARMON, R.; GOLD, D.; BRODSKY, M e ORON, G. Surface and subsurface irrigation with effluents of different qualities and presence of *Cryptosporidium* oocysts in soil and crops. **Water Science Technology**. v.46, n.3, p.115 – 122, 2002.

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

BASTOS, R.K.X.; BEVILACQUA, P.D.; NASCIMENTO, L.E. **Coliformes como indicadores da qualidade da água. Alcance e limitações**. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL, Porto Alegre, 2000.

BERINO, E. **Ocorrência e detecção de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em águas brutas em abastecimento de formadores do lago Guaíba**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

BEVILACQUA, P.D.; BASTOS, R.K.X.; HELLER, L. **Densidades de *Giardia* e *Cryptosporidium* em mananciais de abastecimento de água e prevalência de giardíase: usos e aplicações do modelo teórico de avaliação de risco**. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL, Cancun, 2002.

BONATTI, T. **Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. oocistos de *Cryptosporidium* spp. e ovos da família Ascarididae em amostras de lodo de esgoto**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de mestre em parasitologia. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

BORGES, G.C.J.; ALVES, C.L.; FAUSTINO, M.A.G. Ocorrência de *Cryptosporidium* em manatí amazônico (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883). **Biotemas**. v.20, n.3, p.63-66, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria nº 518, de 25 e Março de 2004**: Normas e padrão da potabilidade da água destinada ao consumo humano. Brasília: DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Resolução nº 275 de 22 de setembro de 2005**. Brasília: ANVISA, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Brasília: DF, 2002.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Cemitérios com fonte potencial de contaminação das águas subterrâneas: região de Cuiabá e Várzea Grande – MT**. Brasília: Funasa, 2007. 118 p.

BRASIL. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: técnicas de diagnóstico**. Ministério da Saúde, Brasília: DF 1997. 27p.

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

CACCIÒ, M.S.; THOMPSON, R.C.A.; McLAUCHLIN, J. e SMITH, H.V. Unraveling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**. v.21, n.9, p.430–437, 2003.

CACCIÒ, M.S.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v.160, p.75-80, 2008.

CAPIZZI-BANAS, S.; MAUX, M e SCHWARTZBROD, J. Surface hidrofobicity of *Ascaris* eggs and *Giardia* cysts. **Helminthologia**. v.39, n.4, p.197 – 204, 2002.

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

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

CARMENA D, AGUINAGALDE, X. ZIGORRAGA, C. FERNÁNDEZ-CRESPO, J.C. OCIO, J.A. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. **Journal of Applied Microbiology**. v.102, n.619-129, 2007.

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.** , 87p Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, 2004.

CARVALHEIRO, J. R. et. al. Contribuição das Doenças Infecciosas e Parasitárias na Morbi – Mortalidade de Ribeirão Preto, SP (Brasil). **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, 1979.

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

CASTRO-HERMIDA, J.A. GARCIA-PRESEDO, I. ALMEIDA, A. GONZÁLEZ-WARLETA, M. DA COSTA, J.M.C. MEZO, M. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational rivers areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Water Research**. v.42, p.3528-3538, 2008.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v.124, p. 138-146, 2010.

CHIEFFI GRYSCHER E NETO. Tratamento e Prevenção da Giardíase. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=1021> Acessado em setembro de 2011

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL **Métodos simplificados para análises bacteriológicas da água**. São Paulo: CETESB, 1997.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução nº. 274**. Brasília, 29 de novembro de 2000.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução nº. 357**. Brasília, 17 de março de 2005.

COSTA-RIBEIRO, M. C. V. **Variabilidade genética de *Aedes (Stegomyia) aegypti* no Brasil**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

COSTA, C.F.S; MENDOZA-SASSI, R.A.M. Identificação de patógenos humanos nas águas que margeiam a cidade de Rio Grande/RS. **Revista Baiana de saúde pública** v.31, n.2, p.201-211, 2007.

CRAUN, G.F.; HUBBS, S.A.; FROST, F. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. **Journal AWWA**. v.90, p.81-91, 1998.

CURRENT, W.L. & GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v.4, p. 25-258, 1991..

DAHI, E. **Water Supply in Developing Countries Problems and Solutions**. University of Denmark, Technical Editors, 1992.

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

DIAS, G.M.; BEVILACQUA, P.D.; BASTOS R.K.X.; OLIVEIRA, A.A.; CAMPOS, G.M.M. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.6, p.1291-1300, 2008.

