ANA PAULA BORTOLOTTI MULLER

**DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM ÁGUAS DE
ABASTECIMENTO SUPERFICIAIS E TRATADAS DA REGIÃO
METROPOLITANA DE SÃO PAULO.**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências (Microbiologia).

São Paulo
1999

ANA PAULA BORTOLOTTI MULLER

**DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EM ÁGUAS DE
ABASTECIMENTO SUPERFICIAIS E TRATADAS DA REGIÃO
METROPOLITANA DE SÃO PAULO.**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração:
Microbiologia

Orientador:
Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari

São Paulo
1999

Às minhas filhas, Giuliana e
Débora por perdoarem minha ausência na
realização deste, pelo amor incondicional e
por tornarem meus dias muito mais felizes.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu marido,
Emerson, pela participação e
incentivo constantes na minha
realização profissional e
pessoal.

Aos meus pais, Waldemir e Janete,
por todo amor dedicado a nossa família, pela
perseverança e determinação em tornar
possíveis meus ideais e pela presença
marcante em minha vida.

Aos meus irmãos
e familiares, pelo amor e
confiança que nos mantém
unidos.

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Vivian H. Pellizari, pelo carinho, paciência, confiança e principalmente pela orientação no desenvolvimento deste estudo.
- À Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) por viabilizar a realização deste estudo e pelo interesse em garantir a qualidade do abastecimento de água. Em especial ao Dr. Blum e aos profissionais das Estações de Tratamento, Sérgio, Adilson, Almir, Kleber, Solange, Antonio, Léo, Israel, Sheila, Jones e demais funcionários do laboratório de controle interno pelo fornecimento dos dados físico-químicos e demais esclarecimentos e principalmente por toda paciência durante o período de coleta e pela colaboração direta no desenvolvimento deste estudo.
Aos engenheiros Ferreti, Wilson e Carlos pelo fornecimento dos mapas e auxílios prestados.
- À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo, credibilidade e incentivo à ciência.
- À Dynal France pelo fornecimento dos equipamentos e reagentes utilizados para a purificação das amostras, em especial ao Dr. Felix por todos esclarecimentos prestados.
- Aos professores integrantes da banca do Exame Geral de Qualificação, Profa. Dra. Márcia P. Alves Mayer, Profa. Dra. Dolores U. Menhert, Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado e suplentes da mesma, Profa. Petra S. Sanchez e Prof. Dr. Glavur R. Matté pelas sugestões e considerações que muito contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.
- Aos amigos do laboratório de Microbiologia Ambiental, Adriana, Andréa, Anderson, Bolivar, Carlos (*in memoriam*) Carol, Débora, Denise, Eveline, Gabriela e Keili pelo companheirismo, apoio e pelo maravilhoso clima de trabalho em equipe. Em especial a Elisa Mara, pela “modestia”, por toda orientação inicial e colaboração durante o desenvolvimento deste.
- A Andréa Trevisan pelas dicas e orientações durante a fase de elaboração da dissertação e pela alegria contagiante.
- Ao Sr. Luis e Natália pela simplicidade e por toda colaboração indispensável nos trabalhos realizados no laboratório.
- À Rosa C. Gamba, pela determinação e atuação direta no desenvolvimento deste estudo e pela amizade que cresceu a partir do mesmo.

- Aos funcionários da secretaria da Microbiologia, Ana, Naíde e Alice e funcionários da secretaria da Pós-graduação do ICB, Celso e Hiroko pela paciência e atenção dedicados.
- Aos funcionários da biblioteca do ICB/USP pelo apoio nas pesquisas literárias e pelas correções bibliográficas.
- À Profa. Dra. Irma N. Rivera pelas informações e sugestões e principalmente pelo afeto, estímulo e dedicação à ciência.
- Ao Prof. Dr. René P. Schneider, pelas sugestões, contribuições e inúmeros artigos fornecidos.
- Ao Prof. Dr. Sebastião Timo Iaria pelo consentimento da utilização do espaço físico e equipamentos de seu laboratório.
- Ao amigo Fábio Gioia, da MS3 Comunicações, pela valiosa colaboração na elaboração do lay-out deste trabalho.
- Ao colega Fausto pelo estudo estatístico realizado e por esclarecimentos prestados.

RESUMO

O protozoário parasita *Cryptosporidium* emergiu como um dos mais importantes contaminantes da água responsável por vários surtos de criptosporidiose, afetando mais de 427.000 indivíduos em todo o mundo. Até hoje, pelo menos oito espécies do gênero *Cryptosporidium* foram descritas, mas somente o *C. parvum* têm sido associado às doenças gastrointestinais em humanos. A criptosporidiose pode ser fatal para imunocomprometidos e pode debilitar severamente indivíduos imunocompetentes. Os oocistos de *Cryptosporidium* são resistentes às pressões ambientais, podendo sobreviver por vários meses no ambiente aquático e são também resistentes à desinfecção por cloro utilizada no tratamento convencional de água. Este estudo teve como objetivos determinar a ocorrência e densidade de *Cryptosporidium* em amostras de água superficiais e tratadas (após floculação, coagulação, sedimentação, filtração e desinfecção) coletadas em duas Estações de Tratamento de Água da cidade de São Paulo. A relação entre os parâmetros da qualidade da água e a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* também foi analisada. As amostras de água foram coletadas em intervalos mensais durante o período de um ano. Estas amostras foram concentradas por "precipitação do carbonato de cálcio" (VESEY et alii, 1993a) e através da técnica da "membrana filtrante" (ALDOM & CHAGLA, 1994). Os oocistos foram identificados pela técnica de imunofluorescência direta e a presença destes foi confirmada por microscopia de contraste de fase. Os níveis de coliformes totais e *E.coli* nas amostras de água foram determinados pela técnica dos tubos múltiplos, empregando substrato fluorogênico e cromogênico (Colilert 18, Iddex). De um total de 24 amostras analisadas, de cada tipo de água (sendo 12 de cada Estação de Tratamento de Água), os oocistos foram detectados em 75% das amostras de água bruta e em 12,5% das amostras de água tratada, quando estas foram concentradas por precipitação química e em 73,91% das amostras de água bruta e 33,33% das amostras das água tratada, quando as mesmas foram concentradas pela técnica da membrana filtrante. A densidade de oocistos de *Cryptosporidium*

não apresentou correlação significativa com indicadores microbiológicos e os parâmetros físico-químicos de qualidade da água ($p > 0,05$). Os resultados obtidos sugeriram que o tratamento de água convencional é ineficaz para a remoção de oocistos, ressaltando a necessidade de estabelecer programas de gerenciamento em bacias hidrográficas (mananciais) que efetivamente garantam a baixa densidade de oocistos de *Cryptosporidium* em águas superficiais captadas para abastecimento.

SUMÁRIO	Pág.
RESUMO	
1. INTRODUÇÃO e OBJETIVOS	01
1.1. Objetivos	06
2. REVISÃO DA LITERATURA	07
2.1. O parasita <i>Cryptosporidium</i>	07
2.1.1. Histórico	07
2.1.2. Taxonomia	08
2.1.3. Ciclo de vida	09
2.2. Criptosporidiose	12
2.2.1. Epidemiologia	12
2.2.1.1. Prevalência e Incidência da criptosporidiose	12 15
2.2.1.2. Mecanismos de transmissão	
2.2.2. Manifestações clínicas e diagnóstico	17
2.2.3. Tratamento	20
2.2.4. Controle e prevenção da criptosporidiose	22
2.3. Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em água	24
2.3.1. Sobrevivência de <i>Cryptosporidium</i> no ambiente	24
2.3.2. Presença de oocistos em esgoto	25
2.3.3. Presença de oocistos em águas superficiais, subterrâneas e tratadas	26
2.4. Surtos de criptosporidiose de veiculação hídrica	28
2.5. Métodos para estudo da ocorrência de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em amostras ambientais	33

2.6. A água em tratamento	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1. Caracterização da região de estudo	46
3.2. Pontos de amostragem	50
3.3. Amostras	54
3.3.1. Coleta das amostras	54
3.3.1.1. Para a determinação de coliformes totais e <i>E.coli</i>	54
3.3.1.2. Para a pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i>	58
3.4. Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em amostras de água	59
3.4.1. Concentração das amostras de água	59
3.4.1.1. Técnica da precipitação do carbonato de cálcio	59
3.4.1.2. Técnica da dissolução da membrana filtrante	60
3.4.2. Purificação das amostras de água	62
3.4.2.1. Separação imunomagnética (IMS)	62
3.4.2.2. Flotação em gradiente de Percoll-sucrose	63
3.4.3. Detecção e quantificação de oocistos	64
3.4.3.1. Detecção de oocistos pela técnica de imunofluorescência direta (IF) e confirmação por microscopia de contraste de fase	64
3.4.3.2. Quantificação de oocistos nas amostras de água	65

3.4.4. Controle negativo das metodologias utilizadas	66
3.4.5. Análise da sensibilidade das metodologias empregadas	66
3.5. Determinação de coliformes totais e <i>E. coli</i>	66
3.6. Parâmetros físico-químicos	67
3.7. Análise estatística dos resultados	67
4. RESULTADOS	68
4.1. Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em água	68
4.1.1. Técnica da membrana filtrante para a concentração das amostras de água	69
4.1.2. Técnica da precipitação do carbonato de cálcio	70
4.1.3. Purificação das amostras de água	72
4.1.4. Imunofluorescência direta (IF) e Microscopia de contraste de fase	72
4.1.5. Controle negativo das metodologias utilizadas	74
4.1.6. Sensibilidade das metodologias empregadas	74
4.2. Indicadores bacteriológicos	75
4.3. Parâmetros físico-químicos	75
4.4. Análise estatística dos resultados	78
4.4.1. Comparação das metodologias de concentração para detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i>	78
4.4.2. Avaliação da eficiência de tratamento de água na remoção de oocistos	79

4.4.3. Comparação da qualidade da água bruta e tratada das ETAs	80
4.4.4. Correlações entre a ocorrência de oocistos e os parâmetros físico-químicos	81
4.4.5. Correlação entre a presença de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e indicadores bacteriológicos	82
5. DISCUSSÃO	83
5.1. Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em águas superficiais	83
5.2. Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em águas tratadas	86
5.3. Avaliação das metodologias propostas para a pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em amostras de água	89
5.4. Correlação entre a ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> e indicadores bacteriológicos	91
5.5. Correlação entre a ocorrência e densidade de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e parâmetros físico-químicos da água	95
6. CONCLUSÕES	97
7. RECOMENDAÇÕES	99
8. ANEXO	101
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
ABSTRACT	

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Ciclo de Vida do <i>Cryptosporidium parvum</i> (SMITH & ROSE, 1998)	10
2. Etapas do Tratamento Convencional de Água	
A. Entrada de água bruta na ETA	43
B. Lagoa de tranquilização	43
C. Decantador	44
D. Decantador; tomada superficial de água decantada	44
E. Filtros	45
F. Lavagem dos filtros	45
3. Mapa da área de estudo e localização das Estações de Tratamento de Água (ETAs)	48
4. Área de estudo – RMSP	49
5. A. Esquema da Estação de Tratamento – ETA-A	51
5. B. Esquema da Estação de Tratamento – ETA-B	52
6. Fluxograma da metodologia empregada para pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e indicadores bacteriológicos em amostras de água.	53
7. A. Captação de água da ETA-A – ponto de coleta de água bruta.	55
7. B. Captação de água da ETA-B – ponto de coleta de água bruta.	56
8. A. Coleta de água tratada no laboratório interno da ETA-A	57

8. B. Coleta de água tratada no laboratório interno da ETA-B	57
9. Frasco de coleta utilizado para pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> , empregando a precipitação do CaCO ₃ para concentração das amostras.	61
10.A. Coleta e concentração de amostra de água bruta através da técnica da membrana filtrante.	61
10.B. Membrana de acetado celulose (293 mm / 1,2µm) após a filtração de amostra de água bruta.	61
11.Porcentagem de detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostra de água bruta e tratada (ETA-A e ETA-B).	71
12.Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. detectado por IF (400x) em amostra de água bruta.	73
13.Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> sob microscopia de contraste de fase (1000x) detectado em amostra de água bruta.	73
14.Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. detectado por IF (400x) em amostra de água tratada.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela	Pág.
1. Resumo dos principais surtos de criptosporidiose associados ao consumo ou contato com águas contaminadas, relatados na literatura no período de 1983 a 1998	29
2. Dados técnicos das Estações de Tratamento de Água	50
3. Volumes (litros) filtrados das amostras de água bruta e tratada nas ETAs, A e B, utilizando-se a técnica da membrana filtrante para a concentração das amostras	58
4. A. Resultados obtidos na pesquisa de indicadores bacteriológicos e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> na ETA – A, empregando a técnica da membrana filtrante e a precipitação do carbonato de cálcio para a concentração das amostras de água bruta e tratada	68
4. B. Resultados obtidos na pesquisa de indicadores bacteriológicos e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> na ETA – B, empregando a técnica da membrana filtrante e a precipitação do carbonato de cálcio para a concentração das amostras de água bruta e tratada	69
5. A. Detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> ssp. em amostras de água bruta e tratada, utilizando a técnica da membrana filtrante para a concentração das amostras	70
5. B. Detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> ssp. em amostras de água bruta e tratada, utilizando a técnica da precipitação do carbonato de cálcio para a concentração das amostras	71

6. Porcentagem de recuperação de oocistos inoculados em três diferentes concentrações em amostras de 1 litro de água destilada e água bruta	75
7. A. Parâmetros físico-químicos obtidos na ETA-A	76
7. B. Parâmetros físico-químicos obtidos na ETA-B	77
8. Comparação da eficiência de detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em água bruta, utilizando a técnica da membrana filtrante e a precipitação do carbonato de cálcio para a concentração das amostras	78
9. Comparação da eficiência de detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em água tratada, utilizando a técnica da membrana filtrante e a precipitação do carbonato de cálcio para a concentração das amostras	79
10. Avaliação da eficiência de tratamento de água das ETAs na remoção de oocistos	80
11. Comparação da qualidade da água bruta e tratada da ETA-A e ETA-B quanto à presença de oocistos	81
12. Coeficientes de correlação linear de Pearson (r) entre os parâmetros físico-químicos e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. detectados, utilizando as técnicas de precipitação do carbonato de cálcio e da membrana filtrante para a concentração das amostras de água bruta e tratada	82
13. Coeficientes de correlação linear de Pearson (r) entre indicadores bacteriológicos, coliformes totais e <i>E. coli</i> , e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. detectados nas amostras de água bruta	82

1. INTRODUÇÃO e OBJETIVOS

A qualidade da água tem sido intensamente deteriorada em países desenvolvidos e em desenvolvimento, apresentando, desta forma, um risco potencial de comprometimento à saúde e ao bem-estar do homem (WORLD DEVELOPMENT REPORT, 1992).

O desenvolvimento industrial, o crescimento demográfico e a ocupação do solo de forma intensa e acelerada vêm provocando o comprometimento dos recursos hídricos disponíveis para consumo humano, recreação e outras atividades, aumentando consideravelmente o risco de doenças de transmissão hídrica (FIGUEIREDO, 1994).

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

Consta ainda no relatório da OMS que 80% das doenças que ocorrem nos países em desenvolvimento são ocasionadas pela contaminação da água. Sabe-se também que a cada ano, 15 milhões de crianças de 0 a 5 anos morrem direta ou indiretamente pela falta ou deficiência dos sistemas de abastecimento de água e esgotos, e que somente 30% da população mundial tem garantia de água tratada, sendo que os 70% restantes dependem de poços e outras fontes de abastecimento viáveis de contaminação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1984).

O último censo demográfico nacional, realizado em 1991, registrou a população total brasileira em 146,8 milhões de habitantes. A densidade demográfica foi calculada em 18,5 hab/Km² com variações de 2,9 na região norte a 72,3 na região sudeste e a população urbana correspondeu a 78,4% do total (OPAS, 1998).

No Brasil, os serviços de água e esgoto são ainda precários, o que poderia explicar o ressurgimento de enfermidades já erradicadas e a incidência de óbitos provocados por doenças de veiculação hídrica. Dados de 1995 indicam que 76% dos domicílios existentes no país estão conectados à rede de abastecimento de água, proporção que atinge 90% nas áreas urbanas e 17% nas áreas rurais. A distribuição por regiões mostra coberturas mais elevadas na região sudeste (96%), seguindo-se as regiões sul (93%), nordeste (84%) centro oeste (82%) e norte (70%). As informações mais recentes de âmbito nacional, sobre a qualidade da água de abastecimento referem-se a inquéritos realizados em 1989, indicando que em 83,4% das cidades servidas por serviços públicos de abastecimento de água, existia alguma forma de tratamento, convencional, parcial ou simples desinfecção (OPAS, 1998).

Dos domicílios incluídos no inquérito nacional realizado em 1995, 60% estavam conectados à rede coletora de esgoto ou a uma fossa séptica, sendo a cobertura urbana o equivalente a 71% e a rural a 14%. A fossa séptica era utilizada em 20% dos domicílios (23% urbana e 45% rural), enquanto 29% domicílios (25% urbana e 45% rural) serviam-se de fossa rudimentar ou eliminação dos dejetos em rios ou valas. Do volume total de esgotos coletados apenas 20% recebia tratamento por estação depuradora, lagoa de estabilização ou de aeração e fossas de oxidação (OPAS, 1998).

O Estado de São Paulo, com uma população de 31.546.473 habitantes (1991), a maior do país, apresenta uma densidade demográfica de 127,55 hab/Km². Aproximadamente 22 milhões de pessoas, o equivalente a 70% da população do Estado, recebem água tratada. Na região metropolitana de São Paulo (RMSP), 17 milhões de pessoas recebem o

benefício através do sistema integrado de tratamento da SABESP composto por oito sistemas produtores de água potável (SABESP, 1999).

O tratamento de água utilizado pelas Estações de Tratamento de Água (ETA) da cidade de São Paulo é do tipo convencional, envolvendo processos de coagulação, floculação, decantação, filtração e desinfecção. Porém, cada ETA é abastecida por diferentes afluentes que possuem características próprias e que variam quanto à qualidade da água. Portanto, dependendo das características da água bruta, as ETAs tem autonomia para alterar o tratamento, tornando-o mais eficiente para solucionar os problemas apresentados pelo manancial. Assim sendo, quanto mais conservado um manancial mais simples torna-se o tratamento, com conseqüente redução de custos e quanto mais comprometida a água bruta mais investimentos serão necessários.

O protozoário parasita *Cryptosporidium* é considerado como um importante patógeno emergente de veiculação hídrica, causador de gastroenterites e diarreias auto-limitadas em indivíduos sadios e infecções crônicas em imunodeficientes (UNGAR, 1995).

O *Cryptosporidium* é eliminado na forma de oocistos pelas fezes do homem e de animais infectados. A transmissão pode ocorrer através do contato indivíduo-indivíduo ou animal-indivíduo, ingestão de água e alimento contaminado, ou contato com superfícies ambientais contaminadas (MMWR, 1995; ROSE, 1990). Hospedeiros infectados podem excretar entre 10^9 e 10^{10} oocistos por grama de fezes e, portanto, tanto animais domésticos quanto selvagens podem ser considerados reservatórios de infecção humana (SMITH & ROSE, 1998).

Os oocistos são capazes de sobreviver sob as mais variadas condições do meio, sendo resistentes ao estresse ambiental e também as atuais práticas utilizadas para o tratamento de água.

A veiculação hídrica do *Cryptosporidium* é facilitada pelo longo período que o oocisto permanece viável no ambiente, pelo tamanho reduzido ($3 - 8 \mu\text{m}$) e pela baixa taxa de sedimentação ($0,5 \mu\text{m/s}$) (ROSE, 1990).

A incidência mundial de infecções causadas por *Cryptosporidium* tem variado de 0,6 a 20%, dependendo da localização geográfica. Há uma maior prevalência em populações da Ásia, Austrália, África e América do Sul. A ocorrência relatada em águas de superfície é de 4 a 100% das amostras analisadas e a densidade de 0,1 a 10.000/100L, dependendo do impacto de esgotos e animais (LISLE & ROSE, 1995).

O *Cryptosporidium* foi indicado como responsável por inúmeros surtos documentados desde 1983, afetando mais de 427.000 indivíduos (CRAUN *et alii*, 1998; UPTON, 1999). Estes surtos foram associados ao consumo de água contaminada com oocistos, tratada ou não, e também ao contato com águas recreacionais. Atualmente, o *Cryptosporidium* é a mais significativa causa de doenças de veiculação hídrica nos Estados Unidos.

O maior surto de criptosporidiose descrito na literatura, ocorreu em 1993 em Milwaukee, EUA, devido a deficiências no tratamento de água, onde aproximadamente 403.000 indivíduos foram infectados e 54 óbitos documentados (MACKENZIE *et alii*, 1994).

A criptosporidiose humana foi identificada em mais de 60 países, predominando em países subdesenvolvidos, provavelmente pela falta de condições básicas de saneamento e tratamento de água ineficiente (UNGAR, 1995).

No Brasil, inúmeros casos de criptosporidiose já foram descritos na literatura em várias cidades, principalmente no estado de São Paulo. Segundo o Ministério da Saúde¹, no período de 1980 a abril de 1999 foram notificados 4691 casos de criptosporidiose em 155.590 casos de AIDS. No município de São Paulo, o total de casos notificados de AIDS foi de 36.336 constando ocorrência de criptosporidiose em 1.013.

Por ser a água o veículo mais importante na transmissão de oocistos de *Cryptosporidium*, muitos estudos têm sido feitos sobre a ocorrência do parasita em esgotos, águas superficiais, subterrâneas e tratadas em vários países (SMITH & ROSE, 1998).

¹ CRT- DST/AIDS (Centro de referência e treinamento – doenças sexualmente transmitidas / AIDS), 1999.

Porém, no Brasil, poucos são os estudos referentes à ocorrência do *Cryptosporidium* em águas superficiais, subterrâneas e principalmente em água tratada (NEWMAN *et alii*, 1993; GAMBA *et alii*, 1997; TOMPS, 1998; RÉ, 1999; DIAS JUNIOR, 1999).

Em decorrência do número de casos de criptosporidiose registrados e da dificuldade de se inativar oocistos, muitos pesquisadores e agências de proteção ambiental vêm estudando métodos mais sensíveis de detecção e limites para a densidade de oocistos presentes em águas destinada ao consumo, visando assegurar a qualidade de água e sugerindo o monitoramento das águas de abastecimento.

Embora não exista um limite estabelecido pelo padrão internacional, alguns estudos têm proposto níveis de tolerância para a ocorrência e números de oocistos em amostras de água superficial e tratada (HASS & ROSE, 1995; WALLIS *et alii*, 1996).

Atualmente existem diferentes métodos propostos, mas ainda não padronizados, para a pesquisa de oocistos na água. Os métodos recentemente recomendados pela US-EPA (United States Environmental Protection Agency) e outros órgãos relacionados, para o isolamento e contagem de oocistos, consomem muito tempo e não são altamente eficientes para garantir a ausência de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em águas tratadas, assegurando a qualidade da água de abastecimento (SMITH & ROSE, 1998).

Por outro lado, alguns estudos relatados na literatura científica demonstraram ausência de correlação entre os parâmetros físico-químicos da água e a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras ambientais (ROSE *et alii*, 1991; THURMAN *et alii*, 1998). Do mesmo modo, muitos estudos vêm demonstrando que os indicadores bacteriológicos regulamentados por lei (coliformes totais e fecais) usados para acessar a qualidade microbiológica da água são inadequados para determinar a qualidade parasitológica da mesma (HAYNES *et alii*, 1989; ROSE, 1990; FORD & COLWELL, 1996).