DONNELLY, J.K. & STENTIFORD, E.I. The *Cryptosporidium* problem in water and food supplies. **Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie**. v.30, p.111-120, 1997.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. 1.ed. Boca Raton: CRC Press, 1990

EATON, A. D. et al. **Standard Methods for the examination of water & wastewater**. 21 ed. Joint Editorial Board, 2005.

ECKMANN, L. Mucosal defences against *Giardia*. **Parasite Immunology**. v. 25, p.259-270, 2003.

EPA-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Office of water, Washington, DC. USA. 1999.

ERLANDSEN, S.L.; MACECHKI, P.T.; VAN KEULEN, H. e JARROLL, E.L. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly usin immunogold labeling and high resolution field emission SEM. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v.43, n.5, p.416-429, 1996.

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

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.

FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clinical Microbiology Reviews**. v.13, n.1, p.35-54, 2000.

FAUST, E.C. D'ANTONI, J.S. ODOM, V. MILLER, M.J. PERES, C. SAWITZ, W. THOMEN, L.F. TOBIE, J.E. WALKER, J.H. A critical study of clinical laboratory technics for the

diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. **American Journal of Tropical Medicine**. v.18, p.169-183, 1939.

FAYER, R.; LINDSAY, D. MORGAN, U; FONTAINE D.C. Zoonotic protozoa in the marine environment: a threat to aquatic mammals and public health. **Veterinary Parasitology**, v.125, p.131-135, 2004.

FAYER, R., SANTÍM, M., DUBEY, J.P., FAIR, P.A., BOSSART, G.D., SREEKUMAR, C., KWOK, O.C.H. & THULLIEZ, P.H. Prevalence of zoonotic protozoa infecting bottlenose dolphins. In: **Synopsis of Research Meeting Bottlenose Dolphin Health & Risk**. p. 56. 2005.

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

FAYER, R. SANTIN, M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). disponível para download
Veterinary Parasitology, 2009

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

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

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 90-97, 2010.

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

FERRARI, B.C., VESEY, G., WEIR, C., WILLIAMS, K.L. & VEAL, D.A. Comparison of *Cryptosporidium*- specific and *Giardia*-specific monoclonal antibodies for monitoring water samples. **Water Research**. v.7, p.1611-1617, 2004.

FERREIRA, A. P; D'AGUILA, D. S; ROQUE, O. C; MIRANDA, C. A. S; Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do município de Nova Iguaçu, **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 2000.

FONTAINE, M. GUILLOT E. An immunomagnetic separation-real time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. **Journal of Microbiological**

Methods. v. 54, p.29-36, 2003.

FOZ DO IGUAÇU. **RADIOGRAFIA SOCIOECONÔMICA DE FOZ DO IGUAÇU 2010.** Disponível em: <http://www2.fozdoiguacu.pr.gov.br/Portal/VisualizaObj.aspx?IDObj=9111>
Acessado em: 17/06/2010

FRANCO, R.M.B., ROCHA-EBERHRD, R., CANTUSIO, N.R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and cysts in raw water from the Atibaia river. **Revista do Instituto de Medicina de São Paulo.** Campinas. v.43, n.2, p.109-111, 2001.

FRICKER, C.R. CRABB, J. Waterborne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. **Advances in Parasitology.** v.40, p.241-278, 1998.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de saneamento.** 3. ed. rev. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2006.

FURNESS, B.W. BEACH, M.J. ROBERTS, J.M. Giardiasis surveillance – United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report.** v.49, p.1-13, 2000.

GAMBA, R.C., CIAPINA, E.M.P., BATELLO, E.R., ESPINDOLA, R.S., SILVA, A.L.B., PACHECO, A. & PELLIZARI, V.H. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em água de poços utilizados para consumo em Itaquaquecetuba, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.32, p.222-241, 1997.

GARRIDO, L. E. M.. **Cryptosporidium parvum: patógeno emergente de Veiculação hídrica:** desafios metodológicos de detecção ambiental. 2005. 107f. Dissertação (Mestre em Ciências na área de Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro.

GASPARI, E.N.; RISTORI, C.A.; ROWLANDS, E.G.; IRINO, K; TORRES,D.D.; AMPLIN, M. Aplicação de anticorpos monoclonais na detecção de enteropatógenos em amostras de origem clínica, alimentar e ambiental para a produção de kits para imunodiagnóstico. **Boletim Epidemiológico Paulista,** v.3, n.35, 2006.

GELLIN, B.J. & SOAVE, R. Coccidian infections in AIDS. Toxoplasmosis, cryptosporidiosis and isosporiasis. **Medical Clinics of North America.** v.76, p.205-234, 1992.

GIATTI, L. L. et. al. Condições de Saneamento Básico em Iporanga, Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública,** 2004.

GOMES, A.; PACHECO, M.; FONSECA, Y.; CESAR, N.; DIAS, H.; SILVA, R. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em águas de fontes naturais e comparação com análises

bacteriológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.61, n.1, p.59-63, 2002.

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

GRECA, M.P.S. **Identificação molecular e filogenia de espécies de Cryptosporidium em cães e em gatos de Curitiba e região metropolitana**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração Parasitologia) - Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

HACHICH, E.M. SATO, M.I. GALVANI, A.T. MENEGON, J.R. MUCCI, J.L. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo States, Brazil. **Water Science and Technology**. v.50, n.1, p.239-245, 2004.

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

HAMER, G. Solid waste treatment and disposal: effects on public health and environmental safety. **Biotechnology Advances**. v. 22, p. 71-79, 2003.

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. Água potável: esforço de todos. **BIO-Revista Brasileira de Saneamento e Meio Ambiente**. v.7, n.9, p.9-11, 1998.

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

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

HOQUE, M.E.; HOPE, V.T.; KJELLSTROM, T.; SCRAGG, R. e LAY-YEE, R. Risk of giardiasis in Aucklanders: a case – control study. **International Journal of Infectious Diseases**. v.6, p.191-197, 2002.

HUBER, F. **Caracterização genotípica e estudo filogenético de *Cryptosporidium* spp. obtidos de diferentes hospedeiros**. 60 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

HUGHES-HANKS, J. M.; RICKARD, L. G.; PANUSKA, C.; SAUCIER, J. R. O'HARA, T. M.; DEHN, L.; ROLLAND, M. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Five Marine Species. **Journal of Parasitology**. v.91, n.5, p.1255-1228, 2005.

HSU, B., HUANG, C., HSU Y., JIANG, G. & HSU, C.L. Evaluation of two concentration methods for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. **Water Research**. v.35, n.2, p.419-424, 2000.

HSU, BING-MU; YEH, H. Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* from drinking water treatment: a pilot-scale study. **Water Research**, New York, v.37, n.5, p.1111-1117, 2003.

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

JAKUBOWSKI, W.; GRAUN, G. F. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: OLSON, B.E., OLSON, M.E., WALLIS, P.M. (Eds.), ***Giardia: The Cosmopolitan Parasite***. Wallingford, UK, CAB International, 2002.

JEX, A. R. *et al.* Classification of *Cryptosporidium* Species from Patients with Sporadic Cryptosporidiosis by Use of Sequence-Based Multilocus Analysis following Mutation Scanning. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2252-2262, 2008.

JESUS, H.C.; COSTA, E.A.; MENDONÇA, A.S.F.; ZANDONADE, E.: Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino de Vitória – ES. **Química Nova**, São Paulo, vol 27, n. 3, 378-386, 2004.

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

JOHNSON, D. C.; ENRIQUEZ, C. E.; PEPPER, I.L.; DAVIS, T.L.; GERBA, C.P. e ROSE, J.B. Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, poliovirus and *Salmonella* in marine waters. **Water Science and Technology**. v.35, n.11-12, p. 261-268, 1995.

KAR, S.; GAWLOWSKA, S.; DAUGSCHIES, A.; BANGOURA, B. Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Veterinary Parasitology**.v. 10 N. 1016. 2010.

KARANIS, P.; SOTIRIADOU, I.; KARTASHEV, V.; KOURENTI, C.; TSVETKOVA, N.; STOJANOVA, K.; Occurrence of Giardia and Cryptosporidium in water supplies of Rússia and Bulgária, **Environmental Research**, v.102 p. 260-271, 2006.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**. v.5, n.1, p.1-38, 2007.

KHAN, O. **Intestinal (protozoa) and liver parasites sporozoa 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.

LALLO, M.A. Criptosporidiose canina. **Clinical Veterinary**. v.1, n.2, p.20-22, 1996.

LEETZ, A. S. et al. 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. 951-962, 2007.

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

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKI, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the protozoa. **Journal of Protozoology**. v.7, p.37-58, 1980.

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

LUDWIG, K. M. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.32, n.5, p.547 – 555, 1999.