1.1. OBJETIVOS

Considerando-se os poucos estudos sobre a presença de *Cryptosporidium* sp. em amostras ambientais realizados no Brasil, a ausência dos mesmos na cidade de São Paulo e a importância em se determinar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em reservatórios de águas superficiais para abastecimento público e a fim de se avaliar a eficiência do tratamento convencional de água na remoção do parasita, o presente estudo teve como objetivos:

- Pesquisar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais que são captadas para tratamento e posterior abastecimento da região metropolitana de São Paulo, estudando dois diferentes mananciais que alimentam duas estações de tratamento de água (ETA) da cidade.
- Pesquisar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água pós-tratamento destinada ao abastecimento público da RMSP e, deste modo, verificar a eficiência do tratamento de água utilizado pelas estações da cidade na remoção do parasita.
- Relacionar parâmetros físico-químicos e indicadores bacteriológicos com a presença e/ou ausência de oocistos, visando, desta forma, enfatizar a necessidade de buscar condições físico-químicas ou microbiológicas que melhor expressem a qualidade da água frente à ocorrência de oocistos.
- Estabelecer parâmetros comparativos entre duas técnicas propostas para a concentração das amostras, visando a pesquisa de oocistos em águas de alta e baixa turbidez.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O PARASITA *CRYPTOSPORIDIUM*

2.1.1. HISTÓRICO

O *Cryptosporidium* é um protozoário parasita intracelular que foi descrito inicialmente em 1907 por Ernest Edward Tyzzer. O organismo foi isolado da mucosa gástrica de ratos de laboratório assintomáticos e denominado *Cryptosporidium muris*. Em 1910, Tyzzer propôs que o *Cryptosporidium* compunha um novo gênero e *Cryptosporidium muris* uma espécie. Descreveu também o ciclo de vida do parasita o qual, com algumas ressalvas, tem sido confirmado atualmente por microscopia eletrônica. Dois anos depois, Tyzzer identificou outra espécie, *C. parvum*, cujos oocistos eram menores que os de *C. muris* (FAYER, 1997).

O *Cryptosporidium* foi considerado comensal até 1955, quando uma nova espécie, *C. meleagridis*, foi descrita e associada à infecção e morte de perus, e em 1971, o *Cryptosporidium* foi associado a diarreia bovina (ROSE, 1990; ANDRADE NETO & ASSEF, 1996), despertando o interesse veterinário no estudo deste protozoário patogênico que até então, não obtinha grandes repercussões na ciência.

Em 1976 foram relatados os primeiros casos de criptosporidiose humana. O primeiro caso foi observado em um paciente imunocomprometido e o segundo, em uma criança de 3 anos de idade residente da zona rural (ROSE, 1990). A partir de 1982, aumentaram significativamente os relatos de criptosporidiose humana em decorrência da AIDS. Inicialmente, o aumento da incidência foi limitado a indivíduos imunocomprometidos, entretanto, inúmeros surtos e infecções esporádicas em indivíduos imunocompetentes foram notificados com o desenvolvimento de recentes tecnologias laboratoriais para o diagnóstico. O conceito de criptosporidiose, sob este contexto, mudou de infecções raras e assintomáticas para uma importante causa de enterocolites e diarreias em várias espécies, incluindo o homem (BUTLER & MAYFIELD,

1996).

Em 1985 começaram os estudos sobre a ocorrência ambiental de *Cryptosporidium*, e em 1988, a agência norte americana de proteção ambiental, US-EPA (United States - Environmental Protection Agency) incluiu o *Cryptosporidium* na DWPL (Drinking Water Priority List), após os surtos ocorridos no Texas (1985) e Georgia (1987) (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

O surto de criptosporidiose ocorrido em Milwaukee, EUA, em 1993 (MACKENZIE, *et alii*, 1994), que envolveu aproximadamente 403.000 pessoas obteve repercussão mundial, aumentando significativamente o interesse nas pesquisas relacionadas ao *Cryptosporidium*.

Atualmente inúmeros estudos que abordam os mais variados temas como a caracterização molecular do *Cryptosporidium*, novas metodologias para detecção clínica e ambiental, avaliação de meios de inativação de oocistos, entre outros, vêm sendo realizados, visando principalmente, assegurar a saúde pública. Estima-se que aproximadamente 300 artigos referentes ao *Cryptosporidium* são publicados anualmente na literatura científica (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

2.1.2. TAXONOMIA

O gênero *Cryptosporidium* pertence ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoa*, subclasse *Coccidia*, ordem *Eucoccidiida*, subordem *Eimeriina*, família *Cryptosporidiidae* (ROSE, 1990).

A maioria dos coccídias são protozoários pequenos que completam seu ciclo de vida intracelularmente no trato digestivo, epitélio, fígado, rins, células sanguíneas ou outros tecidos animais. A subordem *Eimeriina* contém centenas de espécies predominantemente parasitas de animais domésticos e poucos parasitas humanos. As três famílias que pertencem a esta subordem são *Sarcocystidae*, *Eimeriidae* e *Cryptosporidiidae*. A família *Cryptosporidiidae* inclui apenas um gênero, *Cryptosporidium*, e os organismos pertencentes a este completam seu ciclo de vida em um único hospedeiro (ROSE, 1990).

O *Cryptosporidium* é um parasita entérico e desenvolve-se no epitélio

da mucosa intestinal ou gástrica de diversos vertebrados. Os oocistos de *Cryptosporidium* diferem morfológicamente de todos os outros gêneros da subordem *Eimeriina*. Nestes, os oocistos são frequentemente maiores (10 - 40µm) e variam quanto ao número de esporocistos que se diferenciarão em esporozoítos. Os oocistos de *Cryptosporidium* são esféricos ou ovóides, medindo de 3 a 8µm de diâmetro e possuem internamente 4 esporozoítos (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

Após a primeira descrição de Tyzzer, muitas espécies de *Cryptosporidium* foram identificadas em peixes, répteis, aves e mamíferos, e nomeadas baseadas no hospedeiro em que foram isoladas, acreditando-se, erroneamente, que as espécies deste gênero eram hospedeiras específicas (FAYER, 1997; ROSE, 1990). Na década de 80, aproximadamente 20 espécies (FAYER & UNGAR, 1986) foram identificadas, porém estudos posteriores de morfologia e transmissão cruzada invalidaram muitas destas, e apesar das controvérsias quanto a taxonomia do parasita, atualmente são reconhecidas 8 espécies de *Cryptosporidium*: *C. baileyi* que infecta aves, *C. felis* que infecta gatos, *C. meleagridis* que infecta perus, *C. muris* que infecta mamíferos, *C. nesorum* que infecta peixes, *C. serpentis* que infecta répteis, *C. wrairi* que infecta cobaias e *C. parvum* que infecta mamíferos. A espécie *C. parvum* tem sido considerada a única capaz de infectar o homem. Acredita-se, também que esta seja capaz de infectar 79 espécies de mamíferos, e embora alguns isolados da mesma tenham sido diferenciados em nível molecular e quanto a virulência, nada significativo tem sido reportado para merecer outra categoria taxonômica (FAYER, 1997).

2.1.3. CICLO DE VIDA

O *Cryptosporidium* difere de outros coccídios por sua capacidade de desenvolver-se completamente em um único hospedeiro (Fig. 1) (ROSE, 1990).

O oocisto esporulado é o único estágio exógeno, que consiste em 4 esporozoítos móveis envolvidos por uma dupla camada de parede que confere resistência ao organismo. Os oocistos são excretados nas fezes de

Fig. 1. Ciclo de Vida do *Cryptosporidium parvum* (SMITH & ROSE, 1998).

um hospedeiro infectado e a fase endógena começa após estes serem ingeridos por um hospedeiro suscetível. Os esporozoítos são liberados através da ruptura da parede do oocisto quando expostos a temperaturas corporais, ácido, tripsina e sais biliares, e aderem às células epiteliais do trato gastrointestinal, usualmente íleo ou jejuno, ou trato respiratório (mais comum em aves). Estudos *in vitro* demonstraram que os esporozoítos de *Cryptosporidium* também podem desencistar em soluções aquosas mornas, o que possibilita e justifica as infecções e autoinfecções em sítios extraintestinais como conjuntiva do olho, trato respiratório, vesícula biliar, linfonôdos, testículos, ovário, útero e vagina (FAYER, 1997).

Os esporozoítos penetram nas microvilosidades da célula epitelial do intestino delgado, formando um vacúolo parasitóforo, envolvido por membranas das células hospedeiras e do próprio parasita (CURRENT & HAYNES, 1983). Esporozoítos e todos os estágios subsequentes endógenos, assexual e sexual, ocorrem no vacúolo parasitóforo o qual é intracelular mas extracitoplasmático (SMITH & ROSE, 1998).

Os esporozoítos diferenciam-se dentro de trofozoítos esféricos e a multiplicação assexuada chamada esquizogonia ou merogonia resulta na formação de dois tipos de esquizontes ou merontes multinucleados. O tipo I que libera de 6 a 8 merozoítos que, teoricamente, podem infectar células vizinhas, ocorrendo novo ciclo assexuado com formação de outros merontes do tipo I ou podem desenvolver-se em merontes do tipo II o qual contém 4 merozoítos. Somente merozoítos de merontes do tipo II iniciam o ciclo sexuado (gametogonia), onde os merozoítos diferenciam-se em microgametócitos ou macrogametócitos. A divisão nuclear no microgametócito leva a formação de numerosos microgametas os quais são liberados do vacúolo parasitóforo e cada macrogametócito é fertilizado por um microgameta. O produto da fertilização, o zigoto, desenvolve-se dentro de um oocisto, sofrendo meiose e originando 4 esporozoítos (esporogonia). Os oocistos são liberados no lúmen do intestino e excretados nas fezes, podendo infectar outro hospedeiro susceptível, reiniciando o ciclo ou podem ainda, causar autoinfecção no mesmo hospedeiro infectado (SMITH & ROSE, 1998).

Cada geração do parasita pode se desenvolver e maturar de 12 a 14 horas e o período entre a ingestão de oocistos e a excreção destes nas fezes varia de hospedeiro para hospedeiro e também da espécie de *Cryptosporidium* (FAYER, 1997).

2.2. CRIPTOSPORIDIOSE

2.2.1. EPIDEMIOLOGIA

2.2.1.1. Prevalência e incidência da criptosporidiose

A infecção por *Cryptosporidium* já foi descrita em mais de 60 países distribuídos pelos seis continentes (UNGAR, 1995), envolvendo indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos, independentemente do sexo e da idade, residentes de áreas rurais e urbanas.

O *Cryptosporidium* tem sido considerado em vários países o mais importante protozoário parasita intestinal, superando a ocorrência de *Giardia* e *Entamoeba* (ROSE, 1990).

No Brasil, vários trabalhos vêm comprovando a predominância do *Cryptosporidium* em casos de diarreias e enterocolites. MOURA *et alii* (1989) em estudo de ocorrência de parasitas entéricos em pacientes com AIDS no Rio de Janeiro, observaram que o *Cryptosporidium*, *Entamoeba coli* e *Endolimax nana* foram os parasitas predominantes. MADI *et alii* (1991) estudando a biopsia jejunal em pacientes HIV, no Rio de Janeiro, relataram que o *Cryptosporidium* foi o organismo mais comumente associado com diarreia (21,7%) nos pacientes. Em outro estudo realizado para determinar a frequência dos patógenos parasitas em pacientes HIV realizado em Fortaleza, o *Cryptosporidium parvum* e o *Microsporidium* foram os parasitas intestinais mais comuns associados com diarreia (WUHIB *et alii*, 1994).

AVERBACH *et alii* (1998) descreveram que o citomegalovírus foi predominantemente encontrado (27,1%) em pacientes HIV com doenças colorretais em São Paulo, seguido por *Cryptosporidium* (13,1%). TOMPS (1998) encontrou maior prevalência de *Cryptosporidium* sobre outros parasitas intestinais pesquisados em fezes, no estudo epidemiológico realizado em Perus, São Paulo.

Alguns estudos demonstram que a criptosporidiose tem apresentado variação sazonal, sendo mais freqüente nos meses quentes e úmidos (UNGAR, 1990).

A prevalência de criptosporidiose tem sido maior em países

subdesenvolvidos devido, provavelmente a falta de condições básicas de saneamento e tratamento de água ineficiente (UNGAR, 1995).

Estudos de prevalência têm mostrado que a infecção em populações não portadoras de HIV com diarreia, em países desenvolvidos, varia entre 0,3% e 4,3% e, nos países em desenvolvimento entre 1,3 e 22,2%; na população infectada pelo HIV, esses índices são maiores, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde cerca de 50% das diarreias são causadas pelo *Cryptosporidium*, nos países desenvolvidos este índice varia entre 8% e 30% (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996). Outros estudos relatam prevalência de 1-3% em países desenvolvidos da Europa e América do Norte e entre 5% (Ásia) e 10% (África) em países em desenvolvimento (UNGAR, 1995).

Estudos de soroprevalência usando a técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) para detectar imunoglobulinas específicas, IgM, IgG ou IgA, contra o *Cryptosporidium*, sugerem que a criptosporidiose pode ser mais comum que aquela relatada através de análise clínica das fezes. Na Europa e América do Norte, por exemplo, a soroprevalência é de 25 a 35% (UNGAR, 1995).

No Brasil, NEWMAN *et alii* (1994) estudaram a epidemiologia da criptosporidiose em uma comunidade na cidade de Fortaleza, e verificaram que 94% dos indivíduos estudados apresentavam anticorpos (IgM e IgG) para *Cryptosporidium*.

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

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde¹, no período de 1980 a abril de 1999 foram notificados 155.590 casos de AIDS nos quais consta ocorrência de criptosporidiose em 4.691. No estado de São Paulo, segundo a Secretaria de Estado da Saúde, em um total de 78.396 casos de AIDS notificados a ocorrência de criptosporidiose foi de 2070. E no município de São Paulo, o total de casos notificados de AIDS foi de 36.336 constando a ocorrência de criptosporidiose em 1.013.

Vários estudos clínicos estão sendo realizados em diferentes cidades do

País em função da importância crescente deste patógeno na área médica, seja como agente de infecções oportunistas em imunodeficientes ou como importante causador de enterocolites em imunocompetentes.

Em um estudo sobre a ocorrência de criptosporidiose em portadores do HIV, na cidade de São Paulo, 12,1% dos pacientes apresentaram oocistos de *Cryptosporidium* nas amostras de fezes (DIAS, 1988). Também na cidade de São Paulo, GUIZELINE (1991) observou prevalência de criptosporidiose em 21,25% de HIV positivos, 12,10% em crianças e 3,62% em indivíduos sadios.

RODRIGUES *et alii* (1991) relataram prevalência de criptosporidiose de 14,3% em pacientes com HIV em São Paulo. SAUDA *et alii* (1993) observaram prevalência de 19,1% de *Cryptosporidium* sp. e 9,9% de *Isospora belli* em pacientes com AIDS na cidade de Santos, São Paulo. Em estudo sobre a importância do diagnóstico laboratorial da criptosporidiose e outros coccídios, o *Cryptosporidium* foi identificado em 18% dos pacientes sendo que 90% destes eram HIV positivo (GARLIPP *et alii*, 1995). CHIEFFI *et alii* (1998) em estudo realizado em São Paulo, determinaram a frequência de infecção por *C. parvum* em pacientes com transplante renal (34,8%) e pacientes com insuficiência renal (25%).

A criptosporidiose é também bastante comum em crianças menores de 2 anos e tende a diminuir com a idade, principalmente entre a faixa etária de 3 a 5 anos (UNGAR, 1995; ANDRADE NETO & ASSEF, 1996).

LOUREIRO *et alii* (1990) estudando a ocorrência de criptosporidiose em crianças em Belém encontraram prevalência de 5,2%. MANGINI *et alii* (1992) observaram prevalência de criptosporidiose de 17,43% em crianças de 1 a 2 anos de idade em São Paulo. LIMA *et alii* (1992) estudando casos de diarreias persistentes em crianças da cidade de Fortaleza relataram prevalência de criptosporidiose de 13%.

FRANCO & CORDEIRO (1996) observaram prevalência de 6,4% de *Cryptosporidium parvum* e 13,5% de *Giardia duodenalis* em crianças de creches na cidade de Campinas, São Paulo. Em estudo realizado com crianças de 0 a 12 anos em Uberlândia, Minas Gerais observou-se prevalência de criptosporidiose de 4,26%, relatou-se também que as

infecções variaram com a idade e apresentaram variação sazonal (GENNARI CARDOSO *et alii*, 1996).

MOITINHO *et alii* (1997) observaram a ocorrência de *Cryptosporidium* sp em 6,6,% de amostras de fezes de crianças do município de Maringá, PR, nas quais não foi observado a presença de outros protozoários ou helmintos. MARTINS *et alii* (1998) estudando a frequência de *Cryptosporidium* sp. associado à pacientes com diarreia na cidade de Ribeirão Preto, SP encontraram positividade de 15,42%.

Em estudo epidemiológico realizado em Fortaleza foram identificados oocistos de *Cryptosporidium* em 7,4% das amostras de fezes de crianças com infecção sintomática e assintomática (NEWMAN *et alii*, 1999).

2.2.1.2. Mecanismos de transmissão

Os oocistos de *Cryptosporidium* são transmitidos por via fecal-oral através do contato indivíduo-indivíduo ou animal-indivíduo, contato com superfícies contaminadas ou ainda pela ingestão de água e alimento contaminados (ROSE, 1990; MMWR, 1995; FAYER, 1997).

A transmissão zoonótica não é reconhecida como uma importante via de disseminação da infecção, embora o *Cryptosporidium parvum* tenha sido identificado em aproximadamente 80 espécies de mamíferos e a transmissão cruzada tenha sido demonstrada entre uma variedade de espécies hospedeiras, indicando, portanto, que animais selvagens e domésticos podem ser importantes reservatórios de infecção humana, contribuindo também para a contaminação do ambiente. Os casos de transmissão zoonótica descritos, geralmente estão associados a visitas a regiões rurais e contatos com animais do campo e suas excretas, ou ainda com o consumo de leite bruto – fatores que freqüentemente estão associados às condições de higiene insatisfatórias. O contato com animais, particularmente gatos e cachorros, também tem implicado, ocasionalmente, em infecção humana, porém na maioria dos casos de criptosporidiose descritos, esses animais raramente são apontados como fonte da infecção (FAYER, 1997).

Há relatos de infecções adquiridas em função das atividades

profissionais, como casos descritos com trabalhadores rurais e veterinários. Estas infecções, particularmente, podem ocasionar alto nível de imunidade e ocorrer assintomaticamente ou mais branda e repetidamente. Indivíduos ocupacionalmente expostos também podem ocasionar a disseminação intradomiciliar da doença. Entretanto, casos de transmissão indivíduo-indivíduo são mais freqüentes em hospitais, creches e escolas (ROSE, 1990; ANDRADE NETO & ASSEF, 1996; FAYER, 1997).

O reconhecimento da importância da transmissão através do ambiente tem aumentado, especialmente com a ocorrência de numerosos surtos de criptosporidiose de veiculação hídrica. Surtos associados com consumo de água contaminada são provavelmente resultantes da poluição humana e animal do ambiente. Porém, a contribuição relativa de excretas de animais não está atualmente esclarecida. A utilização de fezes animais como adubo orgânico em culturas vegetais pode levar a infecção direta pela formação de aerossóis ou contaminar águas superficiais e subterrâneas. Os surtos de criptosporidiose de veiculação hídrica têm sido associados, geralmente, ao consumo de água insatisfatoriamente tratada, à falhas nos sistemas operacionais de estações de tratamento de água e ao contato com águas recreacionais contaminadas como represas, lagos e piscinas (FAYER, 1997).

Alguns fatores biológicos e características próprias do *Cryptosporidium* facilitam a transmissão da doença através da água. A ausência de uma terapia específica para o tratamento e o alto número de oocistos excretados por hospedeiros infectados, assim como a ampla variedade de hospedeiros que atuam como reservatório da infecção ou favorecem a transmissão cruzada aumentam o potencial de disseminação da criptosporidiose com a contaminação do ambiente (FAYER, 1997).

A criptosporidiose também tem sido associada ao consumo de certos alimentos como lingüiça fresca, leite fresco e carne ou peixe em más condições para consumo. O primeiro relato de infecções adquiridas através da ingestão de alimentos contaminados com oocistos de *Cryptosporidium* ocorreu em 1994, na cidade de Maine, EUA, onde 213 pessoas foram infectadas após o consumo de suco de maçã fresco (FAYER, 1997).

2.2.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

A criptosporidiose tem o potencial de atingir indivíduos de todas as idades, desde crianças de 3 dias de vida, filhos de mães com infecção, a pacientes de 95 anos de idade. O espectro da criptosporidiose pode variar desde portador assintomático até diarreias severas semelhantes à da cólera (ANDRADE & ASSEF, 1996).

Em um estudo realizado com primatas, a ingestão de 10 oocistos foi capaz de causar infecção e o tamanho do inóculo não apresentou relação com a severidade da doença (MILLER *et alii*, 1990). Entretanto, segundo SMITH & ROSE (1998) a intensidade da doença varia de acordo com a dose infectiva, sendo esta, geralmente baixa para o homem. Estudos realizados com voluntários sadios constataram que a dose infectiva média é de 132 oocistos (DUPONT *et alii*, 1995), sendo menor em indivíduos imunocomprometidos. Porém, foi relatado que a ingestão de apenas um oocisto de *Cryptosporidium* pode levar à infecção (WATANABE, 1996).

A susceptibilidade do indivíduo à infecção assim como a severidade e duração da mesma variam consideravelmente de indivíduo para indivíduo, dependem também da saúde imunológica, do estado nutricional e exposição prévia (UNGAR, 1995). Do mesmo modo, uma resposta imuno adquirida pode limitar a duração e a severidade da infecção. O período entre a ingestão de oocistos e o desenvolvimento de sintomas, é de 7-10 dias, podendo variar de 5-28 dias (FAYER & UNGAR, 1986). ONGERTH & STIBBS (1987) relataram que bezerros infectados excretam de 10^5 a 10^7 oocistos por grama de fezes. Outros autores afirmam que hospedeiros infectados podem excretar entre 10^9 e 10^{10} oocistos (SMITH & ROSE, 1998). BUTLER & MAYFIELD (1996) relataram que de 2 a 20 bilhões de oocistos foram coletados em fezes de bezerros experimentalmente infectados após um período de 24 horas.

Diarréia, dor abdominal, febre baixa ($<39^{\circ}\text{C}$), indisposição, fraqueza, fadiga, perda de apetite e peso, náusea e vômito são sintomas comuns decorrentes da infecção. A diarréia, sintomatologia mais frequente, pode ser

contínua ou intermitente, aquosa e intensa (12-17 L/dia), podendo conter muco, mas raramente sangue e leucócitos. Diarréias intensas apresentando 71 evacuações/dia e volumes excretados de 25 L/dia foram descritos em pacientes imunodeprimidos (FAYER & UNGAR, 1986; UNGAR, 1995).

Outras manifestações clínicas associadas com a criptosporidiose incluem colecistites, hepatite, pancreatite, artrite e uma variedade de problemas respiratórios. O papel casual do *Cryptosporidium* nesses sintomas não está estabelecido. A criptosporidiose no trato respiratório não reflete em disfunção pulmonar severa e na maioria dos casos, outros patógenos pulmonares foram detectados concomitantemente, como por exemplo, o citomegalovírus (UNGAR, 1995).

O ciclo de vida rápido e os ciclos auto-infectivos do *Cryptosporidium* podem levar ao grande número de células parasitadas no intestino delgado ocasionando infecções secundárias do duodeno e intestino grosso. Em indivíduos imunocomprometidos o parasita tem sido encontrado no estômago, ducto biliar e pancreático, além do trato respiratório (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

No paciente imunocompetente, a doença é autolimitada, os sintomas frequentemente têm início súbito, com diarréia durando cerca de 10 a 14 dias, embora existam casos descritos tão prolongados quanto três a cinco semanas. Os sintomas desaparecem espontaneamente e em poucos meses obtém-se a cura parasitológica. A excreção do oocisto nas fezes é intermitente e costuma ser mais prolongada que a fase sintomática da doença (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996).

Em indivíduo imunodeprimido, a infecção é crônica e a severidade e persistência da diarréia é superior àquela de indivíduos imunocompetentes, podendo persistir indefinidamente e evoluir para intensa desidratação e óbito. Entretanto, não há dados que indiquem que indivíduos imunodeprimidos são mais susceptíveis à infecção que os indivíduos imunocompetentes. Entretanto, aqueles com sistema imune comprometido são mais severamente afetados pela criptosporidiose (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

Em portadores do vírus HIV, o grau de imunodeficiência correlaciona-se

com a severidade da infecção. A contagem de linfócitos CD₄ é útil para prever o curso da infecção pelo *Cryptosporidium*. Tem sido demonstrado que quando a contagem de CD₄ está acima de 180 células/mm³, a diarreia geralmente é autolimitada; em contraste, indivíduos com CD₄ abaixo de 140 células/mm³ tendem a apresentar a forma persistente da doença (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996).

Infecções intestinais assintomáticas são consideradas infrequentes e usualmente são encobertas durante os surtos epidemiológicos, mas é provável que sejam subestimadas pela dificuldade que há em se detectar pequeno número de oocistos (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

O mecanismo exato pelo qual a infecção é causada no homem é incerto (FAYER & UNGAR, 1986). A natureza e intensidade da diarreia sugerem a participação de enterotoxinas, porém a presença de nenhuma destas ainda foi demonstrada (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

A criptosporidiose não pode ser clinicamente distinguida de outras diarreias causadas por numerosos outros organismos patogênicos, portanto o diagnóstico mais comumente usado é o exame de fezes para a detecção dos oocistos utilizando a coloração de Giemsa ou uma de suas variações, por ser de realização rápida, fácil e pouco dispendiosa (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996; FAYER, 1997).

Outras técnicas de coloração também podem ser usadas, como verde-malaquita, metenamina de prata e nicrosina, bem como colorações fluorescentes, como auramina-rodamina, auramina-carbol-fuscina. A imunofluorescência direta, que emprega anticorpos monoclonais, também pode ser usada, aumentando a sensibilidade de detecção. Em amostras de tecidos, o *Cryptosporidium* pode ser facilmente identificado com a coloração hematoxilina-eosina (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996).

A imunoglobulina específica contra o *Cryptosporidium* pode ser detectada por imunofluorescência no soro, tanto em indivíduos imunocompetentes quanto imunodeprimidos, porém o diagnóstico sorológico não é útil para o diagnóstico da doença aguda, pois o anticorpo permanece

detectável por longos períodos, tendo utilidade somente em inquéritos soroepidemiológicos (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996).

Metodologias moleculares como por exemplo o PCR (polymerase chain reaction) têm sido desenvolvidas e apresentado uma sensibilidade maior em estudos preliminares, porém ainda não são frequentemente utilizadas em rotina para diagnóstico (FAYER, 1997).

2.2.3. *TRATAMENTO*

Atualmente, não existem vacinas para prevenir a criptosporidiose, assim como terapias paliativas ou definitivas eficazes no controle ou eliminação do parasita do hospedeiro infectado. Em pacientes imunocompetentes ou temporariamente imunocomprometidos, a infecção é auto-limitada e o tratamento, geralmente, desnecessário, embora recomende-se que a sintomatologia seja controlada através da reposição de líquidos por via oral ou parenteral (UNGAR, 1995).

É recomendável também que indivíduos infectados que estejam em tratamento com imunossupressores suspendam temporariamente o uso das drogas para recuperar-se da criptosporidiose (BUTLER & MAYFIELD, 1996; UNGAR, 1995).

O tratamento para indivíduos imunodeficientes é mais crítico, necessitando de intervenção farmacológica. Alguns agentes antidiarréicos não específicos, incluindo subsalicileto de bismuto, kaolin, pectina, difenoxilato, opiáceos e loperamida proporcionam uma melhora temporária quando associados ao tratamento de reidratação (UNGAR, 1995).

A avaliação de diversos agentes farmacológicos e estudos que visam o tratamento da criptosporidiose vêm sendo desenvolvidos e relatados com frequência, porém nenhum resultado efetivo foi ainda descrito (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996; UNGAR, 1995).

Imunomoduladores biológicos, fator de transferência bovina (extrato de leucócitos bovino dializados) e HBC (coloostro bovino hiperimune) são modalidades terapêuticas promissoras embora difíceis de serem preparadas e padronizadas. Moduladores biológicos extraídos de linfonôdos de bezerros

previamente infectados, foram utilizados no tratamento de 12 pacientes com AIDS onde 4 obtiveram a cura da infecção e somente 2 não responderam ao medicamento. O HBC tem diminuído a intensidade das fezes mas não proporciona a cura parasitológica (UNGAR, 1995). Não se sabe exatamente qual o mecanismo de ação do HBC, porém a melhora clínica ocorre provavelmente, devido ao incremento da imunidade em nível de mucosa, a qual acredita-se ser um mecanismo de defesa importante contra o parasita (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996).

Há alguns relatos da melhora de alguns pacientes com diarreia com o uso da azidotimidina, o que se deve mais provavelmente à melhora da imunidade do que a um efeito da droga sobre o protozoário. Tem-se descrito, também, melhora da criptosporidiose com o uso de octreotida, um derivado sintético de ação prolongada da somatostatina que geralmente é usada para controlar sintomas de diarreia secretória, porém não tem sido demonstrado benefício significativo no tratamento (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996).

Mais recentemente, estudos empregando a azitromicina vêm demonstrando melhora clínica e parasitológica, porém estudos controlados estão em andamento para comprovar a eficácia da droga. A paromomicina, um aminoglicosídeo utilizado para o tratamento de giardíase e amebíase intestinais, tem demonstrado melhora sintomática da diarreia por *Cryptosporidium* em pacientes com HIV, porém outros estudos estão sendo realizados para confirmar seu valor terapêutico (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996; BUTLER & MAYFIELD, 1996).

Similarmente às recomendações para humanos, o tratamento efetivo para animais com criptosporidiose requer reidratação oral ou parenteral com fluídos e eletrólitos, em adição a antidiarréicos e quimioterapia. Estudos de avaliação de quimioterápicos no tratamento de criptosporidiose em répteis e aves também não obtiveram resultados efetivos, porém, alguns compostos avaliados em roedores têm sido promissores (FAYER, 1997).

2.2.4. CONTROLE E PREVENÇÃO DA CRIPTOSPORIDIOSE

O controle da criptosporidiose é frequentemente limitado pela alta resistência dos oocistos aos desinfetantes comumente utilizados como amônia, hipoclorito de sódio e cloro. A ausência de um tratamento efetivo para combater a infecção aumenta a magnitude dos casos e reforça a importância de se prevenir a criptosporidiose (UNGAR, 1995).

Assim sendo, cuidados com higiene pessoal e na manipulação de excretas de animais, eliminação sanitária das fezes, descarte correto de material contaminado, isolamento de pacientes infectados e a notificação de casos à autoridade local de saúde, são comportamentos importantes na prevenção da criptosporidiose (FAYER, 1997; UNGAR, 1995).

Sendo a criptosporidiose iniciada pela ingestão ou, em menor escala, pela inalação de oocistos, medidas para prevenir ou limitar o aumento de infecção devem ser tomadas, eliminando ou reduzindo oocistos infectivos no ambiente (BUTLER & MAYFIELD, 1996; FAYER, 1997).

O controle de oocistos em águas de abastecimento público, diante da resistência destes ao tratamento convencional de água é uma preocupação de âmbito mundial e inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos para este fim. BERNHARDT & CLASEN (1996) *apud* UK DEPARTMENT OF THE ENVIRONMENT (1998) discutiram a otimização de processos de tratamento de água para prevenir a ocorrência de infecções causadas por *Cryptosporidium* e *Giardia* associadas ao consumo de água tratada.

O tamanho reduzido dos oocistos, assim como a flexibilidade aparentemente existente, facilitam a passagem do *Cryptosporidium* nos processos de filtração efetuados durante o tratamento de água para abastecimento. ROSE *et alii* (1988a) relataram que 57% de oocistos foram capazes de atravessar uma membrana filtrante de 3 µm de porosidade. Por outro lado, em análise da água de lavagem de filtros rápidos foram observadas altas concentrações (de 2906 a 24.306 oocistos/L), indicando que os filtros foram efetivos na remoção de oocistos (ROSE, 1990). Analisando o número de oocistos detectados na água bruta e na mesma pós-tratamento observou-se uma eficiência na remoção em 91% (STERLING, 1990). A

filtração sem prévia coagulação apresentou remoção estimada de oocistos de 54,6% e 91,4% de efluentes e águas superficiais (rios), respectivamente. Por outro lado, oocistos foram detectados em água pós-tratamento convencional (coagulação, sedimentação, filtração e cloração) e a remoção foi estimada em 93,3%, sendo que nenhum problema operacional foi identificado. A cloração como processo único de tratamento pode reduzir em até 89,8% os oocistos. Novos estudos estão sendo realizados a fim de otimizar os processos de tratamento, otimizando processos de filtração, condições operacionais, incluindo a dosagem de coagulante, mistura, monitoramento de filtros (ROSE, 1990). Problemas como dosagens de coagulantes, processos inadequados de mistura, monitoramento insatisfatório de filtros, turbidez, uso de filtros saturados, entre outros foram analisados na Pennsylvania por CONSONERY *et alii* (1997), onde com a otimização dos processos as amostras positivas foram reduzidas de 35% a valores inferiores a 5%.

Os oocistos e outros microrganismos que efetivamente não foram removidos por filtração deveriam, portanto, ser inativados através do processo de desinfecção. Porém, os oocistos de *Cryptosporidium* têm se mostrado, consideravelmente, resistentes aos efeitos da maioria dos desinfetantes comerciais.

Embora o cloro e componentes relacionados possam reduzir a habilidade de oocistos desencistar e infectar, a concentração relativamente alta e o longo período de exposição necessário, limita a aplicação da prática. Para a maioria dos produtos químicos estudados, concentrações efetivas não são usuais para a desinfecção extra-laboratorial, e altas concentrações que reduzem a infectividade são caras e tóxicas. A exposição a amônia líquida ou gasosa e ao peróxido de hidrogênio têm sido efetiva na redução e eliminação de oocistos (FAYER, 1997).

CAMPBELL (1982) demonstrou que o *Cryptosporidium* é capaz de se manter viável quando exposto ao hipoclorito de sódio e ao cloro. Assim sendo, a desinfecção através do cloro nas concentrações comumente utilizadas nos tratamentos convencionais de água não são efetivas na inativação do parasita (ROSE, 1990).

Devido às altas dosagens e longos períodos de exposição necessários para a desinfecção, a irradiação ultravioleta não é considerada uma prática viável para a desinfecção de oocistos. Uma tecnologia relativamente nova usando intensos “flashes” de luz branca de amplo espectro tem sido efetiva na obtenção de oocistos de *C.parvum* não infectivos para camundongos (FAYER, 1997).

O ozônio tem sido indicado, por alguns autores, como um dos mais importantes desinfetantes químicos na inativação de oocistos (FAYER, 1997). PEETERS *et alii* (1989) e KORICH *et alii* (1990) relataram que para valores de CT entre 3,5 -10 mg/min/L, 99-99,99% de oocistos foram inativados.

Estudos laboratoriais têm sido realizados para avaliar os limites de sobrevivência de oocistos expostos ao calor, frio, dessecação e irradiação ultravioleta. Consta na literatura científica que temperaturas superiores a 64,2°C por 5 minutos e 72,4°C por 1 minuto inativam os oocistos. Por outro lado, oocistos suspensos em água e leite se mantêm infectivos quando expostos a 71,7°C por 5, 10 e 15 segundos. Os oocistos podem resistir ao congelamento a -20°C por longos períodos, mas não sobrevivem a -70°C. Não há na literatura estudos que avaliem os efeitos de múltiplos fatores ou repetidos aquecimentos e congelamento a temperaturas subletais (BUTLER & MAYFIELD, 1996; FAYER, 1997).

2.3. OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM SPP.* EM ÁGUA

2.3.1. SOBREVIVÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* NO AMBIENTE

O *Cryptosporidium* está presente no ambiente na forma de oocistos que lhe confere a capacidade de sobreviver sob as mais variadas condições ambientais. Entretanto, os esporozoítos ao desencistar morrem rapidamente quando expostos às condições diferentes daquelas encontradas nos seus hospedeiros (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

Os oocistos são capazes de sobreviver por longos períodos na água (176 dias em média), incluindo a água do mar (35 dias), suportando ampla

variação de temperatura. A luz natural do sol não altera a viabilidade dos oocistos (CHAURET *et alii*, 1995), porém estes são sensíveis a desidratação (ROBERTSON *et alii*, 1992).

ROBERTSON *et alii* (1992) analisaram o efeito de vários parâmetros físico-químicos sobre a sobrevivência de oocistos e relataram que oocistos em contato com fezes tornaram-se mais resistentes às pressões ambientais. O material fecal, possivelmente protege os oocistos da dessecação prolongando a viabilidade no ambiente (FAYER, 1997).

CHAURET *et alii* (1995) observaram que a sobrevivência de oocistos na água sob condições naturais foi menor que sob condições laboratoriais e sugeriram que a atividade microbiana no ambiente natural contribui para destruição eventual de oocistos através, por exemplo, da predação, concluindo, portanto, que a sobrevivência *in situ* pode não ser tão extensa como ocorre sob condições controladas.

2.3.2. PRESENÇA DE OOCISTOS EM ESGOTOS

A ocorrência de oocistos em esgotos é influenciada pelo tamanho da comunidade, assim como a taxa de infecção em uma população.

Embora seja alto o número de oocistos que possa ser encontrado no esgoto bruto, em geral, a descarga destes em efluentes é baixa. Contudo, é evidente que esta é uma fonte significativa de contaminação do ambiente, constituindo risco em potencial para infecções em homens e animais. Além disso, muitas águas superficiais destinadas a diferentes usos (abastecimento, irrigação e recreação) recebem despejos de esgotos (SMITH & ROSE, 1998).

Durante um estudo realizado com esgoto bruto de uma comunidade durante um surto de criptosporidiose, a densidade diminuiu de 34 oocistos/litro para 1,2 oocistos/litro após o término da epidemia (ROSE *et alii*, 1987) apud ROSE (1990).

ROACH *et alii* (1993) estudando a prevalência de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em amostras de esgotos em Yukon, Canadá, observaram concentrações de até 333 oocistos por litro e de 3.511

cistos por litro respectivamente. WALLIS *et alii* (1996) pesquisaram oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em 1.173 amostras de águas superficiais e esgotos coletados em diferentes regiões do Canadá. Cistos de *Giardia* foram detectados em 245 amostras (21%) de água superficial e 119 (73%) das amostras de esgoto, enquanto, oocistos de *Cryptosporidium* foram observados em 53 (4,5%) e 10 (6,1%) das amostras respectivamente.

ROSE *et alii* (1988a) relataram que em 91% das amostras de esgotos pesquisados nos Estados Unidos foram encontrados oocistos. Estudos realizados com efluentes de esgotos nos Estados Unidos e Reino Unido relataram ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* que varia de 25,5 a 100%, com densidade variando de 0,6 a 3.960 oocistos por litro (SMITH & ROSE, 1998). Porém, níveis tão alto quanto 13.700 oocistos/litro em esgoto bruto já foram descritos, anteriormente, na literatura (ROSE, 1990).

No Brasil, DIAS JUNIOR (1999) estudou a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em 2 amostras de esgoto no município de Araras, São Paulo e observou positividade de 100% com densidade média de 472 oocistos/L.

FARIAS² pesquisou a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em 24 amostras de água de esgoto e córregos da cidade de São Paulo, e detectou 100% de positividade, com concentrações que variaram de 50 a 1200 oocistos por litro em esgotos e de 48 a 1400 oocistos por litro em córregos.

2.3.3. PRESENÇA DE OOCISTOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS, SUBTERRÂNEAS E TRATADAS

Estudos de prevalência indicam que mais de 50% das águas superficiais e 37% de água tratada no Reino Unido podem estar contaminadas com *Cryptosporidium*. Pesquisas realizadas nos EUA demonstraram que mais que

² FARIAS, E.W.C. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Salmonella* spp. em amostras de águas de esgoto e córrego da cidade de São Paulo. São Paulo [Dissertação de mestrado em elaboração – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

80% das águas superficiais e 26% das águas tratadas analisadas continham oocistos de *Cryptosporidium*, com densidade variando de 0,001 a 484 oocistos por litro em águas superficiais e de 0,005- 0,17 oocistos por litro em águas tratadas (SMITH & ROSE, 1998). Do mesmo modo, foram detectados oocistos em 77% e 75% de amostras de água de rios e lagos dos EUA respectivamente, em 83% das águas superficiais protegidas da atividade humana e em 28% das amostras de água tratada (ROSE, 1988a).

Outros estudos realizados nos EUA relatam níveis de ocorrência de oocistos em águas superficiais (lagos, represas e rios) de 0,02 a 1,3 oocistos por litro. Áreas protegidas da atividade antrópica continham níveis de 0,02 a 0,08 oocistos por litro, enquanto represas e lagos que receberam descarga de efluentes e águas provenientes de atividades agropecuárias continham concentrações de 0,91 a 0,58 oocistos/litro e rios de 0,94, 1,09 e 1,2 oocistos/litro (ROSE, 1990).

Em águas de consumo nos EUA e Reino Unido, a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* variou de 17 a 26,8% e de 7 a 37% com densidades de 0,005 a 0,017 oocistos/L e 0,006 a 1,36 oocistos/L respectivamente (SMITH & ROSE, 1998).

No Brasil, em estudo realizado em Fortaleza, a ocorrência de *Cryptosporidium* em água de poços utilizadas para consumo foi de 22,2% das 18 amostras analisadas (NEWMAN *et alii*, 1994). GAMBA *et alii* (1997) analisaram 8 amostras de água de poços (subterrânea) utilizadas para consumo no município de Itaquaquecetuba, São Paulo, observando ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em 100% das amostras. TOMPS (1998) em Perus, São Paulo, observou a presença de oocistos em 50% das 6 amostras analisadas de água para consumo. DIAS JUNIOR (1999) em Araras, observou ocorrência de *Cryptosporidium* em 58,4% das 12 amostras de água superficiais. RÉ (1999) em Araras, São Paulo, pesquisou a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em 5 amostras de água tratada e 7 amostras de água de poços. Oocistos de *Cryptosporidium* não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas, enquanto que cistos de *Giardia* foram somente detectados em 16,66% das amostras de água tratada.

2.4. SURTOS DE CRIPTOSPORIDIOSE DE VEICULAÇÃO HÍDRICA

Os surtos de veiculação hídrica tem sido geralmente associados ao consumo de água contaminada e ao contato com águas recreacionais contaminadas. Vários são os relatos de surtos associados com águas superficiais tratadas ou não, águas subterrâneas e contaminação de sistemas de distribuição e armazenamento de água (CRAUN *et alii*, 1998).

As informações referentes aos surtos de veiculação hídrica não apresentam a dimensão real do problema, visto que os surtos são incompletamente documentados, inadequadamente investigados e em alguns casos não são relatados ou podem, simplesmente não serem reconhecidos (CRAUN *et alii*, 1998).

Na literatura, os surtos de criptosporidiose de veiculação hídrica, melhores documentados, ocorreram nos Estados Unidos, Canadá e Reino Unido. Nos Estados Unidos, particularmente, o CDC (Center of Disease Control) e a US-EPA mantêm um programa de vigilância, o WBDOS (Waterborne Disease Outbreaks) em vigência desde 1971, onde a ocorrência e a possível causa de surtos de infecções de veiculação hídrica ocorridos nos EUA são relatados (LEVINE *et alii*, 1990; HERWALDT *et alii*, 1991; MOORE *et alii*, 1993; KRAMER e alii, 1996; LEVY *et alii*, 1998;). CRAUN *et alii* (1998) elaborou uma revisão dos surtos de criptosporidiose ocorridos nestes países no período de 1983 a 1996 e observou em 35 surtos documentados, 10 ocorrências em águas superficiais filtradas e 5 em águas não filtradas, 8 ocorrências foram associadas à águas subterrâneas contaminadas e 2 a contaminação dos sistemas de distribuição. Em dez dos surtos de criptosporidiose relacionados nesta revisão, as informações foram insuficientes para a determinação da causa.

A Tabela 1 resume os principais surtos de criptosporidiose relatados na literatura (CRAUN *et alii*, 1998; SMITH & ROSE, 1998; UPTON, 1999) no período de 1983 a 1998.

Tab. 1 - Resumo Dos Principais Surtos De Criptosporidiose, Associados Ao Consumo Ou Contato Com Águas Contaminadas, Relatados Na Literatura No Período De 1983 A 1998.

Ano	Local	Nº casos (estimado)	Tipo de água	Tipo de tratamento	Possível causa
1983	Cobham, UK	(16)	Superficial	Cloração	ND
1984	Braun Station, EUA	(2.006)	Subterrânea	Cloração	Contaminação por esgoto
1984	Bexar, EUA	(79)	Subterrânea	ND	Contaminação por esgoto
1986	Sheffield, UK	(537)	Superficial	ND	Chuvas intensas provocaram escoamento; contaminação fecal (gado)
1987	Carrolton, EUA	(12.960)	Superficial	Convencional	Falhas no sistema operacional de tratamento
1988	Ayshire, UK	27 (centenas)	Superficial	Convencional	Água do sistema de distribuição contaminada com fezes de gado
1988	Yorkshire, UK	(67)	Piscina	ND	Contaminação por esgoto
1988	Los Angeles, EUA	(44)	Piscina	ND	ND
					Continua

continuação

Ano	Local	Nº casos (estimado)	Tipo de água	Tipo de tratamento	Possível causa
1989	Swindon, UK	(516)	Superficial	Convencional	Água de lavagem dos filtros reciclada; contaminação fecal (gado)
1989	Loch Lomond, UK	(442)	Superficial	Microfiltração e cloração	ND
1989	Humberside, UK	(477)	Superficial	Filtração rápida e lenta	ND
1990	Ilha de Thanet, UK	(47)	Superficial	Convencional	Falhas no sistema operacional de tratamento; contaminação fecal (gado) por escoamento
1991	Londres, UK	(44)	Sistema de distribuição	ND	Falhas no sistema operacional
1991	Pennsylvania, EUA	(551)	Subterrânea	Cloração	Tratamento ineficiente; contaminação por água de superfície
1992	Torbay, UK	(108)	Subterrânea e superficial	Filtração	Falhas no sistema operacional; água subterrânea contaminada
1992	Jackson, EUA	(15.000)	Superficial	Cloração	Tratamento ineficiente
1992	Yorkshire, UK	(125)	Sistema de distribuição	Filtração	Contaminação dos reservatórios (afluentes); chuvas intensas
1992	Mersey, UK	(47)	Sistema de distribuição	ND	ND
1992	Warrington, UK	47 (1840)	Subterrânea	ND	Chuvas intensas; contaminação por esgoto; escoamento de excretas de animais.