MACEDO, J. A. B.. **Métodos laboratoriais de análises físico-químicas e microbiológicas**. 3º ed. Belo Horizonte: CRQ-MG, 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.

MAHBUBANI, M.H.; BEJ, A.K.; PERLIN, M.H.; SCHAEFER, F.W.; JAKUBOWSKI, W. ATLAS, R.M. Differentiation of *Giardia duodenalis* from the other *Giardia* spp. by using

Polymerase Chain Reaction and Gene Probes. **Journal of Clinical Microbiology**. v.30(1), p. 74-78, 1992.

MAHDY, A.K.M.; LIM, Y.A.L.; SURIN, J.; WAN, K.L.; AL-MEKHLAFI, M.S.H. Risk factors for endemic giardiasis: highlighting the possible association of contaminated water and food. **The royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 102, p. 465-470, 2008.

MARKEL, E. K.; JOHN, D. T.; KROTOSKI, W. A. **Parasitologia médica**. 8° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003

MASCARINI, L.M. DONALISIO, M.R. Giardíase e Cryptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.39, n.6, p.577-579, 2006.

McGLADE, T.R.; ROBERTSOM,I.D.; ELLIOT, A.D. e THOMPSON, R.C.A. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. **Veterinary Parasitology**. v.110, p.197–205, 2003.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.M.; CAMARGO, O.A.; BETTIOL, W. Potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para as plantas. Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto. Jaguariúna, SP. EMBRAPA Meio Ambiente, Cap 5, p. 109-141, 2002.

MEINHARDT, P. L. Epidemiologic Aspects of Human Cryptosporidiosis and the Role of Waterborne Transmission. **Epidemiologic Reviews**, v. 18, n. 2, p. 118-136, 1996.

MERTEN, G.H.; MINELLA, J.P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. v. 3, n.4, 2002

MEYER, E. A. **Giardiasis: human parasitic diseases**.vol.3. Amsterdam, Elsevier Science. 368p. 1990.

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

MILLER, K. *et al.* *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 322-325, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Padrão de Potabilidade da Água Destinada ao Consumo Humano**. Portaria n. 1469, Brasília, 2000.

MONIS, P.T. & SAINT, C.P. Development of a nested-PCR assay for the detection of

Cryptosporidium parvum in finished water. **Water Research**. v.35, n.7, p.1641-1648, 2001.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.1135-1144, 1999.

MONIS, P.T.; CACCIO, S.M.; THOMPSON, R.C.A. Variation in *Giardia*: Towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v. 25(2), p. 93-100, 2009.

MORGAN, U. M. *et al.* *Cryptosporidium* spp. in Domestic Dogs: the "Dog" Genotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2220-2223, 2000.

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, n.2, p. 175-178, 2009.

NEWMAN, R.D., ZU, S.X., WUHIB, T., LIMA, A.A., GUERRANT, R.L. & SEARS, C.L. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in urban community in northeast Brazil. **Annals of Internal Medicine**. v.120, p.500-505, 2004.

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

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

OLIVEIRA-SILVA, M.B.; OLIVEIRA, L.R.; RESENDE J.C.P.; 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.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Água e Saúde**. Brasil: OMS, 2009. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/Ambiente/UploadArq/agua.pdf>> Acessado em 15 de Abril de 2010.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). La salud y el ambiente en el desarrollo sostenible. Publicación Científica, Washington, n.572, 2000.

ORTEGA, Y.R., ADAM, C.R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets o fan endemic region in Peru. **The**

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v.57, n.6, p.683-686, 1997.

OSAKI, S.C. **Cryptosporidium spp.: desenvolvimento de técnicas moleculares e imunológicas para a detecção de oocistos em água e avaliação da sua remoção pelos métodos convencionais de tratamento da água.** 176 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

OVERGAAUW, P. A. M. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 115–122, 2009.

PAULINO, R.C. **Detecção molecular de Giardia sp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP.** 108 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PAULINO, R. C.; COSTA, A. O.; THOMAZ-SOCCOL, V. PCR como ferramenta para detecção de Giardia duodenalis em água. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia. Anais: Sociedade Brasileira de Parasitologia, Porto Alegre, 2005.

PEREIRA, J. T. **Métodos de desinfecção em água contendo Cryptosporidium parvum (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) e sua detecção por técnica de biologia molecular.** 104f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, parasitologia e patologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PHILIPPI JR A. **Saneamento, Saúde e Ambiente.** Barueri, SP: Manole; 2005.