Continuação

Ano	Local	Nº casos (estimado)	Tipo de água	Tipo de tratamento	Possível causa
1993	Milwaukee, EUA	(403.000)	Superficial	Convencional	Contaminação por esgoto/ resíduos de atividades agrícolas; falhas no sistema operacional
1993	Yakima, EUA	(7)	Subterrânea	ND	Contaminação por água de superfície; contaminação fecal (gado)
1993	Wessex, UK	(40)	Subterrânea	ND	Oocistos detectados no reservatório do sistema de distribuição, mas fonte é desconhecida
1993	CooK, EUA	(27)	Superficial	Filtração	Contaminação por refluxo de tanques sépticos de esgoto
1994	Clarck, EUA	(103)	Superficial	Filtração	Nenhuma falha operacional notada
1994	Missouri, EUA	(101)	Piscina	ND	ND
1994	Kanagawa, Japão	(461)	Sistema de distribuição	ND	Contaminação pós- tratamento: conexão cruzada seguida do mal- funcionamento da bomba de esgoto.
1994	Sydney, Austrália	(70)	Piscina	ND	ND
1994	Walla Walla, EUA	(134)	Subterrânea	Não tratada / cloração	Infiltração de esgoto tratado
1994	SW Thames, UK	(229)	Sistema de distribuição	ND	ND
1994	Trent area, UK	(33)	Sistema de distribuição	ND	ND

Continua

Continuação

Ano	Local	Nº casos (estimado)	Tipo de água	Tipo de tratamento	Possível causa
1995	Alachua, EUA	(72)	Sistema de distribuição	ND	Inadequado sistema de prevenção de contra-fluxo do lixo, contaminando água da rede de um camping
1995	Devon (Torbay), UK	(575)	Superfície	ND	Alta concentração de oocistos em esgoto descarregada no rio – oocistos detectados na água tratada e não tratada
1995	Itália	(294)	Sistema distribuição	ND	Falhas no sistema operacional de tratamento
1996	Ft.Lauderdale, EUA	(22)	Piscina	ND	ND
1996	Clovis, EUA	(500)	Água do parque	ND	ND
1996	Eagle Harbor, EUA	(16)	Água de consumo	ND	ND
1996	Kelowna, BC	100 (4.000)	Superfície	ND	Contaminação fecal (gado) da água não filtrada
1996	Cranbrook, BC	29 (2.000)	Superfície	ND	Contaminação fecal (gado) da água não filtrada
1996	Ogose, Japão	(8.705)	Sistema distribuição	ND	Oocistos detectados na água tratada e não tratada
1996	Inglaterra	(226)	Sistema distribuição	ND	ND

Continua

Ano	Local	Nº casos (estimado)	Tipo de água	Tipo de tratamento	Possível causa
1996	Collingwood, Ontario	39 (150)	Superficial / Sistema distribuição	ND	Água superficial não filtrada com turbidez >1,0 unt; coliformes não detectados na água após desinfecção
1997	Shoal Lake, Ontario	(100)	Sistema de distribuição	ND	ND
1997	Inglaterra	(366)	Superficial	ND	ND
1997	Austrália	(1.200)	Piscinas	ND	ND
1997	Nova Zelandia	(300)	Piscinas	ND	ND
1998	Brushy Creek, EUA	(32)	Subterrânea	ND	Contaminação por esgoto
1998	Sellwood, Oregon	(51)	Piscina	ND	ND

ND – não determinado

2.5. MÉTODOS PARA ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

O reconhecimento da criptosporidiose como uma doença potencialmente de veiculação hídrica e os diversos surtos de infecções causadas por *Cryptosporidium* associados ao consumo ou contato com água contaminada gerou grande interesse em pesquisar a prevalência do *Cryptosporidium* em amostras de água (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

Atualmente existem diferentes métodos propostos mas ainda não utilizados como padrão para pesquisa de oocistos na água. Pesquisadores de diversos países vêm reunindo esforços com objetivo de desenvolver metodologias mais sensíveis, simples, econômicas, rápidas e específicas para detecção de *Cryptosporidium* em amostras de água (JAKUBOWSKI *et alii*, 1996).

Como os oocistos de *Cryptosporidium* são frequentemente encontrados no ambiente em baixas concentrações, as metodologias desenvolvidas para detecção de oocistos envolvem usualmente a concentração da amostra a partir de um grande volume de água que varia dependendo da qualidade e tipo da mesma. O procedimento mais comum para a concentração de oocistos tem sido a filtração da amostra através de filtros de polipropileno. Estes têm sido utilizados com maior frequência por poder ser aplicados para diversos tipos de água que variam quanto às características físico-químicas, além de serem econômicos (JAKUBOWSKI *et alii*, 1996).

Outros tipos de filtros também têm sido utilizados e avaliados para a concentração de oocistos, entre esses, os cartuchos de fibra de vidro e resina ou nylon e as membranas filtrantes de diferentes porosidades e constituição (LeCHEVALLIER *et alii*, 1995). As membranas filtrantes, particularmente, têm demonstrado maior eficiência de recuperação de oocistos, facilidade e segurança na manipulação das amostras (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

Na metodologia desenvolvida por ALDOM & CHAGLA (1995) a membrana de acetato celulose, após a filtração das amostras de água é totalmente dissolvida em acetona, eliminando, desta forma, os processos dispendiosos para a eluição dos microrganismos dos filtros e também, aumentando significativamente a recuperação de oocistos (70,5%).

Os filtros são frequentemente eluidos com soluções detergentes e para a concentração de partículas efetua-se a centrifugação da amostra que também varia quanto a intensidade de rotação ($\times g$) e tempo. As amostras com turbidez elevada são geralmente submetidas a um procedimento de purificação, usualmente através de gradiente de densidade de Percoll-sucrose ou soluções de sais (JAKUBOWSKI *et alii*, 1996).

Para análise das amostras, a técnica da imunofluorescência tem sido a mais utilizada. Esta consiste na marcação do material com anticorpo fluorescente e exame através de microscopia de epifluorescência. A identificação do *Cryptosporidium* é baseada na reação fluorescente, tamanho e forma dos oocistos. A confirmação da presença destes envolve

técnicas de microscopia de contraste de fase ou contraste de interferência (DIC) (JAKUBOWSKI *et alii*, 1996) através das quais é usualmente possível observar a morfologia da parede e estruturas internas do oocisto, como a presença de esporozoítos, o que, para alguns autores, pode ser considerado como indicativo da viabilidade dos oocistos (LeCHEVALLIER, 1991a).

Métodos conceituados para isolamento e identificação de oocistos em água como o método proposto pela ASMT (American Society for Testing and Materials), ICR (Information Collection Rule) (ALTHERHOLD & KORN, 1999) e o método recomendado pelo Reino Unido consideram os mesmos princípios e, portanto, consistem na filtração de um grande volume de água através de um filtro de polipropileno ou polycarbonato (1µm de porosidade), eluição dos microrganismos do filtro usando solução detergente, concentração por centrifugação, clarificação usando gradiente de densidade Percoll-sucrose, e exame das amostras por IF e microscopia de contraste de fase (FEDERAL REGISTER, 1993; LeCHEVALLIER, 1995; BUTLER & MAYFIELD, 1996).

Entretanto, devido a maior eficiência de recuperação de oocistos, a membrana filtrante tem sido, atualmente, um dos métodos mais utilizados para a concentração de amostras. No protocolo 1622 elaborado pela EPA, em 1997, para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água (EPA, 1997), a membrana filtrante é indicada como método alternativo para a concentração de oocistos. Do mesmo modo, para a purificação das amostras ambientais é recomendado a IMS (separação imunomagnética) e a citometria de fluxo.

Apesar de algumas limitações, como a incapacidade em determinar a viabilidade e infectividade dos oocistos e a inespecificidade em distinguir espécies, os métodos acima referidos têm sido usados com frequência para detecção de *Cryptosporidium* em muitos estudos ambientais e têm sido úteis em investigações de surtos (pesquisas epidemiológicas) para caracterizar as fontes de contaminação e a eficiência dos processos de tratamento de água na remoção dos organismos (JAKUBOWSKI *et alii*, 1996).

Progressos obtidos na otimização das metodologias propostas para pesquisa de oocistos em amostras de água estão frequentemente sendo descritos na literatura. LeCHEVALLIER *et alii* (1995) estudaram e otimizaram cada etapa da metodologia proposta pela ASTM para detecção de oocistos em água. Os autores recomendaram a substituição do filtro de polipropileno por filtros de algodão, além do aumento do número de lavagens das fibras do filtro para maximizar a recuperação de oocistos.

Existem técnicas alternativas para a concentração das amostras de água como a precipitação do carbonato de cálcio, onde um volume menor de água (10 L) é tratado com solução de cloreto de cálcio e bicarbonato de sódio. Os cristais formados depositam-se no fundo juntamente com os oocistos, o sobrenadante é descartado e o precipitado de carbonato de cálcio dissolvido em ácido sulfâmico (VESEY *et alii*, 1993a). Este método tem sido considerado por alguns autores como mais simples, eficiente e econômico (SHEPHERD *et alii*, 1996). Porém, é incerta a manutenção da viabilidade dos oocistos durante o processo (CAMPBELL *et alii*, 1994).

A inclusão da citometria de fluxo (VESEY *et alii*, 1993b e 1994) e a IMS (STINEAR *et alii*, 1996; DENG *et alii*, 1997) nas recentes metodologias tem reduzido o tempo requerido para processamento e análise das amostras de água, visto que são capazes de minimizar as interferências de partículas presentes no meio que poderiam se ligar de maneira inespecífica ao anticorpo, dificultando a análise por IF (JAKUBOWSKI *et alii*, 1996).

Métodos genéticos baseados na detecção de ácido nucléico de *Cryptosporidium*, como a técnica de PCR, têm sido desenvolvidos para amostras ambientais (LAXER *et alii*, 1991; JOHNSON *et alii*, 1993; BEJ & MAHBUBANI, 1994; MAYER & PALMER, 1996) a fim de melhorar a efetividade na detecção de oocistos e otimizar o processo, tornando-o mais rápido e sensível (JAKUBOWSKI *et alii*, 1996; JOHNSON *et alii*, 1995).

As vantagens do PCR incluem uma maior sensibilidade, podendo detectar a presença de um único oocisto (STINEAR *et alii*, 1996), a análise rápida de várias amostras e o custo relativamente baixo, além do potencial em determinar a viabilidade dos oocistos detectados. Porém, as amostras

ambientais geralmente contêm substâncias, como ácido húmico, que podem inibir as reações de PCR (JAKUBOWSKI *et alii*, 1996).

Em uma comparação de PCR com a IF para detecção de *Cryptosporidium* concluiu-se que o PCR poderia ser útil em rotinas de monitoramento em águas industriais, particularmente com amostras de águas tratadas (JOHNSON *et alii*, 1993). Entretanto, os mesmos autores relataram mais recentemente que o PCR foi tão sensível quanto a IF para detecção de *Cryptosporidium* em amostras concentradas de águas de esgoto (JOHNSON *et alii*, 1995).

A utilização de primers específicos (ROCHELLE *et alii*, 1997a), de endonucleases de restrição (AWAD-EL-KARIEM, 1994) e a hibridização com sondas de oligonucleotídeos marcados por quimioluminescência (JOHNSON, 1995) são técnicas empregadas atualmente que permitem a identificação de espécie-específicas. A hibridização *in situ* (FISH) que consiste no RNA (ss rRNA) marcado com fluorescência tem sido combinada com a microscopia confocal a laser para identificar e diferenciar oocistos de *C. parvum* de outros oocistos de *Cryptosporidium* ssp., de origem animal, em amostras de água (JAKUBOWSKI *et alii*, 1996).

A viabilidade e infectividade dos oocistos (JAKUBOWSKI *et alii*, 1996) têm sido estudadas através de testes de infectividade em modelos animais (FAYER *et alii*, 1996; KWA *et alii*, 1993), excitação *in vitro* (FAYER *et alii*, 1984; ROBERTSON *et alii*, 1992) ou através da incorporação de corante flurogênico vital (CAMPBELL, 1992).

As técnicas de excitação *in vitro* simulam as condições epigástricas sobre as quais os esporozoítos infectivos emergem dos oocistos. As vantagens da excitação incluem as facilidades do uso e baixo custo, e as desvantagens incluem a necessidade de concentrar e purificar amostras, longos períodos de incubação e variabilidade experimental observada entre linhagens de oocistos sujeitos as diferentes condições de estresse ambiental, além do alto número de oocistos necessários para conduzir o ensaio (JAKUBOWSKI *et alii*, 1996).

Apesar de uma grande variedade de estudos mais sofisticados estarem sendo realizados e testados para pesquisa de oocistos em água, entre estes: citometria de fluxo, sondas genéticas, PCR, eletrorotação, ELISA, culturas celulares, biossensores de fibra óptica e eletroquimioluminescência, nenhuma dessas técnicas tem sido suficientemente desenvolvida ou avaliada para substituir a técnica de IF (FAYER, 1997; JAKUBOWSKI *et alii*, 1996).

2.6. A ÁGUA EM TRATAMENTO

As estações de tratamento de água operadas pela SABESP constituem unidades do tipo clássico, compreendendo os seguintes processos de tratamento (Fig. 2A-F) (SABESP³; PARLATORE NETTO, 1987):

A água é geralmente captada de reservatórios e bombeada para as ETAs. Na entrada das estações a velocidade da água bombeada é reduzida nas lagoas de tranquilização ou estabilização.

- Coagulação

Na água bruta, além de partículas sedimentáveis, existem impurezas que se encontram em suspensão fina, estado coloidal ou suspensão. A coagulação se refere às mudanças físico-químicas produzidas pela dispersão, na água, de um coagulante solúvel, que se hidrolisa em partículas carregadas positivamente anulando as cargas negativas dos colóides, formando com estes, os coágulos, que são partículas maiores que podem ser mais facilmente removidas por sedimentação e/ou filtração. O coagulante mais comumente utilizado é o sulfato de alumínio ou sulfato férrico, que é adicionado na entrada da água bruta na estação. A reação química do coagulante na água ocorre em poucos segundos e é essa razão pela qual é necessária uma mistura intensa (mistura rápida) no ponto de aplicação do coagulante, a fim de que se dê uma exposição das partículas finas em

³ Boletim informativo SABESP – Estação de Tratamento de Água – ETA GUARAÚ.

suspensão na água ao agente coagulante, antes que a reação da coagulação se complete.

- **Floculação**

Um dos objetivos mais comuns da floculação (mistura lenta) é a remoção de cor e turbidez presentes na água de abastecimento, assim como a remoção de microrganismos e substâncias indesejadas. Geralmente, os materiais que causam a turbidez são de natureza inorgânica (argila) e os que constituem cor são de natureza orgânica (ácidos húmicos).

Após a coagulação, as partículas coloidais estão prontas para serem agrupadas pela força mecânica dos floculadores. Os floculadores mantêm a água em movimento de turbulência relativamente suave. Conforme a água passa pelos floculadores, as partículas de impurezas colidem com as partículas sólidas suspensas e, aderindo umas às outras, aumentam de tamanho e densidade.

A agitação lenta da floculação é limitada para evitar o rompimento de flocos adensados já formados. A coagulação e floculação são muito influenciadas por forças químicas como cargas elétricas das partículas, capacidade de troca, concentração e tamanho de partículas, pH, temperatura e concentração de eletrólitos. Em decorrência desses fatores, tais processos podem variar dependendo da qualidade de água do manancial que, usualmente requer estudos físico-químicos e biológicos pré-tratamento.

- **Decantação**

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

- Filtração

É o processo que permite a remoção das frações de partículas de impurezas e partículas sólidas suspensas na água que não foram removidas no decantador.

Os filtros são constituídos por leitos filtrantes e camada suporte. O leito filtrante é composto, geralmente de carvão antracito e areia. A camada suporte é formada por pedregulhos em camadas de diferentes granulometrias. A água passa por gravidade pelo leito filtrante e é recolhida num canal geral de água filtrada.

A lavagem contra corrente dos filtros usada para remover as partículas retidas no leito filtrante é determinada pelos valores de perda de carga e turbidez da água filtrada. A água utilizada na lavagem dos filtros é reaproveitada, retornando ao início do processo.

Após a filtração, a água passa por uma unidade de mistura rápida, onde são adicionados cal, cloro e flúor.

- Desinfecção

Consiste na destruição de microrganismos patogênicos e de outros compostos indesejáveis.

A ação desinfetante é uma ação de superfície, portanto, deve-se favorecer o encontro entre o desinfetante e o agente que se pretende destruir. Isto só será feito através de uma boa mistura, isto porque, uma mistura imperfeita permite a formação de cloraminas menos ativas do que o cloro livre. Sendo assim, o tempo de contato e o grau de mistura do desinfetante com a água a ser desinfetada são fatores dos quais depende a eficiência da desinfecção.

Com a finalidade de modificar a característica química da água o cloro é aplicado como um agente oxidante, na remoção de amônia e seus compostos, compostos orgânicos e inorgânicos oxidáveis. Portanto, em determinadas águas, parte do cloro é consumida na ação oxidante e parte na ação desinfetante.

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

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

- Correção de pH

O alcalinizante utilizado nas estações é a cal. Assim como o cloro, a cal pode ser aplicada em três pontos do processo de tratamento: a pré-alcalinização é feita na água bruta, a inter-alcalinização na água decantada e a pós-alcalinização na água filtrada.

Cada etapa de alcalinização tem sua função no processo. A pré-alcalinização ajusta o pH ideal de alcalinização; a inter-alcalinização auxilia o ajuste do pH final e facilita a remoção de compostos indesejáveis; a pós-alcalinização ajusta o pH da água final para diminuir o ataque da acidez da água nas tubulações do sistema adutor e redes de distribuição, evitando a corrosão.

Outros produtos químicos podem ser utilizados como auxiliares no tratamento de água. O polieletrólito pode ser aplicado na água coagulada com a finalidade de acelerar a floculação, decantação e filtração.

O carvão ativado pode ser utilizado para remover presença de sabor e odor na água, devido à poluição e à proliferação de algas na água bruta.

- Análises laboratoriais

Para garantir a qualidade da água, esta passa por um processo de análises contínuas durante todo o seu percurso. Para tal, as ETAs possuem laboratórios que controlam a cor, alcalinidade, turbidez, o cloro residual da água de abastecimento, assim como outros parâmetros físico-químicos como temperatura e presença de metais pesados, além de exames bacteriológicos (coliformes totais e fecais), e pesquisas hidrobiológicas.

Fig. 2A. – Entrada de água bruta na ETA e aplicação do coagulante

Fig.2B – Lagoa de tranquilização

Fig. 2C. - Decantador

Fig. 2D – Decantador; tomada superficial de água decantada.

Fig. 2E - Filtros

Fig. 2F – Lavagem dos filtros

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DE ESTUDO

Na região metropolitana de São Paulo (RMSP) 17 milhões de pessoas recebem água tratada através do sistema integrado de tratamento operado pela SABESP (Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo) composto por oito sub-sistemas (Estações de Tratamento de Água - ETAs) produtores de água potável (Fig.3 e 4). O maior deles, o Cantareira - responsável, em sua capacidade máxima na ETA Guaraú, pela produção de 33 mil litros/segundo - é formado pela reversão de parte das bacias dos rios Jaguari, Jacareí, Cachoeira e Atibainha, formadores do rio Piracicaba, além do rio Juqueri, da Bacia do Alto Tietê. No extremo oposto, ao sul, nos limites da Serra do Mar, está o segundo maior sistema produtor da SABESP, o Guarapiranga, com capacidade de 9,6 mil litros/segundo, regularizados pelo próprio Guarapiranga, acrescidos de 700 litros/segundo provenientes da reversão das cabeceiras do rio Capivari, da vertente Atlântica. Nesta mesma área está o sistema Rio Grande, atualmente produzindo 4,2 mil litros por segundo. À leste encontram-se as nascentes que compõem o Sistema Alto Tietê. Em fase de expansão, o Alto Tietê conta atualmente com vazão disponibilizada pelos reservatórios Jundiá e Taiaçupeba, que é de 3,6 mil litros /segundo, produzindo a vazão média anual de 5,2 mil litros por segundo. Na área de abrangência do Sistema Produtor Alto Tietê está o Sistema Rio Claro, que produz 3 mil litros por segundo e a oeste, está o Sistema Produtor Cotia, dividido em Alto e Baixo Cotia. O Alto Cotia produz 900 litros por segundo e o Baixo Cotia produz 600 litros por segundo provenientes da represa Isolina Inferior (Rio Cotia) que abastece as cidades de Barueri, Jandira e Itapevi (SABESP, 1999).

As ETAs diferem quanto a capacidade de produção de água e também quanto a qualidade da água bruta provenientes de seus respectivos afluentes (mananciais). A diferença na capacidade de produção de água é gerada pela

demanda de cada região abastecida, exigindo estruturas físicas capazes de comportar a vazão requerida. Estas estruturas envolvem entre outros, o número de adutoras, número de filtros, capacidade dos decantadores e reservatórios, quantidade e diversidade dos produtos químicos a serem utilizados durante o tratamento.

Fig. 3. - Mapa da área de estudo e localização das Estações de Tratamento de Água (ETAs).

Fig.4. Área de estudo – RMSP

3.2. PONTOS DE AMOSTRAGEM

Duas Estações de Tratamento de Água (ETA)² foram selecionadas para a realização das coletas das amostras de água, a ETA-A (Fig. 5A) e a ETA-B (Fig. 5B) as quais são responsáveis por aproximadamente 30% da água que abastece a região metropolitana de São Paulo. A seleção das ETAs foi baseada na capacidade de produção de água para um estudo significativo da RMSP e, também, baseada na qualidade da água de seus afluentes.

As ETAs em estudo são abastecidas por diferentes mananciais e diferem, também quanto a demanda de água requerida pelas regiões que abastecem, conseqüentemente diferindo na capacidade de produção, sendo esta maior na ETA-A. Os dados técnicos de cada estação que ilustram essas diferenças estão apresentados na Tabela 2.

Tab. 2 – Dados técnicos das Estações de Tratamento de Água.

Dados Técnicos	ETA - A	ETA - B
Nº de Floculadores	8	6
Nº de Decantadores	8	2
Nº de Filtros	32	6
Composição do leito filtrante	Areia e antracito	4 filtros: areia e antracito 2 filtros: areia
Nº de reservatório e capacidade	1 / 45.000 m ³	Não possui
Nº canal de água bruta	1	1
Nº canal de água tratada	1	1
Vazão de entrada	10,5 m ³ /s	1,023 m ³ /s
Vazão de saída	10,0 m ³ /s	0,997 m ³ /s
Consumo diário de cloro	2758 Kg	3,8 toneladas
Dosagem de cloro	4,2 mg/L	31,2 mg/L
Consumo diário de cal	8,0 toneladas	7000 Kg
Dosagem de cal	8,8 mg/L	79,2 mg/L
Consumo diário de Sulfato de alumínio	13,8 toneladas	2423 Kg
Dosagem de sulfato de alumínio	15,2 mg/L	13,2 mg/L
Capacidade de cada decantador	12.550 m ³	3.330 m ³
Volume gasto na lavagem de um filtro	1.200 m ³	150 m ³

² Os nomes das respectivas ETAs selecionadas neste estudo não serão divulgados conforme acordo prévio com a SABESP.

Fig.5A. Esquema da Estação de Tratamento –ETA-A

Fig.5B – Esquema da Estação de Tratamento de Água – ETA-B

IF – imunofluorescência direta; IMS – separação imunomagnética

— procedimentos efetuados

--- procedimentos efetuados ocasionalmente

Fig. 6. Fluxograma da metodologia empregada para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e indicadores bacteriológicos em amostras de água.

3.3. AMOSTRAS

Dois tipos de água foram coletados, amostras de água superficial (bruta) provenientes dos mananciais que alimentam as ETAs, A e B, e amostras de água tratada produzidas pelas respectivas ETAs que abastecem os sistemas de distribuição para abastecimento público.

3.3.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Foram realizadas doze coletas, com intervalo mensal, de cada tipo de água nas respectivas ETAs em estudo, no período de um ano.

As coletas de água bruta foram realizadas na captação das ETAs, através de uma bomba a motor, antes da pré-cloração da água em tratamento (Fig. 7A; 7B).

As coletas da água tratada foram feitas diretamente em torneiras dos laboratórios internos de controle das ETAs, A e B, e estão ilustradas nas Fig. 8A e 8B respectivamente.

3.3.1.1. Para a determinação de coliformes totais e *E. coli*

As coletas para determinação de coliformes totais e *E.coli* foram realizadas de acordo com "Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater" 19th ed. (APHA, 1995) e o Guia de orientação e preservação de amostras de água (CETESB, 1988).

Foram coletados 100 mL de água, em cada ponto de amostragem, em frascos de polipropileno esterilizados que foram mantidos sob refrigeração durante o transporte para o Laboratório de Microbiologia Ambiental.

Para a neutralização do cloro das amostras de água tratada, a estas foi adicionado tiosulfato de sódio $1,8 \times 10^{-3} \%$.

Fig. 7A. Captação de água da ETA-A – ponto de coleta de água bruta.

Fig. 7B. – Captação de água da ETA-B – ponto de coleta de água bruta

Fig.8A. Coleta de água tratada no laboratório de controle interno da ETA-A.

Fig.8B. Coleta de água tratada no laboratório de controle interno da ETA-B.

3.3.1.2. Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*

Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* utilizando a técnica de precipitação do carbonato de cálcio para a concentração da amostra, foram coletados 20 litros de água em cada tipo de água, em frascos de vidro com tampa de rosca com capacidade para 10 litros, previamente esterilizados (Fig. 9).

Para a pesquisa de oocistos através da concentração da amostra pela técnica da membrana filtrante, os volumes filtrados dependeram da turbidez da água bruta e da vazão de água tratada disponível para a coleta (Tab. 3).

Tab. 3 – Volumes (Litros) Filtrados das Amostras de Água Bruta e Tratada nas Etas, A e B, Utilizando-se a Técnica da Membrana Filtrante Para a Concentração das Amostras.

Coleta		Volume Filtrado (L)			
Nº	Data	ETA-A		ETA-B	
		Bruta	Tratada	Bruta	Tratada
1	Jul/98	76	1000	114	433
2	Ago/98	76	860	76	1000
3	Out/98	57	700	57	860
4	Nov/98	38	76	57	290
5	Dez/98	42	700	76*	200
6	Jan/99	46	1000	38	760
7	Fev/99	76	1000	8	783
8	Mar/99	42	850	38	900
9	Abr/99	76	734	19	589
10	Mai/99	38	1000	41	1000
11	Jun/99	19	836	23	1000
12	Jul/99	30	700	30	303

* Utilização de pré-filtro durante a coleta

3.4. PESQUISA DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* NAS AMOSTRAS DE ÁGUA.

3.4.1. CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

A concentração das amostras foi realizada através de dois métodos, "técnica da dissolução da membrana filtrante" (ALDOM & CHAGLA, 1995) e "precipitação do carbonato de cálcio" (VESEY *et alii*, 1993a).

3.4.1.1. Técnica da precipitação do carbonato de cálcio

Foram adicionados a cada 20 litros de amostra 200 mL de cloreto de cálcio 1M e 200 mL de bicarbonato de sódio 1M. O pH foi ajustado entre 9.9 e 10.1 com hidróxido de sódio 5M e mantido em repouso por 4 h em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado, com cuidado, através de um sistema de sucção a vácuo para não ressuspender as partículas sedimentadas. O precipitado foi dissolvido em 400 mL de ácido sulfâmico 10 % e o frasco foi lavado com solução Tween 80 a 0,01 %. O volume final foi transferido para um tubo de centrífuga de 250 mL. Após a centrifugação a 3000 x g por 10 minutos a 10° C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi transferido para tubos de centrífuga de 50 mL, lavando-se sempre o tubo anterior com Tween 80 a 0,01%. As amostras foram centrifugadas novamente a 3000 x g por 10 minutos a 10° C, o sobrenadante descartado e o precipitado foi ressuspensionado em solução eluente (Tween 80 1%, SDS 1% ,PBS 10X). Centrifugou-se novamente, e o sedimento foi ressuspensionado em aproximadamente 10 mL de solução eluente, dependendo da densidade da amostra. Posteriormente, 10 µL da amostra foi transferido para lâmina para a realização da imunofluorescência direta (IF). O restante da amostra, após a realização da IF, foi mantido em tampão formalina 10% a 4° C.

3.4.1.2. Técnica da dissolução da membrana filtrante

A filtração da amostra foi realizada em campo, utilizando-se um suporte de membrana de aço inoxidável (Fig. 10A), mangueiras e conexões previamente esterilizadas, ligadas a um hidrômetro. A vazão para a coleta foi controlada, quando possível, em aproximadamente 4 L/m. A amostra foi filtrada através de uma membrana de acetato de celulose de 293 mm de diâmetro e 1,2 μ m de porosidade (Fig. 10B). Após a filtração, a membrana foi transferida para um saco de polipropileno estéril e mantida sob refrigeração durante o transporte até o Laboratório de Microbiologia Ambiental - ICB/USP.

Foi adicionado à membrana 200 mL de acetona (Merck), homogeneizou-se por 15 minutos com auxílio de um homogeneizador ("stomacher") e adicionou-se, então mais 200 mL de acetona, homogeneizando por mais 15 minutos. Transferiu-se o volume total para tubos de centrífuga de 250 mL. As amostras foram centrifugadas a 650 x g durante 15 minutos a 10° C. Aspirou-se o sobrenadante através de um sistema de sucção a vácuo descartando-o e ao sedimento foi adicionado 200 mL de etanol 95% (Merck), homogeneizou-se e centrifugou-se a 650 x g por 15 minutos a 10° C. Descartou-se o sobrenadante do mesmo modo descrito anteriormente e o sedimento foi ressuspenso em 200 mL de etanol 70% (Merck). O volume total foi transferido para um único tubo de centrífuga. Centrifugou-se novamente sob as mesmas condições, descartando o sobrenadante e adicionando-se ao precipitado 200 mL de solução eluente. Transferiu-se o volume para tubos de centrífuga cônicos de 50 mL. E após nova centrifugação obedecendo aos padrões anteriores, verteu-se o sobrenadante, concentrando o volume em um único tubo após a lavagem dos mesmos com solução eluente. Centrifugou-se a 650 x g por 15 minutos, descartando o sobrenadante e reservando um volume final de aproximadamente 10 mL, dependendo da densidade da amostra. Posteriormente, 10 μ L da amostra foi transferido para lâmina para a realização da IF. O restante da amostra, após a realização da IF, foi mantido em tampão formalina 10% a 4° C.

Fig. 09 – Frasco de coleta utilizado para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* empregando a precipitação do CaCO_3 para concentração das amostras.

Fig. 10B Membrana de acetato celulose (293mm / 1,2 μm) após filtração de amostra de água bruta

Fig. 10A Coleta e concentração de Água Bruta através da técnica da membrana filtrante.

3.4.2. PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

A purificação das amostras foi realizada nas duas primeiras coletas (1A e 1B) através de IMS (separação imunomagnética). As amostras de água bruta das coletas subsequentes, quando necessário, foram purificadas por Flotação em gradiente de densidade Percoll-sucrose, conforme procedimento descrito a seguir.

3.4.2.1. Separação imunomagnética (IMS)

Após a concentração e processamento das amostras foi realizada a purificação das mesmas, através da separação imunomagnética (IMS) segundo protocolo do fabricante (Dynabeads anti-*Cryptosporidium* – Dynal, Oslo, Norway).

O processo foi realizado em três etapas, a captura de oocistos e separação imunomagnética (IMS), a dissociação do complexo formado dynabeads/oocistos e a detecção por imunofluorescência direta (IF).

Captura de oocistos e IMS

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

Dissociação do complexo bead/oocisto

Removeu-se o tubo "eppendorf" do MPC e adicionou-se 50 µL de HCl 0,1 N, em seguida agitou-se e transferiu-se novamente o tubo para o MPC. O sobrenadante contendo os oocistos foi transferido para uma lâmina contendo de 5µL de NaOH 1N. Fixou-se a amostra com 50µL de metanol para posterior análise por imunofluorescência .

3.4.2.2. Flotação em gradiente de Percoll-Sucrose

A purificação das amostras por flotação foi realizada de acordo com "Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater" 19th ed. (APHA, 1995), quando o exame microscópico das mesmas apresentava-se comprometido devido a grande quantidade de partículas em suspensão.

Em um tubo cônico de centrifuga de 50 mL foi misturado 1 mL da amostra, previamente concentrado, com solução eluente para um volume final de 20 mL.

Cuidadosamente sobre esses 20 mL adicionou-se 30 mL de solução de flotação Percoll-sucrose. Centrifugou-se a 1050 x *g* por 10 minutos, usando uma centrifuga pendular e acelerando-se lentamente até atingir a velocidade com os tubos na horizontal e desacelerando-se da mesma forma.

Utilizou-se uma pipeta Pasteur lavada com solução eluente para aspirar 20 mL da camada de água superior e mais 5 mL do meio de flotação e transferiu-se essa suspensão para outro tubo de centrifuga. Centrifugou-se a 1050 x *g* por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em solução eluente e 10µL da amostra foram usados para IF e o restante foi mantido em tampão formalina 10% a 4° C.

3.4.3. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OOCISTOS

3.4.3.1. Detecção de oocistos pela técnica de Imunofluorescência Direta (IF) e Confirmação por Microscopia de contraste de fase

Após a concentração e purificação das amostras, as mesmas foram analisadas pela técnica de Imunofluorescência Direta (segundo protocolo do fabricante – Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunofluorescent Detection).

Antes da utilização, o Kit com os reagentes para a IF foi mantido à temperatura ambiente, as lâminas foram devidamente identificadas com data, número, tipo e procedência da amostra.

Foram aplicados 10 µL da amostra previamente concentrada, assim como 10µL do controle positivo e controle negativo nos respectivos poços das lâminas. Estes volumes foram distribuídos uniformemente com auxílio de alças descartáveis. Após a secagem das amostras à temperatura ambiente, estas foram fixadas com 5 µL de metanol e adicionou-se uma gota do reagente de detecção contendo anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* marcados com FITC (Fluorescein isothiocyanate) e uma gota de reagente contra-corante (solução negro de ericromo) à cada amostra.

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

Por fim, adicionou-se 1 gota de meio de montagem (solução tampão contendo glicerol, formalina e antiquescente) em cada poço da lâmina e cobriu-se com lamínula, vedando com esmalte.

As amostras foram analisadas em um microscópio DAS Leica DM/ LB® sob aumento de 200x, 400x e 1000x para pesquisar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* através da técnica de IF, confirmando-se a presença dos mesmos por microscopia de contraste de fase.

3.4.3.2. Quantificação de oocistos nas amostras de água

A contagem de oocistos de *Cryptosporidium* detectados por litro de amostra de água foi efetuada da seguinte forma (MADORE *et alii*, 1987):

A partir de 10 µL da amostra previamente concentrada, foi efetuada a leitura da lâmina como proposto pela EPA (1997). Foram montadas 5 lâminas de cada amostra de água tratada e 3 lâminas de cada amostra de água bruta para obter-se uma média do número de oocistos detectados em 10 µL da amostra. A partir desta média calculou-se o número de oocistos estimado no volume total da amostra previamente concentrada, ou seja no volume total de água analisado:

Média do nº de oocistos detectados por lâmina ----- 10 µL da amostra
 X ----- volume da amostra concentrada

$$X = \text{número de oocistos de } \textit{Cryptosporidium} / \text{volume da amostra}$$

E, por fim, a partir do número de oocistos detectados no volume total de água pesquisado por precipitação química (20 litros) ou por filtração (Tab. 3) obtemos o número de oocistos detectados por litro de amostra de água dividindo-se o número de oocistos detectados pelo volume de água analisado:

X ----- volume da amostra de água analisado
 Y ----- 1 litro de água

$$Y = \text{número de oocistos de } \textit{Cryptosporidium} / \text{litro de água}$$

3.4.4. CONTROLE NEGATIVO DAS METODOLOGIAS UTILIZADAS

Como controle negativo dos equipamentos, materiais, reagentes e das metodologias utilizadas para a concentração das amostras de água, os mesmos procedimentos descritos nos itens 3.4.1.1. e 3.4.1.2. foram realizados a partir de 5 L e 2 L de água destilada respectivamente.

3.4.5. ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DAS METODOLOGIAS EMPREGADAS

A sensibilidade das metodologias utilizadas para a concentração das amostras e detecção de oocistos foram avaliadas através da inoculação de oocistos purificados (procedentes do Kit Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunodluorescent Detection) em diferentes concentrações: 10^4 , 10^3 e 10^2 em 1 litro de água destilada e 1 litro de água bruta, e os mesmos procedimentos descritos nos itens 3.4.1.1. e 3.4.1.2. foram realizados.

3.5. DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *E. COLI*

Para a determinação de coliformes totais e *E. coli* utilizou-se a técnica dos tubos múltiplos para água bruta e o teste de Presença-Ausência para água tratada, empregando substrato fluorogênico e cromogênico (Colilert 18, Iddex), segundo "Standard Methods For The Examination Of Water and Wastewater" 19th Ed. (1995).

3.6. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Análises físico-químicas da água bruta e da água tratada coletadas foram realizadas e fornecidas por técnicos das respectivas ETAs. Os parâmetros considerados neste estudo envolvem, pH, turbidez, cor, cloro e alcalinidade. A análise destes é realizada regularmente por técnicos das ETAs, segundo "Standard Methods For The Examination Of Water and Wastewater" 19th Ed. (1995).

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos na detecção de oocistos, na análise dos indicadores microbiológicos e parâmetros químicos foram submetidos à análise estatística para melhor interpretação dos resultados.

Para a avaliação da eficiência de recuperação de oocistos utilizando as duas metodologias de concentração das amostras de água, precipitação do carbonato de cálcio e técnica da membrana filtrante, efetuou-se o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando o primeiro não se aplicou.

A avaliação da eficiência do tratamento na remoção de oocistos em cada ETA foi realizada através do citado teste, este comparou a proporção de *Cryptosporidium* spp. na água bruta e na água tratada das estações. Do mesmo modo, as amostras de água bruta e tratada das duas ETAs foram comparadas quanto a qualidade das mesmas frente a ocorrência de oocistos.

Para analisar uma possível relação entre os parâmetros físico-químicos observados e a ocorrência de oocistos, assim como para relacionar indicadores microbiológicos e a presença e/ou ausência de oocistos de *Cryptosporidium* usamos o coeficiente de Correlação de Pearson (r) calculado sobre cada par de parâmetros de interesse.

4. RESULTADOS

4.1. PESQUISA DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* EM ÁGUA

Os resultados obtidos nas análises das 12 amostras de água bruta e 12 amostras de água tratada coletadas mensalmente durante o período de um ano nas Estações de Tratamento de Água, A e B, estão representados nas tabelas 4A e 4B respectivamente.

Tab. 4A – Resultados Obtidos na Pesquisa de Indicadores Bacteriológicos e Oocistos de *Cryptosporidium* na ETA – A, Empregando a Técnica da Membrana Filtrante e a Precipitação do Carbonato de Cálcio para a Concentração das Amostras de Água Bruta e Tratada.

Nº da coleta	Data das coletas	Tipo de Água					
		Bruta				Tratada	
		Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> (Nº oocistos/L)	Indicadores bacteriológicos (NPM/100 mL e P/A)			Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> (Nº oocistos/L)	
		Membrana	CaCO ₃	C. totais	<i>E. coli</i>	Membrana	CaCO ₃
1 A	20/07/98	8,4	15	1,6 x 10 ⁵	2,2 x 10 ²	0	0
2 A	25/08/98	7,3	12	5,0 x 10 ³	2,2 x 10 ²	0	0
3 A	27/10/98	3,5	9	5,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²	0,2	0
4 A	30/11/98	23,6	60	4,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²	0	0
5 A	16/12/98	21	10	8,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²	0	0
6 A	27/01/99	0	0	5,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²	0	0
7 A	09/02/99	0	6,25	8,0 x 10 ³	2,0 x 10 ²	0	0
8 A	15/03/99	0	0	5,0 x 10 ⁴	4,0 x 10 ²	0	0
9 A	14/04/99	2,6	7,5	5,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²	0	0
10 A	20/05/99	10,5	27	5,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²	0	0
11 A	18/06/99	60	112,5	2,4 x 10 ⁵	5,0 x 10 ²	1,1	0
12 A	02/07/99	0	0	1,6 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²	0	0

NPM – Nº Mais Provável (teste dos tubos múltiplos); P/A – Teste de Presença-Ausência

Não foi observado a presença dos indicadores bacteriológicos, coliformes totais e *E. coli*, nas amostras de água tratada.

Tab. 4B – Resultados Obtidos na Pesquisa de Indicadores Bacteriológicos e Oocistos de *Cryptosporidium* na ETA – B, Empregando a Técnica da Membrana Filtrante e a Precipitação do Carbonato de Cálcio para a Concentração das Amostras de Água Bruta e Tratada.

Nº da coleta	Data da coleta	Tipo de Água					
		Bruta				Tratada	
		Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> (Nº oocistos/L)	Indicadores bacteriológicos (NPM/100 mL e P/A)			Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> (Nº oocistos/L)	
		Membrana	CaCO ₃	C. totais	<i>E. coli</i>	Membrana	CaCO ₃
1 B	07/07/98	0	0	5,0 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁴	0	0
2 B	07/08/98	35	80	5,0 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵	0	0
3 B	19/10/98	5,2	90	1,6 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁴	0,2	0,9
4 B	23/11/98	28	40	1,6 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁴	1,2	0,6
5 B	07/12/98	0*	105	1,6 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	0	0
6 B	13/01/99	6,3	36	1,6 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁴	0,1	0
7 B	17/02/99	0	0	1,6 x 10 ⁶	5,0 x 10 ⁴	0	0
8 B	29/03/99	5,8	0	3,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁴	0	0
9 B	27/04/99	236	150	5,0 x 10 ⁵	8,0 x 10 ⁴	0,2	0,3
10 B	27/05/99	9,1	60	2,3 x 10 ⁴	8,0 x 10 ³	0,6	0
11 B	25/06/99	40	60,8	2,4 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁴	0,9	0
12 B	13/07/99	0	75	2,4 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁴	0	0

NPM – Nº Mais Provável (teste dos tubos múltiplos); P/A – Teste de Presença-Ausência, *utilização de pré-filtro

Não foi observado a presença dos indicadores bacteriológicos, coliformes totais e *E. coli*, nas amostras de água tratada.

4.1.1. TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE PARA A CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

Embora os volumes propostos a serem filtrados através da membrana de acetato celulose fossem inicialmente 1000 litros para água tratada e 76 litros para água bruta, como sugerido pela literatura (JAKUBOWSKI *et alli*, 1996; HANSEN & ONGERTH, 1991), estes variaram durante as coletas (Tab. 3) devido a turbidez elevada da água bruta que freqüentemente saturava a membrana e também devido a baixa vazão disponível para coleta da água tratada tornando-a insuficiente para atravessar a membrana saturada.

Na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* na amostra de água bruta 5B foi utilizado um pré-filtro em microfibra de vidro (Millipore) para a

concentração da mesma com a finalidade de reter partículas maiores e desta forma, aumentar o limite de saturação da membrana filtrante. Na análise por IF das amostras concentradas pela técnica da membrana filtrante não foram detectados oocistos, entretanto, na mesma amostra concentrada por precipitação química foi confirmada a presença de oocistos.

Os resultados obtidos na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água bruta e tratada nas ETAs estudadas, utilizando-se a membrana filtrante para a concentração das amostras estão apresentados na tabela 5A.

Tab. 5 A – Detecção de Oocistos de *Cryptosporidium* spp. em Amostras de Água Bruta e Tratada, Utilizando a Técnica da Membrana Filtrante para a Concentração das Amostras.

Tipo de Água	Nº total	Amostras positivas para <i>Cryptosporidium</i>	
		Nº	%
Bruta - ETA - A	12	8	66,67
Bruta - ETA - B	11*	9	81,82
Tratada – ETA- A	12	2	16,67
Tratada – ETA - B	12	6	50,00
Total bruta	23	17	73,91
Total tratada	24	8	33,33

* utilização de pré-filtro durante a coleta de uma amostra que não foi considerada para cálculos estatísticos.

4.1.2. TÉCNICA DA PRECIPITAÇÃO DO CARBONATO DE CÁLCIO

Embora 10 litros de amostra de água para pesquisa de *Cryptosporidium* tenha sido sugerido na literatura (VESEY *et alli*,1993a), foram coletados 20 litros de cada tipo de água a fim de aumentar a possibilidade de detecção de oocistos, principalmente em águas de baixa turbidez.

Os resultados obtidos na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água bruta e tratada nas ETAs estudadas, utilizando-se a

precipitação química para a concentração das amostras estão apresentados na tabela 5B.

A figura 11 ilustra as porcentagens de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de água bruta e tratada concentradas pela técnica da membrana filtrante e precipitação do carbonato de cálcio.

Tab. 5 B – Detecção de Oocistos de *Cryptosporidium* spp. em Amostras de Água Bruta e Tratada, Utilizando a Técnica da Precipitação do Carbonato de Cálcio para a Concentração das Amostras.

Tipo de Água	Nº total	Amostras positivas para <i>Cryptosporidium</i>	
		Nº	%
Bruta - ETA - A	12	9	75,0
Bruta - ETA - B	12	9	75,0
Tratada – ETA- A	12	0	0
Tratada – ETA - B	12	3	25,0
Total bruta	24	18	75,0
Total tratada	24	3	12,5

Fig. 11 – Porcentagem de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água bruta e tratada (ETA - A e ETA - B).

4.1.3. PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

A separação imunomagnética (IMS) foi realizada somente com as amostras 1A e 1B. A flotação em gradiente de Percoll-sucrose foi realizada com as amostras de água bruta que após a concentração apresentavam-se muito densas e nas quais o exame microscópico era limitado pela presença massiva de partículas em suspensão.

A IMS proporcionou a clarificação das amostras, diminuindo interferências de partículas em suspensão ou ligações inespecíficas do anticorpo, facilitando, desta forma, o exame microscópico das amostras. A flotação em gradiente de Percoll-sucrose proporcionou também limpidez das amostras, porém com menor êxito.

4.1.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IF) E MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

Os oocistos de *Cryptosporidium* ssp. detectados por IF apresentaram-se de forma arredondada ou levemente ovalada, de coloração verde, característica da fluoresceína, com brilho periférico e parede bem definida (Fig.12). No interior do oocisto, entretanto, predominou uma coloração verde mais clara ou aspecto transparente. Pode ser observado frequentemente também uma “linha de sutura” no interior dos oocistos (Fig.12). Outros organismos ou partículas contaminantes presentes, principalmente na água bruta, não apresentavam brilho intenso ou coloração característica, apresentando-se geralmente de coloração avermelhada. Tais partículas foram diferenciadas dos oocistos pela forma, tamanho, cor e brilho através da IF e confirmadas através de análise da morfologia por microscopia de contraste de fase (Fig. 13) com a visualização da parede e ocasionalmente estruturas internas. Nas amostras de água tratada, os oocistos frequentemente apresentavam-se com a morfologia pouco distorcida porém, com brilho intenso (Fig. 14).

Fig.12 - Oocisto de *Cryptosporidium* spp. detectado por IF (400x) em amostra de água bruta.

Fig. 13 – Oocisto de *Cryptosporidium* spp. sob microscopia de contraste de fase (1000x) detectado em amostra de água bruta.

Fig. 14 – Oocisto de *Cryptosporidium* spp. detectado por IF (400 x) em amostra de água tratada

4.1.5. CONTROLE NEGATIVO DAS METODOLOGIAS UTILIZADAS

Não foram detectados oocistos nas amostras de água destilada concentradas por filtração ou por precipitação química utilizadas como controle negativo.

4.1.6. SENSIBILIDADE DAS METODOLOGIAS EMPREGADAS

Os resultados obtidos da recuperação de oocistos para determinação da sensibilidade dos métodos a partir da inoculação, em água destilada e água bruta, de oocistos de *Cryptosporidium* sp. purificados, em diferentes concentrações estão apresentados na tabela 6.

Tab. 6 – Porcentagem de Recuperação de Oocistos Inoculados em Três Diferentes Concentrações em Amostras de 1 Litro de Água Destilada e Água Bruta.

Amostra	Método	Porcentagem de recuperação de oocistos inoculados em diferentes concentrações		
		1×10^4	1×10^3	1×10^2 (oocistos/L)
Água destilada	Filtração	69,2%	42,%	22%
	CaCO ₃	71,8%	39%	23%
Água bruta	Filtração	Nr	Nr	17,7%
	CaCO ₃	Nr	Nr	18%

Nr – não realizado; CaCO₃ – Precipitação do carbonato de cálcio

4.2. INDICADORES BACTERIOLÓGICOS

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas, coliformes totais e *E.coli*, das amostras de água bruta e tratada da ETA-A e B estão demonstrados na tabelas. 4A. e 4B respectivamente.

4.3. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os resultados das análises físico-químicas fornecidas pelas ETAs, A e B, estão demonstrados nas tabelas 7 A e 7 B respectivamente.