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

PITTNER, E. MORAES, I.F. SANCHES, H.F. TRINCAUS, M.R. RAIMONDO, M.L. MONTEIRO, M.C. Enteroparasitoses em crianças de uma comunidade escolar na cidade de Guarapuava, PR. **Revista Sallus**. v.1, n.1, p.97-100, 2007.

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

READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. Discrimination of all genotypes of Giardia duodenalis at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, p. 125-130, 2004.

RIGO, C. R.; FRANCO, R. M. B. Comparação entre os métodos de Ziehl-Neelsen modificado e Acid Fast-Trichrome para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e

Isospora belli. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, n. 3, 2002.

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

RODRIGUES, M. A. M. Infecções Parasitárias do Apêndice Cecal e suas Relações com a Apendicite Aguda. Arquivo de Gastroenterologia, v. 45, n.2, Botucatu: Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, 2008.

ROLIM, R. G. **Avaliação da qualidade da água e percepção higiênica – sanitária na área rural de Lavras**. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999 – 2000.

ROSSIGNOL, J. F. *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment Options and Prospects for New Drugs Jean-François. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 45-43, 2010.

SAHAGUN J, CLAVEL A, GONI P, et al. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 27, p. 81-83, 2007.

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

SAVIOLI, L. SMITH, H. THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Disease Initiative”. **Trends Parasitology**. v.22, n.5, p. 203-208, 2006.

SCHMIDT, G.D.; ROBERTS, L.S. **Foundations of Parasitology** 2ed. St. Louis, The C.V. Mosby Company, 1981. 975p.

SCHNYDER, M. *et al.* Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 149-154, 2009.

SCHUURMAN, T. LANKAMP, P. VAN BELKUM, A. KOOISTRA-SMID, M. VAN ZWET, A. Comparison of microscope, real time PCR and rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. **Clinical Microbiology and Infection**. v.13, p.1186-1191, 2007.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis*. **Journal of Comparative Pathology**. v. 65, p.262, 1955.

SMCS – Secretária Municipal de Comunicação Social. Prefeitura municipal de Foz do Iguaçu. **Cadastro Social**. Foz do Iguaçu: PMFI, 2010

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

SMITH, H.V. CACCIÒ, S.M. TAIT, A. McLAUCHLIN, J. THOMPSON, R.C.A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infection in humans. **Trends Parasitology**. v. 2, n.4, p.160-7, 2006.

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.

STAMFORD T. L. M; et. al. **Ocorrência de *Cryptosporidium spp.* e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife**. Recife: Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde: Universidade Federal de Pernambuco, 2005.

STEINER, T.S., THIELMAN, N.M. & GUERRANT, R.L. Protozoal agents: what are the dangers for the public water supply? **Annual Review of Medicine**. v.48, p.329-340, 1997.

TEIXEIRA, M. G. Mortalidade por Doenças Infecciosas e parasitárias em Salvador – Bahia: evolução e diferenciais intra – urbano segundo condições de vida. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Rio de Janeiro, 2002.

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

THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today**, v.16, n.5, p.210-213, 2000.

TROTZ-WILLIAMS, L. A. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. **Parasitology Research**, v. 99, p. 346-352, 2006.

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

VASQUEZ, I.H.G., RESTREPO, M.I. & BOTERO, D. Cryptosporidiosis. **Biomédica** v.6, n.12, p. 48-70, 1986.

VESEY, G., HUTTON, P., CHAMPION, A., ASHBOLT, N., WILLIAMS, K.C., WARTON, A.E. & VEAL, D. Routine monitoring of cryptosporidium oocysts in water using flow cytometry. *Journal Applied Bacteriology*. v.75, p.87-90, 1993.

VON SPERLING, M. **Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos**. 2. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental: Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

WIEBBELLING, A. M. P. **Avaliação do conhecimento sobre criptosporidiose em uma amostra de médicos de Porto Alegre, Rio Grande do Sul**. Rio de Janeiro, v. 38, n.2, p.119-123, 2002.

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, n.8, p. 3386-3391, 1999.

XIAO, L. CAMA, V. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in: ORTEGA, Y.R. **Foodborne Parasites**. 108p, 2006.

ZAJAC, A.; JOHNSON, J.; KING, S. Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** **38**:221-224, 2002.

ZUCKERMAN, U., ARMON, R., TZIPORI, S. & GOLD, D. Evaluating of a portable differential continuous flow centrifuge for concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. *Journal Applied Microbiology*. v.86, p.955-961, 1999.