Tab. 7A – Parâmetros Físico-Químicos Obtidos na ETA-A

Nº da amostra	Data	Tipo de água	pH	Cor (UC)	Turbidez (UNT)	Cloro (mg/L)	Alcalinidade (mg/L)
1A	20/07/98	Bruta	7,0	30	2,5	-	22
		Tratada	8,5	< 5	0,06	0,3	26,5
2A	25/08/98	Bruta	6,8	20	4,7	-	19
		Tratada	9,1	< 5	0,07	2,2	26
3A	27/10/98	Bruta	4,5	20	3,6	-	22,5
		Tratada	9,0	< 5	0,07	2,2	22,5
4A	30/11/98	Bruta	6,7	20	3,4	-	18
		Tratada	9,0	< 5	0,11	2,0	22
5A	16/12/98	Bruta	6,6	30	3,6	-	19
		Tratada	9,1	< 5	0,16	2,0	20,5
6A	27/01/99	Bruta	6,8	20	3,5	-	22,5
		Tratada	8,7	< 5	0,06	1,9	25
7A	09/02/99	Bruta	6,6	20	3,6	-	19
		Tratada	8,6	< 5	0,14	2,2	23
8A	15/03/99	Bruta	7,0	20	3,7	-	22,5
		Tratada	8,9	< 5	0,14	1,8	25
9A	12/04/99	Bruta	6,8	20	3,3	-	18
		Tratada	9,1	< 5	0,17	2,0	18
10A	20/05/99	Bruta	6,8	20	2,8	-	19
		Tratada	8,7	< 5	0,09	2,0	21
11A	18/06/99	Bruta	6,7	20	2,2	-	18
		Tratada	8,7	< 5	0,12	2,0	20
12A	02/07/99	Bruta	6,3	30	2,1	-	16
		Tratada	8,6	< 5	0,10	2,0	17,5

UC – Unidade colorimétrica; UNT – Unidade nefelométrica de turbidez;
Alcalinidade – mg CaCO₃/L

Tab. 7b – Parâmetros Físico-Químicos Obtidos na Eta-B

Nº da amostra	Data	Tipo de água	pH	Cor (UC)	Turbidez (UNT)	Cloro (mg/L)	Alcalinidade (mg/L)
1B	13/07/98	Bruta	7,0	122	15	-	44
		Tratada	7,6	< 5	0,30	1,5	48
2B	13/08/98	Bruta	7,0	162	20	-	55
		Tratada	7,5	< 5	0,45	1,8	58
3B	19/10/98	Bruta	6,8	213	20	-	48
		Tratada	7,5	< 5	0,34	1,6	53
4B	23/11/98	Bruta	7,0	160	18	-	67
		Tratada	7,3	< 5	0,40	1,6	68
5B	07/12/98	Bruta	7,0	242	19	-	44
		Tratada	7,5	< 5	0,21	1,6	50
6B	14/01/99	Bruta	6,8	235	26	-	41
		Tratada	7,4	< 5	0,27	1,5	45
7B	01/03/99	Bruta	7,0	796	95	-	30
		Tratada	7,2	< 5	0,17	1,4	35
8B	29/03/99	Bruta	6,9	191	25	-	50
		Tratada	7,2	< 5	0,18	1,6	46
9B	27/04/99	Bruta	6,8	314	42	-	54
		Tratada	7,1	< 5	0,15	1,5	52
10B	27/05/99	Bruta	7,0	94	9	-	49
		Tratada	7,2	< 5	0,30	1,6	49
11B	25/06/99	Bruta	6,9	198	12	-	35
		Tratada	7,1	< 5	0,19	1,7	37
12B	13/07/99	Bruta	6,8	81	10	-	49
		Tratada	7,2	< 5	0,56	1,5	53

UC – Unidade colorimétrica; UNT – Unidade nefelométrica de turbidez;
Alcalinidade – mg CaCO₃/L

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

4.4.1. COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE CONCENTRAÇÃO PARA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM*

As metodologias empregadas para a concentração das amostras de água, membrana filtrante e precipitação do carbonato de cálcio, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em água bruta (Tab. 8) e em água tratada (Tab. 9) na ETA-A e ETA-B isoladamente e considerando-se o conjunto das amostras.

O teste exato de Fisher, (realizado nas situações em que as frequências esperadas de *Cryptosporidium* em cada estação foram inferiores a 5), sugeriu a não rejeição da hipótese ($P > 0,05$) de que as metodologias não diferem de forma estatisticamente significativa quanto a detecção de oocistos.

Neste estudo, quando observou-se $P \geq 0,05$, considerou-se que as metodologias não diferiram de forma estatisticamente significativa.

Tab. 8 – Comparação da Eficiência de Detecção de Oocistos de *Cryptosporidium* em Água Bruta, Utilizando a Técnica da Membrana Filtrante e a Precipitação do Carbonato de Cálcio para a Concentração das Amostras.

Amostras	ETA-A		ETA-B		ETA-A + ETA-B	
	Membrana	CaCO ₃	Membrana	CaCO ₃	Membrana	CaCO ₃
Positivas	8	9	8	9	16	18
Negativas	4	3	3	3	7	6
N	12	12	11	12	23	24
P Value	0,65		0,90		0,68	
Fisher (valor de P)	0,63		0,46		–	

$P \geq 0,05$ – as metodologias não diferem

Tab. 9 – Comparação da Eficiência de Detecção de Oocistos de *Cryptosporidium* em Água Tratada, Utilizando a Técnica da Membrana Filtrante e a Precipitação do Carbonato de Cálcio para a Concentração das Amostras.

Amostras	ETA-A		ETA-B		ETA-A + ETA-B	
	Membrana	CaCO ₃	Membrana	CaCO ₃	Membrana	CaCO ₃
Positivas	2	0	6	3	8	3
Negativas	10	12	6	9	16	21
N	12	12	12	12	24	24
P Value	0,14		0,20		0,086	
Fisher (valor de P)	0,24		0,20		–	

P ≥ 0,05 – as metodologias não diferem

4.4.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRATAMENTO DE ÁGUA NA REMOÇÃO DE OOCISTOS

Na ETA-A, a qualidade da água bruta quanto a presença de oocistos diferiu de forma estatisticamente significativa ($P < 0,05$) da água tratada final. Na ETA-B, a qualidade da água bruta quanto a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. não diferiu de forma estatisticamente significativa ($P > 0,05$) da água tratada (Tab. 10).

O teste exato de Fisher realizado com os resultados obtidos na ETA-A confirmou a hipótese de que os dois tipos de água, bruta e tratada, diferem de forma estatisticamente significativa ($P < 0,05$), sugerindo que o tratamento foi eficiente na remoção dos oocistos. Entretanto, o mesmo teste realizado com os resultados obtidos na ETA-B sugeriu a não rejeição da hipótese de que os dois tipos de água, bruta e tratada não diferem de forma estatisticamente significativa ($P > 0,05$), sugerindo que o tratamento não foi eficiente para remoção dos oocistos.

Tab. 10 – Avaliação da Eficiência de Tratamento de Água das ETAs na Remoção de Oocistos.

Amostras	ETA – A		ETA – B	
	Água bruta	Água tratada	Água bruta	Água tratada
Positivas	9	2	10	6
Negativas	3	10	2	6
N	12	12	12	12
P Value	0,0041**		0,083*	
Fisher (valor de P)	–		0,096*	

* $P \geq 0,05$ – os tipos de água não diferem;

** $P < 0,05$ – os tipos de água diferem

4.4.3. COMPARAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA BRUTA E TRATADA DAS ETAs

A qualidade da água bruta quanto a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. não diferiu de forma estatisticamente significativa ($P > 0,05$) nas estações (Tab.11).

O teste exato de Fisher sugeriu a não rejeição da hipótese de que a água bruta da ETA-A não difere de forma estatisticamente significativa ($P > 0,05$) da água bruta da ETA-B.

A qualidade da água tratada das duas estações também não diferiu de forma estatisticamente significativa ($P > 0,05$). O teste exato de Fisher confirmou a hipótese de que a água tratada da ETA-A não apresenta diferença significativa ($P > 0,05$) da água tratada da ETA-B, quanto à detecção de oocistos nas mesmas.

Tab. 11 - Comparação da Qualidade da Água Bruta e Tratada da ETA - A e ETA-B Quanto à Presença de Oocistos.

Amostras	Água Bruta		Água Tratada	
	ETA-A	ETA-B	ETA-A	ETA-B
Positivas	9	10	2	6
Negativas	3	2	10	6
N	12	12	12	12
P Value	0,6152		0,083	
Fisher (valor de P)	0,5		–	

$P \geq 0,05$ – a qualidade da água não difere

4.4.4. CORRELAÇÕES ENTRE A OCORRÊNCIA DE OOCISTOS E OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A presença e/ou ausência de oocistos nas amostras de água bruta e tratada apresentou de baixa a média correlação com os parâmetros físico-químicos analisados (o valor de r variou de $-0,36$ a $0,51$). A tabela 12 apresenta os coeficientes de correlação linear de Pearson (r) entre os parâmetros físico-químicos e a presença de oocistos nas amostras totais de água bruta e tratada, utilizando a técnica da membrana filtrante e a precipitação do carbonato de cálcio para a concentração das mesmas.

Tab. 12. – Coeficientes de Correlação Linear de Pearson (r) entre os Parâmetros Físico-Químicos e Oocistos de *Cryptosporidium* spp. Detectados, Utilizando as Técnicas de Precipitação do Carbonato de Cálcio e da Membrana Filtrante para a Concentração das Amostras de Água Bruta e Tratada.

Metodologia	Tipo de água	pH	Cor	Turbidez	Alcalinidade	Cloro
Precipitação química	Bruta	0,17	0,15	0,11	0,46	-
	Tratada	- 0,31	-	0,34	0,51	-0,13
Membrana filtrante	Bruta	0,06	0,19	0,23	0,28	-
	Tratada	- 0,36	-	-0,06	0,34	-0,13

4.4.5. CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* E INDICADORES BACTERIOLÓGICOS

A análise de correlação entre os indicadores bacteriológicos, coliformes totais e *E. coli* (Tab. 4A e 4B) e a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp demonstrou baixa correlação (o r variou de 0,10 a 0,36) entre os mesmos.

A tabela 13 apresenta os coeficientes de correlação calculados entre os indicadores bacteriológicos e o número de oocistos detectados. A concentração de oocistos das amostras de água bruta foi obtida através da técnica da membrana filtrante e da técnica de precipitação do carbonato de cálcio.

Tab. 13 – Coeficientes de Correlação Linear de Pearson (r) entre Indicadores Bacteriológicos, Coliformes Totais e *E. coli*, e Oocistos de *Cryptosporidium* spp. Detectados nas Amostras de Água Bruta.

Metodologias	Coliformes totais	<i>E. coli</i>
Membrana Filtrante	0,19	0,30
	(P=0,18)	(P=0,07)
Precipitação CaCO ₃	0,10	0,36
	(P= 0,31)	(P=0,04)

5. DISCUSSÃO

5.1. PESQUISA DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* EM ÁGUAS SUPERFICIAIS

Neste estudo, oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram pesquisados em 24 amostras de águas superficiais coletadas nos mananciais próximos aos pontos de captação de água bruta de duas ETAs da RMSP e foram detectados em média em 74,45% das mesmas. A densidade de oocistos encontrada na água bruta variou de 0 a 236 oocistos por litro.

SMITH & ROSE (1998) elaboraram uma revisão sobre a ocorrência e densidade de oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente aquático, relacionando estudos realizados em diferentes países. Nos Estados Unidos e Reino Unido, a densidade de oocistos observada por litro variou de 0,0012 a 484, na Austrália de 0,1 a 14,3, em Israel de 0,006 a 0,52, na Malásia de 2 a 245,6 e na Espanha de menos que 0,01 a 0,31.

FAYER (1997) relacionou pesquisas realizadas nos Estados Unidos e Canadá nos quais oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em águas superficiais (rios, lagos e nascentes) com porcentagem de amostras positivas de 9,1 a 100% e concentrações de 0 a 240 oocistos por litro. Em amostras de águas protegidas da atividade antrópica, oocistos foram detectados em 39%. A densidade de oocistos recuperados em águas não protegidas variou de < 0,001 a 44 oocistos por litro. Níveis de oocistos foram de 2 a 3 vezes maiores em rios e 11 vezes maior em lagos não protegidos do que em fontes similares protegidas.

Da mesma forma, a qualidade dos mananciais estudados tem sido fortemente influenciada pelas condições de saneamento local, ocorrendo inúmeras ocupações irregulares e despejo de esgotos provenientes do Rio Tiête sem nenhum tipo de tratamento prévio, entre outros fatos que poderiam

justificar a elevada concentração de oocistos e que também acarretam vários outros problemas como, por exemplo, a eutrofização das águas, dificultando o tratamento da mesma.

Embora, a qualidade das águas superficiais de diferentes regiões apresente diferenças consideráveis quanto a fatores físico-químicos como pH, turbidez, cor, alcalinidade, temperatura e quantidade de matéria orgânica, neste estudo, ao compararmos a qualidade da água dos afluentes da ETA-A e da ETA-B observamos que essas diferenças, embora significativas entre si não refletiram diretamente na ocorrência e densidade de oocistos de *Cryptosporidium*. Estes foram detectados em média em 70,83 % de água bruta da ETA-A e 78,41 % da ETA-B, com densidades variando entre 0 - 112,5 oocistos por litro na ETA-A e 0 - 236 na ETA-B. A análise estatística desses resultados revelou que não houve diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) na ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* na água bruta das estações (ETA-A e ETA-B).

A ocorrência de *Cryptosporidium* nos mananciais das ETAs aparentemente não apresentou variação sazonal, considerando-se que durante o período de coleta não houve mudanças significativas na temperatura da água, tendo esta variado de 17 a 27,5°C na ETA-A. (A ETA-B não inclui medidas de temperatura na rotina dos laboratórios). No entanto, algumas amostras de água bruta coletadas após chuvas esporádicas (outubro/98, março e maio/99) apresentaram alta densidade de oocistos (Tab. 4A; 4B). Este aumento na densidade de oocistos detectados pode ser talvez, justificado pelo aumento do nível de água das represas neste período, possibilitando o arraste de sedimentos das margens para dentro dos reservatórios. Entretanto, altas densidades de oocistos também foram detectadas em períodos de baixa pluviosidade (abril e junho). Portanto, mais estudos deverão ser realizados a fim de determinar o potencial de influência da sazonalidade sobre a ocorrência e densidade de oocistos no meio aquático em regiões de clima tropical, sem acentuadas mudanças climáticas, como ocorre nas regiões temperadas, onde

concentra-se a maioria das pesquisas deste patógeno em amostras ambientais.

Alguns estudos descritos na literatura têm demonstrado que a ocorrência de oocistos em água é intermitente, apresentando variação sazonal. ALTHERHOLT *et alii* (1998), estudou o efeito das chuvas sobre a concentração de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* no Rio Delaware, USA, e revelou que a chuva foi um fator significativo para o aumento da concentração dos dois organismos. Esse aumento foi associado com a alta turbidez causada pela ressuspensão do sedimento do rio e escoamento superficial. Porém, outros estudos indicam que a ocorrência de oocistos no meio aquático não obedece a padrões de sazonalidade (THURMAN *et alii*, 1998).

Diante da problemática da presença de oocistos nos reservatórios de água superficial utilizados para tratamento e posterior abastecimento, da capacidade de sobrevivência do *Cryptosporidium* no ambiente e da resistência destes ao tratamento de água convencional e também devido a baixa dose infectiva, inúmeros pesquisadores e agências de proteção ambiental vêm tentando esclarecer o que efetivamente representa a ocorrência de oocistos no meio aquático e que riscos pode ocasionar a saúde pública. Para tanto, limites de segurança padrão que determinem o número tolerável destes organismos no meio estão sendo avaliados. Nos Estados Unidos, a EPA estabeleceu em 1996 o limite de 10 cistos/oocistos por litro para águas superficiais captadas para abastecimento (US-EPA, 1996 apud DIAS JUNIOR, 1999).

No Brasil, pesquisas de oocistos em amostras de águas, como realizado neste trabalho, começaram a ser desenvolvidas recentemente e um limite de oocistos aceitável para águas superficiais de abastecimento começa a ser estudado a fim de monitorar os mananciais, assegurando a qualidade da água disponível para o consumo doméstico, porém não há nada ainda estabelecido.

5.2. PESQUISA DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* EM ÁGUAS TRATADAS

Das 24 amostras de água tratada coletadas nas duas ETAs em estudo, o parasita *Cryptosporidium* foi detectado em 12,5 - 33,33% das mesmas, dependendo da metodologia utilizada para a concentração. A densidade de oocistos observada nas amostras de água tratada variou de 0 a 1,2 oocistos por litro.

Na revisão sobre criptosporidiose elaborada por SMITH & ROSE (1998) a concentração de oocistos em água de consumo relatada em estudos realizados nos Estados Unidos variou de 0,005 a 0,017 oocistos por litro, no Reino Unido variou de 0,006 a 1,36 e na Espanha de valores inferiores a 0,01 até 0,02 oocistos/L.

No Brasil, no único trabalho referente à pesquisa de *Cryptosporidium* em amostras de água, publicado em revista científica até o momento, NEWNMAN *et alii* (1992) observaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em 22,2% das 18 amostras de água de consumo analisadas em uma comunidade de Fortaleza, entretanto a densidade de oocistos não foi determinada. Recentemente, porém, outros estudos vêm sendo desenvolvidos, entre os quais a pesquisa de oocistos em águas subterrâneas utilizadas para consumo no município de Itaquaquecetuba em São Paulo (GAMBA *et alii*, 1997) na qual o *Cryptosporidium* foi detectado em 100% das 8 amostras analisadas. TOMPS (1998) em Perus, São Paulo, analisou 6 amostras de água de consumo (poços e sistema de distribuição) detectando oocistos em 50% das mesmas.

Do mesmo modo que para águas superficiais, nenhum limite padrão foi ainda determinado, embora a OMS recomende a ausência de qualquer organismo patogênico em águas para consumo humano. HAAS & ROSE (1995), nos Estados Unidos, propuseram um limite de 10 a 30 oocistos por 100 litros. WALLIS *et alii* (1996), no Canadá, propuseram um limite de 5 cistos de *Giardia* em 100 litros de água. No Reino Unido está sendo proposto para água tratada o limite máximo de 1 cisto/oocisto viável ou não em 10 litros de água

(WATER QUALITY INTERNATIONAL, 1998 apud DIAS JUNIOR, 1999).

A presença de oocistos nas amostras de água tratada examinadas no presente estudo indica que o tratamento convencional de água utilizado pelas ETAs da cidade de São Paulo, de certa forma, não foi eficiente na remoção total de oocistos de *Cryptosporidium*. Entretanto, a análise estatística efetuada (Tab.10) demonstrou que na ETA-A, a água bruta diferiu de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da água tratada quanto à presença de oocistos, sugerindo que o tratamento utilizado foi eficiente na remoção do parasita. Por outro lado, a água bruta da ETA-B não diferiu de forma estatisticamente significativa ($p > 0,05$) da água tratada, sugerindo que o tratamento utilizado não foi eficiente na remoção do parasita.

Alguns fatores poderiam justificar, pelo menos parcialmente, a maior predominância de amostras positivas para *Cryptosporidium* na água tratada da ETA-B (Tab.5A; 5B). A captação de água bruta na ETA-A é realizada aproximadamente a 10 metros de profundidade e na ETA-B a captação é superficial (até o limite de 3,6 m de profundidade). Considerando-se a baixa taxa de sedimentação dos oocistos ($0,5 \mu\text{m/s}$) (ROSE 1990), a concentração destes que supostamente seriam carreados pelas adutoras para ETA-A seria menor.

Outro fator importante a ser considerado é a composição do leito filtrante dos filtros rápidos das estações de tratamento. Na ETA-A, os 32 filtros existentes possuem a mesma composição: camada suporte, areia e carvão antracito. Na ETA-B, dos 6 filtros, 4 são compostos do mesmo modo que os filtros da ETA-A acima referidos, e os outros 2 são compostos apenas pela camada suporte e areia. A água filtrada proveniente destes é misturada ao ser canalizada para um compartimento comum onde serão aplicados cal para correção do pH, cloro e flúor. O carvão antracito possui granulação menor que a areia, possuindo, portanto, maior capacidade de retenção de partículas menores e possivelmente oocistos. Desta forma, a passagem do *Cryptosporidium*, durante o processo de filtração, seria facilitada na ETA-B.

A reutilização da água de lavagem dos filtros pelas ETAs também poderia estar contribuindo para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* na água tratada, visto que este processo pode estar concentrando os oocistos retidos durante filtrações anteriores.

Por outro lado, também, a alta turbidez e cor do afluente da ETA-B dificultam o tratamento da água para remoção da quantidade excessiva de argila e matéria orgânica, respectivamente, o que implica na rápida saturação dos decantadores e filtros, limitando a capacidade de remoção de oocistos pela diminuição da eficiência dos processos de decantação e filtração.

Porém, a ocorrência de oocistos em amostras de água pós-tratamento tem sido frequentemente relatada na literatura (BUTLER & MAYFIELD, 1996; SMITH & ROSE, 1998), do mesmo modo que surtos de criptosporidiose associados ao consumo de água tratada contaminada (Tab. 1). LeCHEVALIER *et alii* (1991) pesquisando oocistos de *Cryptosporidium* em águas filtradas no Canadá observaram prevalência em 27% das amostras. Nos EUA, 26% de amostras de água tratada demonstraram estar contaminadas com *Cryptosporidium*, com densidades de 0,005 a 0,017 oocistos/L (SMITH & ROSE, 1998).

A morfologia de alguns oocistos encontrados nas amostras de água tratada frequentemente apresentava-se distorcida ou levemente alterada. De acordo com alguns autores, esta característica pode ser devida à perda de viabilidade ou inativação do parasita em consequência dos processos de desinfecção durante o tratamento de água. LeCHEVALLIER *et alii*, (1991) observou que de 24 oocistos detectados na água tratada apenas 2 apresentaram esporozoítos ou citoplasma densamente compactado, enquanto que dos 242 oocistos observados na água bruta aproximadamente um terço continham esporozoítos dentro dos oocistos.

A “linha de sutura” observada em alguns oocistos, segundo alguns autores, corresponde ao local onde a parede do oocisto foi rompida para a liberação dos esporozoítos (REDUKER, *et alii*, 1985; BUTLER & MAYFIELD,

1996). Entretanto, outros autores não consideram a presença desta linha como um indício de que o oocisto não contém mais esporozoítos no seu interior, ou seja, um oocisto inviável. ROBERTSON *et alii* (1993) consideraram importante a visualização destas linhas para o diagnóstico de viabilidade dos oocistos, sugerindo que estas indicam a posição dos esporozoítos no oocisto esporulado.

5.3. AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS PROPOSTAS PARA A PESQUISA DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* EM AMOSTRAS DE ÁGUA.

As duas metodologias de concentração de amostras de água, precipitação do carbonato de cálcio e a dissolução da membrana filtrante, utilizadas neste estudo para pesquisa de oocistos em amostras de água de baixa (tratada) e elevada turbidez (bruta), não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para detecção de oocistos (análise qualitativa), quando consideramos as estações individualmente ou quando analisamos o total das amostras das respectivas estações.

Estes resultados corroboram com alguns estudos realizados anteriormente, nos quais foram utilizadas as mesmas metodologias para a concentração das amostras de água superficiais (DIAS JUNIOR, 1999), águas de consumo humano (TOMPS, 1998) e esgotos (FARIAS^{*2}).

Porém na prática, a precipitação química, quanto a facilidade de manipulação das amostras e número de oocistos recuperados (análise quantitativa) mostrou-se mais eficiente que a membrana filtrante para análise em águas de turbidez mais elevada, como as águas superficiais (rios e represas), onde a concentração esperada de oocistos também é maior e portanto, menor volume de água necessita ser analisado.

Em contraste, a técnica de dissolução da membrana filtrante, por permitir a análise de um volume maior de água mostrou-se mais adequada para o estudo em águas de baixa turbidez, como a água obtida após o tratamento convencional, isto porque a turbidez elevada das águas superficiais (bruta)

saturava rapidamente as membranas, limitando o volume da amostra a ser analisado.

SHEPHERD & WYN-JONES (1996) compararam a técnica da membrana filtrante com a floculação e a filtração utilizando cartuchos para a recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em águas do sistema de distribuição e águas superficiais (rio). Os resultados indicaram que a floculação apresentou melhor recuperação dos dois parasitas nos dois tipos de água. Comparação semelhante entre as mesmas três técnicas de concentração foi efetuada por ONGERTH & STIBBS (1997) com amostras de água de rio, reservatórios e sistemas de distribuição, inoculadas com cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. A floculação química e a membrana filtrante apresentaram resultados similares, enquanto os filtros apresentaram menor recuperação. Entretanto, tem sido relatado que os cartuchos têm se mostrado mais eficientes para análise de volumes de água superiores aos permitidos pelas outras metodologias propostas (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

Por outro lado, acredita-se que a precipitação por carbonato de cálcio tem proporcionado, em alguns estudos, uma recuperação de oocistos maior que a membrana filtrante e a filtração através de cartuchos, isto porque, causa menor compactação e agregação de partículas. Acredita-se que a filtração possa promover a agregação de partículas ao redor do oocisto, ocasionando a perda destes durante a purificação da amostra ou causando dificuldades durante a análise por IF, encobrendo os oocistos (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

A técnica de separação imunomagnética (IMS), realizada para a purificação das amostras previamente concentradas, foi efetuada somente em 11% das amostras, permitindo melhor detecção de oocistos através da clarificação das mesmas, eliminando impurezas e partículas em suspensão na amostra que dificultam a análise por IF, uma vez que encobrem os oocistos, ocasionando resultados falso-negativos e, também às vezes, falso-positivos, quando ocorre a ligação inespecífica dos anticorpos monoclonais com partículas contaminantes. Apesar da melhora significativa na análise

microscópica das amostras, a IMS não foi um passo indispensável para a pesquisa qualitativa de oocistos nas amostras de água analisadas. Porém, como a porcentagem de purificação das amostras por IMS analisada não foi significativa (devido a disponibilidade de material), nenhuma conclusão sobre a eficiência da mesma poderá ser formulada com base neste estudo. No entanto, lembramos que a IMS é atualmente recomendada pela EPA e por muitos pesquisadores para a pesquisa de oocistos em amostras ambientais (EPA, 1997; STINEAR *et alii*, 1996).

Por outro lado, a purificação das amostras de água bruta através da flotação em gradiente de Percoll-sucrose também proporcionou a limpidez das mesmas, eliminando o excesso de partículas em suspensão que dificultam a observação microscópica. Embora proposto pela ASTM, na purificação de amostras utilizando gradiente de densidade Percoll-sucrose para pesquisa de oocistos em água bruta e tratada, tem sido frequentemente relatado na literatura as perdas de oocistos durante o procedimento com consequente redução da recuperação de oocistos (LeCHEVALLIER *et alii*, 1995).

Outra dificuldade na pesquisa ambiental de *Cryptosporidium* é a não padronização da contagem de oocistos em amostras de água que vêm apresentando diferenças significativas entre estudos realizados com diferentes tipos de amostras, variando também de laboratório para laboratório. A EPA, através do método 1622, também não esclarece como os resultados obtidos nas pesquisas de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água devem ser tratados e interpretados (KLONICK *et alii*, 1997).

KLONICK *et alii* (1997), com o objetivo de esclarecer possíveis variações na contagem de oocistos compararam três técnicas propostas para este fim: contagem microscópica direta, através de hematocitometro e utilizando-se membranas. Os autores observaram que todas as técnicas testadas apresentaram altas variações nos resultados.

A inoculação de diferentes concentrações de oocistos purificados em amostras de água destilada e água bruta apresentaram resultados similares,

sendo que menores concentrações inoculadas resultaram em uma menor recuperação de oocistos, do mesmo modo que, maiores concentrações de oocistos inoculados resultaram em maior recuperação dos mesmos.

Estes resultados corroboram com o estudo realizado por VESEY *et alii* (1991) que observaram um limite de detecção de 1000 oocistos/L em água bruta e tratada, enquanto que diluições inferiores a esta, 10^6 , 10^5 e 10^4 respectivamente, obtiveram gradativamente maior recuperação de oocistos.

Por outro lado, em amostras de alta turbidez, a presença de partículas pode auxiliar na precipitação dos organismos junto ao sedimento (LeCHEVALLIER *et alii*, 1995). Entretanto, amostras de água com elevada turbidez podem dificultar a análise por IF, diminuindo a recuperação de oocistos.

A recuperação de oocistos em cada metodologia é muito variável, assim como os métodos de contagem, dependendo das metodologias utilizadas e característica de cada tipo de água.

Desta forma, baseados nos resultados obtidos, poderíamos sugerir para pesquisa de oocistos em águas superficiais o emprego da metodologia da precipitação do carbonato de cálcio para a concentração das amostras, visto que o processamento desta é mais simples e mais econômico e tão efetivo quanto a filtração de grandes volumes de água para uma análise qualitativa.

Por outro lado, para análise de águas tratadas, onde a concentração esperada de oocistos de *Cryptosporidium* é baixa, a metodologia da membrana filtrante seria mais adequada, visto que um volume maior de água poderia ser analisado.

5.4. CORRELAÇÃO ENTRE A OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* E INDICADORES BACTERIOLÓGICOS

Considerando-se que os agentes patogênicos de veiculação hídrica apresentem como ponto comum a sua eliminação pelas fezes dos indivíduos infectados, uma alternativa mais rápida e econômica para a avaliação da qualidade microbiológica da água consiste na pesquisa de organismos indicadores de poluição fecal. Esses organismos, quando presentes na água, indicam a ocorrência de poluição de origem fecal, evidenciando o risco da presença de organismos patogênicos (FIGUEIREDO, 1994).

Os principais indicadores de contaminação são bactérias do grupo coliformes. Atualmente, para acessar a qualidade da água, entre outros parâmetros físico-químicos a serem analisados, a legislação inclui a pesquisa de coliformes totais e fecais (ou *E. coli*).

Os indicadores bacteriológicos de contaminação, coliformes totais e *E. coli*, foram observados em 100% das amostras dos mananciais que abastecem as ETAs em estudo (Tab.4A e 4B). A concentração de coliformes totais (CT) e *E. coli* em 100 mL variou de 800 a 240.000 e de 200 a 400 respectivamente, nas amostras de água bruta da ETA-A, atendendo o índice de qualidade bacteriológica para águas destinadas ao abastecimento público após tratamento convencional, que equivale a 4.000 coliformes fecais em 100 mL, em 80% de pelo menos cinco amostras mensais para águas da classe 3 (CONAMA 20, Lei Estadual nº 997).

As concentrações de CT e *E. coli*, em 100 mL, observadas nas amostras de água bruta da ETA-B foram equivalentes a 23.000 a 1.600.000 e 8.000 a 240.000 respectivamente, ou seja 100% das amostras obtiveram concentrações de *E. coli* superior àquela permitida para águas superficiais captadas para abastecimento (CONAMA 20, Lei Estadual nº 997).

Embora, as águas superficiais estudadas encontrem-se protegidas por lei, correspondendo à áreas de proteção de mananciais (Fig.4B), a alta concentração de CT e *E. coli* encontradas nas amostras analisadas refletem às

más-condições de conservação destes mananciais, principalmente o que abastece a ETA-B, indicando um alto nível de poluição dos reservatórios de águas superficiais captadas para abastecimento.

Os indicadores bacteriológicos estudados apresentaram baixa correlação com a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água bruta concentradas pela técnica da membrana filtrante ($r = 0,19$ / $P = 0,18$ para coliformes totais; e $r = 0,30$ / $P = 0,07$ para *E.coli*) e água bruta concentrada por precipitação química ($r = 0,10$ / $P = 0,31$ para coliformes totais; e $r = 0,36$ / $P = 0,04$ para *E.coli*), sugerindo que estes indicadores bacteriológicos de contaminação não são adequados para a avaliação da qualidade parasitológica da água. Estes resultados corroboram com inúmeros estudos citados na literatura (ROSE, 1990). THURMAN *et alii* (1998) também não observaram correlação significativa entre indicadores microbiológicos e a presença de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em riachos e águas de reservatórios para consumo na Austrália.

Outra evidência desta baixa correlação é demonstrada através dos surtos de veiculação hídrica de criptosporiose ocorridos quando indicadores bacteriológicos não foram detectados (HAYES *et alii*, 1989).

Entretanto, alguns autores têm sugerido correlação significativa entre os indicadores bacteriológicos e a presença de *Cryptosporidium*. ATHERHOLD *et alii* (1998), estudando o efeito de chuvas sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia*, encontraram correlação significativa entre CT, *E. coli*, *Clostridium*, colifagos e a concentração dos dois parasitas.

Outros trabalhos ainda deverão ser realizados para verificar a eficiência de um bom indicador da presença de protozoários em amostras de água, o que auxiliaria na indicação dos pontos em que a pesquisa de *Cryptosporidium* deveria ser prioritariamente realizada.

5.5. CORRELAÇÃO ENTRE A OCORRÊNCIA E DENSIDADE DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

A ocorrência e densidade de oocistos no total de amostras de água bruta concentrada pelas duas metodologias propostas, apresentou, de modo geral, baixa correlação (o r variou de $-0,36$ a $0,51$) com os parâmetros físico-químicos estudados, sugerindo que fatores como pH, turbidez, alcalinidade e cor não determinam a presença e/ou ausência de oocistos nestas amostras.

Sendo a densidade de oocistos obtida neste estudo, variável, dependendo da metodologia utilizada para a concentração da amostra, o valor do coeficiente de correlação, r (coeficiente de Pearson), entre os parâmetros físico-químicos e a densidade de oocistos também variou. Assim sendo, o valor de r para o pH variou de $0,059$ a $0,175$ determinando uma baixa correlação positiva com a densidade de oocistos. Do mesmo modo, podemos interpretar os valores de r para a turbidez ($r = 0,108$ a $0,232$) e cor ($r = 0,154$ a $0,187$). A alcalinidade, entretanto, foi o fator que obteve maior correlação com a densidade de oocistos detectados nas amostras de água bruta, apresentando correlação positiva que variou de baixa ($r = 0,285$) a média ($r = 0,463$).

Do mesmo modo, a ocorrência e concentração de oocistos no total de amostras de água após tratamento convencional demonstrou baixa correlação negativa com o pH ($r = -0,314$ a $-0,362$) e dosagem de cloro ($r = -0,129$ a $-0,131$). Baixa correlação também foi observada com a turbidez ($r = -0,063$ a $0,343$). A alcalinidade, novamente, apresentou correlação positiva com a densidade de oocistos, variando de baixa ($r = 0,336$) a média ($r = 0,507$).

Estes resultados corroboram com o estudo realizado por ROSE *et alii* (1991) que não encontraram correlação entre a turbidez e a presença de oocistos em amostras de água superficiais analisadas nos Estados Unidos. Do mesmo modo, THURMAN *et alii* (1998) não observaram correlação significativa entre a turbidez, a condutividade e a presença de oocistos em amostras de água de riachos e de reservatórios utilizadas para consumo humano, na Austrália. Em contraste, LeCHEVALLIER *et alii* (1991b) relataram correlação

positiva significativa entre parâmetros de qualidade da água bruta, incluindo turbidez, e a densidade de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*. LeCHEVALLIER *et alii* (1991b) relataram que a remoção da turbidez no processo de tratamento não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) à remoção de *Giardia* spp. Entretanto, foi observado uma correlação significativa ($p < 0,01$) entre a remoção da turbidez e remoção de *Cryptosporidium* spp.

ATHERHOLT *et alii* (1998) avaliando o efeito da chuva sobre a concentração de *Cryptosporidium* e *Giardia*, nos EUA, demonstraram correlação positiva significativa entre a concentração de cistos e oocistos e 15 outros parâmetros, entre eles: turbidez, alcalinidade, temperatura e dureza.

Entre os parâmetros físico-químicos, relatados na literatura, que tem apresentado maior correlação com a ocorrência de *Cryptosporidium* destaca-se a turbidez. No SWTR (Surface Water Treatment Rule) elaborado pela EPA a fim de minimizar a ocorrência de doenças de veiculação hídrica o limite da turbidez para água tratada diminuiu de 1,0 UNT para um nível que não exceda 0,5 UNT (SMITH & ROSE, 1998).

6. CONCLUSÕES

Baseado nos objetivos deste estudo e nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A análise da qualidade da água dos dois mananciais que abastecem as respectivas ETAs estudadas demonstrou em média, a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em 74,45% das amostras, com densidades que variaram de 0 a 236 oocistos por litro.
- A ocorrência de oocistos nas amostras de água bruta apresentou baixa correlação com os parâmetros físico-químicos estudados, sugerindo que fatores como pH, turbidez, alcalinidade e cor não determinam a presença e/ou ausência de oocistos no ambiente. Do mesmo modo, a presença de oocistos em água tratada demonstrou baixa correlação com pH, alcalinidade e cloro.
- Na ETA-A, a qualidade da água bruta quanto a presença de oocistos diferiu de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da qualidade da água tratada final, sugerindo que o tratamento foi eficiente, estatisticamente, na remoção dos oocistos. Entretanto, o tratamento de água na ETA-B, não foi, estatisticamente, considerado eficiente para remoção de oocistos, pois a qualidade da água bruta não diferiu significativamente ($p \geq 0,05$) da água tratada.
- De modo geral, a detecção de oocistos em média em 22,91% das amostras de água tratada, sugere a ineficiência do tratamento convencional de água (floculação, coagulação, decantação, filtração e desinfecção) em remover o parasita, ressaltando a importância do monitoramento das águas de abastecimento.
- Indicadores bacteriológicos apresentaram baixa correlação com a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água bruta e tratada, não

sendo estes, portanto, bons indicadores da qualidade parasitológica da água.

- As metodologias utilizadas para a concentração das amostras de água, precipitação do carbonato de cálcio e a dissolução da membrana filtrante, não apresentaram diferença significativa para pesquisa qualitativa de oocistos de *Cryptosporidium* nas amostras de água bruta e tratada. Entretanto na prática, a técnica da precipitação do carbonato de cálcio mostrou-se mais indicada para análise de águas superficiais, ao passo que a técnica da membrana filtrante, por permitir o processamento de um volume mais representativo foi mais adequada para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em água tratada.

7. RECOMENDAÇÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram claramente que os oocistos estão presentes em concentrações significativas nos mananciais que abastecem as ETAs da cidade de São Paulo e, diante da detecção deste parasita também em amostras de água tratada, evidencia-se mais uma vez a ineficiência do processo de filtração em reter os oocistos e a resistência dos mesmos aos desinfetantes comumente utilizados nos tratamentos convencionais de água. Considerando-se ainda incerto o significado da presença de oocistos no ambiente, a importância da veiculação hídrica na disseminação de doenças, a baixa dose infectiva e a ausência de tratamento específico, torna-se necessário assegurarmos a saúde pública reduzindo e controlando a presença deste patógeno nos ambientes aquáticos, minimizando riscos de infecções. Para tanto torna-se necessário:

- Preservar efetivamente a qualidade dos mananciais utilizados para captação de água para abastecimento público.
- Pesquisar novos indicadores microbiológicos e físico-químicos que melhor expressem a qualidade da água quanto a ocorrência de *Cryptosporidium*.
- Otimizar os processos de tratamento de água nas ETAs através da reformulação de dosagens de coagulantes e desinfetantes e monitoramento de filtros e decantadores, adequando-os às novas exigências de potabilidade, assegurando, desta forma, a qualidade das mesmas de modo que a água tratada esteja realmente livre de organismos patogênicos. Do mesmo modo, é importante que a água de lavagem dos filtros seja analisada, de forma a considerar os riscos que poderia acarretar ao ser reutilizada, retornando ao início do tratamento de água.
- Investir em condições de saneamento básico, através do fornecimento de água tratada, coleta e tratamento de esgoto, diante da importância da prevenção da criptosporidiose e outras doenças de veiculação hídrica.

Segundo a OMS, cada dólar investido em saneamento são economizados cinco dólares em tratamentos médicos.

- Investir em pesquisas que visem contribuir com informações referentes a presença, caracterização, remoção e inativação de oocistos de *Cryptosporidium* em ambientes aquáticos. Assim como, estudar métodos mais eficientes e econômicos para adequar a necessidade da pesquisa de *Cryptosporidium* em águas de abastecimento às condições econômicas do Brasil.
- Investir em educação, visando a prevenção da criptosporidiose, principalmente em áreas de saneamento precário, com poucos recursos.
- Comunicar aos órgãos de saúde a ocorrência de casos de criptosporidiose a fim de se obter dados epidemiológicos do parasita que auxiliem no diagnóstico precoce de novas infecções.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDOM, J.E. & CHAGLA, A.H. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Lett.Appl.Microbiol.**, **20**:186-7; 1995.
- ATHERHOLT, T.B. & KORN, L.R. ICR Protocol: alternative treatment of parasite sample data. **J. Am.Wat.Work.Assoc.**, **91**:95-102, 1999.
- ATHERHOLT, T.B.; LeCHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; ROSEN, J.S. Effect of rainfall on *Giardia* and crypto. **J.Am.Wat.Work.Assoc.**, **90**: 66-80, 1998.
- ANDRADE NETO, J.L. & ASSEF, M.C.V. Criptosporidiose e Microsporidiose. In: Tratado de Infectologia. Veronesi, R., 1996, p. 1170-2.
- APHA (American Public Health Association). Standard methods for the examination of water and wastewater. 19. ed. Washington: APHA, AWWA, 1995.
- AVERBACH, M.; CUTAIT, R.; CORRÊA, P.; DUARTE, M.I.; LEITE, K.; BORGES, J.L. Colorectal diseases in AIDS patients and endoscopic findings. **Arq.Gastroenterol.**, **35**: 104-9, 1998.
- AWAD-EL-KARIEM, F.M.; WARHURST, D.C.; McDONALD, V. Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction. **Parasitology**, **109**: 19-22, 1994.
- BEJ, A.K. & MAHBUBANI, M.H. Applications of the polymerase chain reaction (PCR) in vitro DNA-amplification method in environmental microbiology. In: PCR Technology: Current Innovations. Berlin: CRC Press, 1994. p. 327-39.
- BERNHARDT, h. & CLASEN, J. Elimination of micro-organisms illustrated with reference to the treatment of reservoir water. **GWF – Wasser/Abwasser** **137**:109-16, 1996. Apud UK DEPARTMENT OF ENVIRONMENT (1998).

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas: NBR 6023. Rio de Janeiro: ABNT, 1989.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICE. List of Journals Indexed in Index Medicus. Bethesda: NLM, 1997.

- BRASIL. Leis, Decretos, ETC. Resolução nº 20. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente (D.O.U. Executivo, 1986 p.11 356.
- BUTLER, B.J. & MAYFIELD, C.I. *Cryptosporidium* spp. – A review of the organism, the disease, and implications for managing water resources. **Waterloo Centre for Groundwater Research Waterloo.**, Ontario: Canada, 1996.
- CAMPBELL, I.; TZIPORI, S.; HUTCHISON, G. E.; ANGUS, K.W. Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. **Vet. Rec.**, **3**: 414-5, 1982.
- CAMPBELL, A.T.; ROBERTSON, L.J.; SMITH, H.V. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of *in vitro* excitation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. **Appl.Environ.Microbiol.**, **58**: 3488-93, 1992.
- CAMPBELL, A.T.; ROBERTSON, L.J.; SMITH, H.V.; GIRDWOOD, R.W.A. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts concentrated by calcium carbonate flocculation. **J.Appl.Bacteriol.**, **76**: 638-9, 1994.
- CETESB. Guia de orientação e preservação de amostras de água, São Paulo: CETESB, 1988.
- CHAURET, C.; CHEN, P.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Effect of environmental stressors on the survival of *Cryptosporidium* oocysts. Proc.AWWA Water Qual.Technol. Conf.Nov.1995.p. 1567-85.
- CHIEFFI, P.P.; SENS, Y.A.; PASCHOALOTTI, M.A.; MIORIN, L.A.; SILVA, H.G. Infection by *Cryptosporidium parvum* in renal patients submitted to renal transplant or hemodialysis. **Rev.Soc.Bras.Med.Trop.**, **31**: 333-7, 1998.
- CONSONERY, P.J.; GREENFIELD, D.N. & LEE, J.J. Pennsylvania's filtration evaluation programme. **J.Am.Wat.Work.Assoc.**, **89**: 67-77, 1997.
- CRAUN, G.F.; HUBBS, S.A.; FROST, F.; CALDERON, R.L.; VIA, S.H. Waterborne Outbreaks of Cryptosporidiosis. **J. Am.Wat.Work.Assoc.**, **90**: 81-91, 1998.
- CURRENT, W.L. & HAYNES, T.B. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. **N.Engl.J.Med.**, **308**:1252-7, 1983.
- DENG, M.Q.; CLIVER, D.O.; MARIAM, T.W. Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. **Appl.Environ.Microbiol.**, **63**: 3134-8, 1997.

- DIAS JUNIOR, O.J. Ocorrência de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas superficiais e esgotos no município de Araras, SP. São Paulo, 1999. 100p. [Dissertação de mestrado - Universidade Mackenzie].
- DIAS, R.M.; MANGINI, A.C.; TORRES, D.M.; CORRÊA, M.O.; LUPETTI, N.; CORRÊA, F.M.; CHIEFFI, P.P. Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in the country of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst.Med.Trop.São Paulo**, **30**: 310-2, 1988.
- DUPONT, H.L.; CHAPPELL, C.L.; STERLING, C.R.; OKHUYSEN, P.C.; ROSE, J.B.; JABUBOWSKI, W. The infectivity of *C.parvum* in healthy volunteers. **N.Engl. J.Med.**, **332**:855-9, 1995.
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), Method 1622: *Cryptosporidium* in Water by Filtration/IMS/FA. **US-EPA** 821-R-97-023. 1997 (Draft).
- FAYER, R. & Leek, R.G. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. **J. Protozool.**, **31**:567-9, 1984.
- FAYER, R. & UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. **Microbiol.Rev.**, **50**: 458-83, 1986.
- FAYER, R.; SPEER, C.A.; DUBEY, D.P. General Biology of *Cryptosporidium*. In: Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R. (Eds.) *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. Boca raton: CRC Press, 1990. p. 59-82.
- FAYER, R. & NERAD, T. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl.Environ.Microbiol.**, **62**:1431-3, 1996.
- FAYER, R. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boca Raton: CRC Press, 1997, p. 251.
- FEDERAL REGISTER. Proposed ICR Protozoan Method for Detecting *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Water by a Fluorescence Antibody Procedure, 1993.
- FIGUEIREDO, M.G. A água na transmissão de doenças. CETESB, São Paulo, 1994

- FORD, T.E. & COLWELL, R.R. A Global Decline in Microbiological Safety of Water: A call for action. **American Academy of Microbiology**, 1996.
- FRANCO, R.M. & CORDEIRO, N.S. Giardose e Criptosporidiose em creches no Município de Campinas, S.P. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **29**: 531-661, 1996.
- GAMBA, R.C.; CIAPINA, E.M.P.; BATELLO, E.R.; ESPÍNDOLA, R.S.; SILVA, A.L.B.; PACHECO, A.; PELLIZARI, V.H. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em águas de poços utilizados para consumo em Itaquaquecetuba – SP., 1997
- GARLIPP, C.R.; BOTTINI, P.V.; TEIXEIRA, A.T.L.S. The relevance of laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis and other coccidia. **Rev.Ins.Med.Trop.São Paulo.**, **37**: 467-9, 1995.
- GENNARI CARDOSO, M.L.; COSTA CRUZ, J.M.; de CASTRO, E.; LIMA, L.M.; PRUDENTE, D.V. *Cryptosporidium* sp. in children suffering from acute diarrhea at Uberlândia City, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, **91**(5): 551-4, 1996.
- GUIZELINE, E. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp. nas fezes de pacientes com diarreia, mediante emprego de três técnicas de coloração. São Paulo, 1991. 67p. [Dissertação de mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].
- HANSEN, J.S. & ONGERTH, J.E. Effects of Time and Watershed Characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. **Appl. Environ.Microbiol.**, **57**(10): 2790-5, 1991.
- HAYES, E.B.; MATTE, T.D.; O'Brien, T.R.; Mc-KINLEY, T.W.; Logsdon, G.S.; ROSE, J.B.; UNGAR, B.L.P.; WORD, D.M.; PINSKY, P.F.; CUMMINGS, M.L.; WILSON, M.A.; LONG, E.G.; HURWITZ, E.S.; JURANEK, D.D. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. **N.Engl.J.Med.**, **320**:1372-6;1989.
- HASS, C.N. & ROSE, J.B. Developing na action level for *Cryptosporidium*. **J. Am. Wat.Work.Assoc.**, 81-4, 1995.
- HERWALDT, B.L.; CRAUN, G.F.; STOKES, S.L.; JURANEK, D.D. Waterborne-disease outbreaks, 1989-1990. **Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ.**, **40** (3): 1-21, 1991.
- JAKUBOWSKI, W.S.; BOUTROS, S.; FABER, F; FAYER, F.; GHIORSE, W.; LeCHEVALLIER, M.; ROSE, J.; SHAUB, S.; SIGNGH, A.; STERWART, M. Environmental methods for *Cryptosporidium*. **J.Am.Wat.Work.Assoc.**,

88:107-21; 1996.

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

JOHNSON, D.W.; PIENIAZER, N.J.; GRIFFIN, D.W.; MISENER, L.; ROSE, J.B.; Development of PCR Protocol for Sensitive Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Water Samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**: 3849-55, 1995.

KLONICKI, P.T.; HANCOCK, C.M.; STRAUB, T.M.; HARRIS, S.I.; HANCOCK, K.W.; ALYASERI, ^a N.; MEYER, C.J.; STURBAUM, G. Crypto research: are fundamental data missing? **J. Am. Wat.Work.Assoc.**, **89**: 97-103, 1997.

KORICH, D.G., MEAD, J.R., MADORE, M.S., SINCLAIR, N.A.; STERLING, C.R. Effects of ozone, chorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Appl. Environ. Microbiol.**, **56**:1423-8, 1990.

KRAMER, M.H.; HERWALDT, B.L.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; JURANEK, D.D. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United Sates, 1993-1994. **Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ.**, **45** (1): 1-33, 1996.

KWA, B.H.; MOYAD, M.; PENTELLA, M.A.; ROSE, J.B. A nude mouse model as an in vivo infectivity assay for criptosporidiosis. **Water Sci.Technol.**, **27**:65-8, 1993.

LAXER, M.A.; TIMBLIN, B.K.; PATEL, R.J. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, **45**:688-94, 1991.

LeCHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; LEE, R.G. Giardia and *Cryptosporidium* spp. in Filtered Drinking Water Supplies. **Appl.Environ. Microbiol.**, **57**: 2617-21, 1991a.

LeCHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; LEE, R.G. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* ssp. in surface water supplies. **Appl.Environ.Microbiol.**, **57**:2610-6, 1991b.

LeCHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; SIEGEL, J.E.; ABBASZADEGAN, M. Evaluation of the Immunofluorescence Procedure for Detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Water. **Appl.Environ. Microbiol.**, **61**: 690-7, 1995.

- LEVINE, W.C.; STEPHENSON, W.T.; CRAUN, G.F. Waterborne disease outbreaks, 1986-1988. **Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ.**, **39**: 1-13, 1990.
- LEVY, D.A.; BENS, M.S.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L. HERWALDT, B.L. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1995-1996. **Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ.**, **47**:1-34, 1998.
- LIMA, A.A, FANG,G.; SCHORLING, J.B.; de ALBUQUERQUE, L.; McAULIFFE, J.F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R.L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Pediatr.Suppl.**,**381**: 39-44, 1992.
- LISLE, J.T. & ROSE, J.B. *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and UK: a mini review. **J.Water Supply Res.Technol.Aqua**, **44**: 103-17, 1995.
- LOUREIRO, E.C. LINHARES, A.C.; MATA, L. Cryptosporidiosis in children from 1 to 2 years of age, with acute diarrhea in Belém, Pará, Brazil. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, **84**: 117-22, 1990.
- MAcKENZIE, W.R.; HOXIE, N.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, A.K.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B.; DAVIS, J.P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted though the public water supply. **N.Engl.J.Med.**,**331**: 161-167, 1994.
- MADI, K.; TRAJMAN, A.; SILVA, C.F.; BARROSO, P.F.; BELO, M.T.; CUNHA, J.M.; ELIA, C.C. Jejunal biopsy in HIV-infected patients. **J.Acquir.Immune Defic. Syndr.**, **4**: 930-7, 1991.
- MADORE, M.S.; ROSE, J.B.; GERBA, C.P.; ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. **J.Parasit.**, **23**: 702-5, 1987.
- MANGINI, A.C.; DIAS, R.M.; GRISI, S.J.;ESCOBAR, A.M.; TORRES, D.M.; ZUBA, I.P.; QUADROS, C.M.; CHIEFFI, P.P. *Cryptosporidium* parasitism in children with acute diarrhea. **Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo**, **34**: 341-5,1992.
- MARTINS, C.H.G.; CASTRO, F.A.; SANTOS, V.R.S; MARTINEZ, R. Frequência de *Cryptosporidium* sp associadas a pacientes com diarréia em Ribeirão Preto – SP. **Rev.Bras.Anal.Clin.**, **30**:31-2, 1998.
- MAYER, C.L. & PALMER,C.; Evaluation of PCR, Nested PCR, and Fluorescent Antibodies for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Species in

- Wastewater. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**: 2081-5, 1996.
- MILLER, R.A.; BRONSDON, M.A.; MORTON, W.R. Experimental cryptosporidiosis in a primate model. **J. Infect.Dis.**, **161**: 312-5, 1990.
- MMWR (MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT) - Assessing the Public Health Threat Associated with Waterborne Cryptosporidiosis Report of a workshop. CDC.; 44: 1-15, 1995.
- MOITINHO, M.L.R.; ROBERTO, A.C.B.S.; MARTINS, M.R. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp em fezes diarréicas de crianças do município de Maringá – PR. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, **29**: 168-70, 1997.
- MOORE, A.C.; HERWALDT, B.L.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; HIGHSMITH, A.K.; JURANEK, D.D. Surveillance for waterborne disease outbreaks-United States, 1991-1992. **Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ.**, **42**: 1-22, 1993.
- MOURA, H.; FERNANDES, O.; VIOLA, J.P.; SILVA, S.P.; PASSOS, R.H.; LIMA, D.B. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, **84**: 527-33, 1989.
- NEWMAN, R.D.; WUHIB, T.; LIMA, M.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C.L.; Environmental Sources of *Cryptosporidium* in na urban slum in Northeastern Brazil. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, **49**: 270-5, 1993.
- 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. **Ann.Intern.Med.**,**120**: 500-5, 1994.
- NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; MOORE, S.R.; NATARO, J.P.; WUHIB, T.; AGNEW, D.A.; GUERRANT R.L.; LIMA, A.A. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. **J.Infect.Dis.**, **180**:167-75, 1999.
- OPAS (Organização Panamericana de Saúde. La Salud en las Americas. Conferência Sanitária Pan-Americana (publicação científica), 1998. nº 569. 2.v.
- ONGERTH, J.E. & STIBBS, H.H. Identification of *Cryptosporidium* Oocysts in River Water. **Appl.Environ.Microbiol.**, **53**, 672-6, 1987.
- PARLATORE NETTO, J.M.A., A.C. Técnica de abastecimento e tratamento de água.3.ed. São Paulo:. Cetesb, 1987, 371 p.

- PEETERS, J.E., ARES MAZÁS, E., MASSCHELEIN, W.J., VILLACORTA-MARTINEZ DE MATURANA, I.; DEBACKER, E. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl.Environ.Microbiol.**, **55**: 1519-22, 1989.
- RÉ, A.L. Qualidade microbiológica e parasitológica de águas de consumo humano do município de Araras – SP, com ênfase na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia lamblia*. São Paulo, 1999. [Dissertação de mestrado – Universidade Mackenzie].
- REDUKER, D.W.; SPEER, C.A.& BLIXT, J.A. Ultrastructural changes in oocyst wall during excystation of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa, Eucoccidiorida). **Can.J.Zool.****63**: 1892-6, 1985. Apud ROBERTSON et alii, 1993.
- ROACH, P.D.; OLSON, M.E.; WHITLEY, G.; WALLIS, P.M. Waterborne *Giardia* and *Cryptosporidium* Oocysts in the Yukon, Canada. **Appl.Environ.Microbiol.**,**59**:67-73,1993.
- ROBERTSON, L.J.; CAMPBELL, A.T. & SMITH, H.V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. **Appl.Environ.Microbiol.****58**:3494-3500, 1992.
- ROBERTSON, L.J.; CAMPBELL, A.T. & SMITH, H.V. Induction of folds or sutures on the walls of *Cryptosporidium parvum* oocysts and their importance as a diagnostic feature. **Appl.Environ.Microbiol.**, **59**: 2638-41, 1993.
- ROCHELLE, P.A; LEON, R.; STEWART, M.H.; WOLFE, R.L. Comparison of Primers and Optimization of PCR Conditions for Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in Water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**: 106-14, 1997a.
- ROCHELLE, P.A; FERGUSON, D.M.; HANDOJO, T.J.; LEON, 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*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**: 2029-37, 1997b.
- RODRIGUES, J.L.; LESER, P.; SILVA, T.M.; SANTOS, M.I.; DALBONI, M.A.; ACCETURI, C.A.; CASTELO FILHO, A. Prevalence of cryptosporidiosis in diarrheic syndrome in HIV positive patients. **Rev.Assoc.Med.Bras.**, **37**: 79-84, 1991.
- ROSE, J.B.; Occurrence and significance of *Cryptosporidium* in water. **J.Am. Water Works Assoc.**, **80**:53-8, 1988a.

- ROSE, J.B.; KAYED, D.; MADORE, M.S.; GERBA, C.P.; ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R. Methods for the recovery of *Giardia* and *Cryptosporidium* from environmental waters and their comparative occurrence. In: Wallis, P. and Hammond, B. (eds.). *Advances in Giardia Research*. Univ.Calgary Press, 1988b.
- ROSE, J.B.; Occurrence and Control of *Cryptosporidium* in Drinking Water. In: **Drinking Water Microbiol.** New York: Springer-Verlag, 1990. p. 294-321.
- SABESP. Meio Ambiente -Sistemas produtor e adutor. (on line) Available from <http://www.sabesp.com.br/ambiente/sistema>, 1999.
- SAUDA, F.C.; ZAMARIOLI, L.A; EBNER FILHO, W.; MELLO, L.B. Prevalence of *Cryptosporidium sp.* and *Isospora belli* among AIDS Patients Attending Santos Reference Center for AIDS, São Paulo, Brazil. **J.Parasitol.**, **79**: 454-6, 1993.
- SHEPHERD, K.M. & WYN-JONES. An Evaluation of Methods for the simultaneous Detection of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts from Water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**: 1317-22, 1996.
- SMITH, H.V. & ROSE, J.B. Waterborne Cryptosporidiosis: Current Status. **Parasitol. Today**, **14**:14-22; 1998.
- STERLING, R.S. In: *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. Dubey, J.P; Speer, C.A.; Fayer, R.;. Boca Raton, F.L: CRC Press, 1990. p.59-82.
- STINEAR, T.; MATUSON, A.; HINES, K.; SANDERY, M. Detection of a Single Viable *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Environmental Water Concentrates by Reverse Transcription - PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**: 3385-90, 1996.
- THURMAN, R.; FAULKNER, B.; VEAL, D.; CRAMER, G.; MEIKLEJOHN, M. Water quality in rural Australia. **J. Appl. Microbiol.**, **84**, 627-32, 1998.
- TOMPS, S.R. Estudo epidemiológico da criptosporidiose e sua associação com as condições de saneamento ambiental no distrito municipal de Perus, São Paulo-SP.1998 p. [Dissertação de mestrado, Universidade Mackenzie].
- UK Department of the Environment, Transport and the Regions. *Cryptosporidium* in water supplies (on line). Available from <http://www.dwi.detr.gov.uk/crypto/bou0.htm>, 1998.
- UNGAR, B.L.P. Cryptosporidiosis in humans. In: *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. Dubey, J.P; Speer, C.A.; Fayer, R.; Ed.. Boca Raton, F.L: CRC Press, 1990. p. 59-82.

- UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium*. In: **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 4.ed.Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. Churchill Livingstone, 1995. p.2500-10.
- UPTON, S.J. *Cryptosporidium*/Coccidial Research – Waterborne/ foodborne outbreaks (on line). Available from <http://www.ksu.edu/parasitology>; 1999.
- VESEY, G.; SLADE, J.S.; FRICKER, C.R. Taking the eye strain out of environmental *Cryptosporidium* analysis. **Lett. Appl. Microbiol.**, **13**: 62-5, 1991.
- VESEY, G.; SLADE, J.S.; BYRNE, M. SHERPHERD, K.; FRICKER, C.R.; A new method the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water; **J. Appl. Bacteriol.**, **75**, 82-6, 1993a.
- VESEY, G.; SLASE, J.S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; DENNIS, P.J.; FRICKER, C.R. Routine monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in water using flow cytometry. **J.Appl.Bacteriol.**, **75**:87-90, 1993b.
- VESEY, G.; HUTTON, P.; CHAMPION, A.; ASHBOLT, N.; WILLIAMS, K.C.; WARTON, A. E.; VEAL, D. Application of flow cytometric methods for the routine detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. **Cytometry** ,**16**:1-6, 1994.
- WALLIS, P.M.; ERLANDSEN, S.L.; ISAAC-RENTON, J.L.; OLSON, M.E.; ROBERTSON, W.J.; vanKEULEN, H. Prevalence of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts and Characterization of *Giardia* spp. Isolated from Drinking Water in Canada. **Appl.Environ.Microbiol.**,**62**: 2789-97, 1996.
- WATANABE, M. New *Cryptosporidium* Testing Methods. **Environmental Science & Technol. / News**, **30**: 532-5, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking water quality. Vol.1. Recommendations. Geneva, 1984. V.1.
- WIEDENMANN, A., KRÜGER; BOTZENHART. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples – a review of published protocols and current developments. **J.Industr.Microbiol. & Biotechnol.**, **21**, 150-66; 1998.
- WORLD DEVELOPMENT REPORT. Development and the environment. Oxford University Press, 1992.
- WUHIB, T.; SILVA, T.M.; NEWMAN, R.D.; GARCIA, L.S.; PEREIRA, M.L.; CHAVES, C.S.; WAHLQUIST, S.P.; BRYAN, R.T.; GUERRANT, R.L.; SOUSA, A.Q.; et alii. Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern Brazil. **J.Infect.Dis.**, **170**: 494-7, 1994.

8. ANEXO

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

EQUIPAMENTOS

- Bomba a motor Homelite, AP-125 – USA.
- Centrífuga Sorvall[®] Superspeed Fixed-Angle, rotor SA-300
- Centrífuga pendular CELM, LS-II
- Hidrômetro
- Microscópio de epifluorescência e contraste de fase DAS Leica DM/LB[®] (Germany)
- pHmetro digital, PHD 10
- Suporte para membrana de aço inoxidável de 293 mm de diâmetro
- Mangueiras e conexões
- Sistema de sucção a vácuo
- Agitador automático Fisatom, 704-A
- Homogeinizador (“Stomacher” 400) - Seward
- Estufa a 37°C – Fabbe-Primar, 216
- Lâmpada UV – Mineraligth[®] & Blak-Ray Lamps[®] – Mod. UVL-56
- Concentrador de partículas - MPC[®] –M (Dynal A.S., Oslo, Norway)
- Agitador -, MXIC1 (Dynal A.S., Oslo, Norway)
- Balança digital Acculab[®] V-Img
- Balança analítica Denver Instrument Company AA-200

MATERIAIS E REAGENTES

Materiais permanentes

- Frascos de vidro com tampa com capacidade de 10 litros (Schott)
- Becker de 100, 500 e 1000 mL
- Balão volumétrico de 250 e 1000 mL
- Provetas de 100, 200 e 100 mL
- Pipetas graduadas de 1, 5, 10 e 25 mL
- Pipeta Pasteur
- Frascos de diluição
- Frascos de polipropileno para coleta
- Lâminas e lamínulas de vidro
- Tubos de vidro médio
- Pinças de borda arredondada
- Pipetas automáticas de 10, 20, 100 e 1000 µL (Gilson)
- Tubos de centrifuga : 500 mL e 50 mL
- Tubos eppendorf de 1,5 mL

Materiais de consumo

- Membranas de acetato celulose de 293 mm de diâmetro e 1,2 µm (Millipore)
- Saco de polipropileno para “stomacher”
- Acetona (Merck)
- Etanol 95% e 70% (Merck)
- Metanol (Synth)
- Água destilada
- Kits:

IF - Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunofluorescent Detection).

IMS - Dynabeads anti-*Cryptosporidium* – Dynal, Oslo, Norway

- Colilert 18, Iddex

SOLUÇÕES E REAGENTES

SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÂMICO A 10%

Ácido sulfâmico (Sigma) p. a. ($\text{NH}_2 \text{SO}_3 \text{H}$)	80 g
Água destilada q.s.p.	800 mL

O ácido sulfâmico foi preparado no momento do uso sendo que 80 g de $\text{NH}_2 \text{SO}_3 \text{H}$ foi devidamente pesado e dissolvido em água destilada sob agitação para um volume final de 800 mL.

SOLUÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO 1M

Bicarbonato de sódio (Sigma)p. a. (Na H CO_3)	33,6 g
Água destilada	400 mL

A solução foi preparada no momento do uso sendo que o bicarbonato de sódio foi devidamente pesado e dissolvido em água destilada, sob agitação para um volume final de 400 mL.

SOLUÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO 1M

Cloreto de cálcio (Sigma) p. a. (Ca Cl_2)	58,8 g
Água destilada q.s.p.	400 mL

A solução foi preparada no momento do uso sendo o cloreto de cálcio devidamente pesado e dissolvido em água destilada, sob agitação para um volume final de 400mL.

HIDRÓXIDO DE SÓDIO 5 M

Hidróxido de sódio (Merck) p.a. (NaOH)	50 g
Água destilada	250 mL

Diluiu-se 50 g de NaOH em água destilada para um volume final de 250 mL.

SOLUÇÃO ESTOQUE TWEEN 80 A 1%

Tween 80 (Sigma)	1 mL
Água destilada	99 mL

Adicionou-se a 99 mL de água destilada 1 mL de Tween 80.

Para obtenção de Tween 80 0,01% fez-se a diluição da solução estoque 1:100.

SOLUÇÃO ELUENTE (Solução detergente tamponada) pH 7,4

Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1%	100 mL
Tween 80 a 1%	100 mL
Tampão fosfato (PBS) 10X	100 mL
Antifoam A (Sigma)	0,1 mL
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

A solução eluente foi preparada misturando-se os reagentes a 500 mL de água destilada, ajustando-se o pH para 7,4 e completando-se o volume para 1.000 mL com água destilada.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE TAMPÃO FOSFATO 10X CONCENTRADA (PBS 10X)

Cloreto de sódio (Merck) p.a. (NaCl)	80 g
Fosfato de potássio monobásico (J.T.Baker) p.a. ($K H_2 PO_4$)	2 g
Fosfato de sódio bibásico (Sigma)p.a. ($Na PO_4 12 H_2O$)	29 g
Cloreto de potássio (Merck) p.a. (KCl)	2 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Todos os reagentes foram devidamente pesados e diluídos em água destilada para um volume final de 1.000 mL.

SOLUÇÃO DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) A 1%

SDS (Sigma) p.a. ($C_{12} H_{25} Na O_4 S$)	10 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Dissolveu-se o SDS em água destilada para um volume final de 1.000 mL.

TIOSULFATO DE SÓDIO A 1,8%

$Na_2 S_2 O_2$ (Synth)	1,8 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

O tiosulfato de sódio foi devidamente pesado e dissolvido em água destilada para um volume final de 100 mL.

Foi utilizado 0,1 mL para 100 mL da amostra de água.

TAMPÃO FORMALINA A 10%

Fosfato dissódico hidrogenado (Na_2HPO_4)	0,762 g
Fosfato de sódio dihidrogenado (NaH_2PO_4)	0,019 g
Formalina	100 mL
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Dissolveu-se os sais em formalina completando-se o volume de 1.000 mL com água destilada.

SOLUÇÃO DE FLOTAÇÃO PERCOLL-SUCROSE

Percoll (sp. gr.1.13 – Sigma)	45 mL
Água destilada	45 mL
Solução sucrose	10 mL

A solução de flotação foi preparada 24 horas antes do uso misturando-se todos os reagentes.

SOLUÇÃO SUCROSE 2,5 M

Sucrose (Sigma)	85,58 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

A sucrose foi dissolvida em 40 mL de água pré-aquecida e posteriormente para um volume final de 100 mL adicionou-se mais água.

ÁLCOOL ETÍLICO A 95%

Álcool etílico absoluto p.a. (Merck)	950 mL
Água destilada	50 mL

O volume de álcool etílico absoluto foi medido em uma proveta e transferido para um balão volumétrico de 1.000 mL completando-se o volume com água destilada.

ÁLCOOL ETÍLICO A 70%

Álcool etílico absoluto p.a. (Merck)	700 mL
Água destilada	300 mL

O volume de álcool etílico absoluto foi medido em uma proveta e transferido para um balão volumétrico de 1.000 mL completando-se o volume com água destilada.

ÁCIDO CLORÍDRICO 0,1 N

Ácido clorídrico (HCl) (Merck)	2,1 mL
Água destilada	250 mL

O volume de HCL foi medido em uma proveta e transferido para um balão volumétrico de 250 mL completando-se o volume com água destilada.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Cryptosporidium* has emerged as one of the most important contaminants of water, causing waterborne outbreaks of cryptosporidiosis which have affected more than 427.000 individuals worldwide. At least 8 species of the genus *Cryptosporidium* has been associated with gastrointestinal disease in humans. Cryptosporidiosis can be life threatening to immunocompromised humans and can severely debilitate immunocompetent people. *Cryptosporidium* oocysts are environmentally robust and can survive in aquatic environments for months. Oocysts are resistant to standard chlorination disinfection used for drinking water treatment. The aims of this study were to determine the occurrence and the levels of *Cryptosporidium* in raw water samples and in drinking water (after flocculation, coagulation, sedimentation, filtration and disinfection) collected in two potable water treatment plants of the city of São Paulo. The relationship between parameters of water quality and the occurrence of *Cryptosporidium* were also analysed. Samples were collected at monthly intervals for a year. The samples were concentrated by flocculation (VESEY et alii, 1993a) and by membrane filtration (ALDOM & CHAGLA, 1994). The oocysts were identified by direct immunofluorescence assay and the presence was confirmed by phase contrast microscopy. The levels of coliforms and *E.coli* in the water samples were determined by the multiple tube technique using chromogenic and fluorogenic substrate (Colilert 18, Iddex). From a total of 24 samples of the each type of water investigated (12 on the each potable water treatment plant), oocysts were detected in 75% of raw water and in 12,5% of drinking water samples, when concentrated by flocculation and in 73,91% of raw water samples and in 33,33% of drinking water samples when concentrated by membrane filtration. *Cryptosporidium* oocysts levels in the samples investigated was not significantly associated with microbiological indicators and water quality parameters ($p > 0,05$). The results suggested that the conventional treatment of water is ineffective in

removing the oocysts, highlighting the necessity of establishing water catchment management programs which effectively ensure low levels of *Cryptosporidium* in raw water supplied to the treatment plants.