EVELINE WILMA COUTINHO FARIAS

**PESQUISA DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP E
SALMONELLA SPP EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DE ESGOTO
E ÁGUAS DE CÓRREGO DA CIDADE 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
2000**

Candidato (a): Eveline Wilma Coutinho Farias

Título da Dissertação: Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp em amostras de águas de esgoto e águas de córrego da cidade de São Paulo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../..... considerou o (a) candidato (a):

() **Aprovado (a)**

() **Reprovado (a)**

1) Examinador (a) _____

2) Examinador (a) _____

3) Presidente _____

EVELINE WILMA COUTINHO FARIAS

**PESQUISA DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP E
SALMONELLA SPP EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DE ESGOTO E ÁGUAS
DE CÓRREGO DA CIDADE 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

Orientadora:
Prof. Dra. Vivian Helena Pellizari

São Paulo
2000

Aos meus pais, meus exemplos de amor e vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus irmãos Márcio e Mauro, pelo apoio e amor que mantêm unida nossa família mesmo à distância.

Ao Luiz Paulo pelo amor, amizade, apoio e incentivo constantes na minha realização pessoal e profissional.

À Alice pelo apoio e carinho dados nos primeiros passos para a realização deste trabalho e à amizade que nasceu no decorrer desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari pela confiança, carinho, amizade e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Rosa de Carvalho Gamba pela orientação e auxílio constantes conferidos, mas especialmente pela a amizade e sabedoria de vida divididas, durante a elaboração deste trabalho.

À família do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Ana Paula, Adriana, Andréa, Anderson, Bolivar, Carlos (*in memorian*), Débora, Denise, Elisa Mara, Gabriela e Keili, por manterem o espírito de harmonia e alegria fazendo de nosso trabalho um segundo lar.

Aos amigos de todas as horas Anderson, Andréa, Elisa e Wendel pela amizade, o carinho e o apoio emocional.

Ao Sr. Luís e Natália pela convivência e colaboração indispensável nos trabalhos realizados no laboratório.

Aos colegas William e Humberto pela paciência nos dias, noites e horas passadas juntas durante a elaboração desta dissertação.

À Profa. Dra. Dolores e Ana Paula, do Laboratório de Virologia da Universidade de São Paulo, pelo apoio e auxílio que permitiram a viabilização deste estudo durante a fase de coleta das amostras e pela amizade surgida durante o mesmo.

Ao Prof. Dr. Sebastião pelo consentimento na utilização do espaço físico e equipamentos do seu laboratório.

Aos funcionários da secretaria da Microbiologia Alice, Ana e Naíde pela paciência e atenção dedicadas.

Aos funcionários da biblioteca do ICB/ USP pelas correções bibliográficas.

À Profa. Dra. Irma Nelly G. Rivera pela amizade, auxílio e exemplo de dedicação à ciência.

À Fundação Instituto Oswaldo Cruz, na pessoa da Dra. Eliane Moura Falavina dos Reis, do Departamento de Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias - pela sorotipagem das cepas de *Salmonella*.

À Salete Prado pelo auxílio e assessoria ao avaliar as plantas das redes de esgotos da SABESP contribuindo com maiores informações sobre o pontos de coleta.

A todos que não foram citados, mas que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma na execução desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	01
1.1 Objetivos	08
2. REVISÃO DA LITERATURA	09
2.1. Gênero <i>Cryptosporidium</i> : Patogenicidade e Epidemiologia	09
2.1.1. Surto de Veiculação Hídrica	15
2.1.2. Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp em Águas e Esgoto	20
2.2 Gênero <i>Salmonella</i> : Patogenicidade e Epidemiologia	26
2.2.1. Surto de Veiculação Hídrica	30
2.2.2. Ocorrência de <i>Salmonella</i> spp em Águas e Esgoto	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Caracterização da Região de Amostragem	36
3.1.1. Pontos de Amostragem	39
3.1.1.1. Estação Elevatória de Esgoto (E.E.E.) Parque Edu Chaves	39
3.1.1.2. Córrego Pirajussara	39
3.2. Amostras	39
3.3. Amostragem	43
3.3.1. Para Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp e <i>Salmonella</i> spp	43
3.3.2. Para Determinação de Coliformes Totais e <i>E. coli</i>	43
3.4. Procedimentos Analíticos para Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp	43
3.4.1. Métodos de Concentração	43
3.4.1.1. Técnica da Flocculação e Precipitação do Carbonato de Cálcio	44
3.4.1.2. Técnica da Dissolução da Membrana Filtrante	44
3.4.2. Detecção de oocistos	45
3.4.3. Contagem dos oocistos	46
3.4.4. Controle Negativo	46
3.4.5. Sensibilidade da Metodologia	46
3.5. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	47
3.5.1. Concentração das Amostras	47
3.5.2. Enriquecimento das Amostras	47
3.5.3. Isolamento	47
3.5.4. Identificação Presuntiva	48
3.5.5. Identificação Bioquímica	48
3.5.6. Sorologia	48
3.6. Determinação de Coliformes Totais e <i>E. coli</i>	49
3.7. Análise Estatística dos Resultados	49

4. RESULTADOS	50
4.1. Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp nas amostras de águas de esgoto e águas de córrego	50
4.1.1. Imunofluorescência direta (IF) e Microscopia de Contraste de Fases	51
4.1.2. Técnica de Floculação por Carbonato de Cálcio e Dissolução da Membrana Filtrante como Metodologias de Concentração	52
4.1.3. Análise Estatística dos Resultados	53
4.1.4. Controle Negativo	53
4.1.5. Sensibilidade das Metodologias	54
4.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp em amostras de águas de esgoto da E.E.E. Parque Edu Chaves e águas do Córrego Pirajussara.	55
4.2.1. Pesquisa e Isolamento	55
4.2.2. Sorotipos de Maior Frequência	55
4.3. Determinação de Coliformes Totais e <i>E. coli</i>	58
5. DISCUSSÃO	59
5.1. Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp nas amostras de águas de esgoto e córrego	59
5.2. Avaliação das Metodologias Propostas para a Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp em amostras de águas de esgoto e córrego	63
5.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> nas amostras de águas de esgoto e córrego	65
5.4. Pesquisa de Coliformes Totais e <i>E. coli</i> nas águas de esgoto e nas águas do córrego	69
6. CONCLUSÕES	71
7. RECOMENDAÇÕES FINAIS	73
8. ANEXOS	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ABSTRACT	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas de transmissão e fontes de infecção de *C. parvum*. As linhas contínuas representam as formas conhecidas e comprovadas, e as linhas descontínuas representam as formas em fase de estudo.

Figura 2. Fluxograma para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp em amostras de águas de esgoto e águas de córrego da cidade de São Paulo.

Figura 3. Estação Elevatória de Esgoto Parque Edu Chaves – Ponto de Elevação do esgoto por bombeamento.

Figura 3.1. Efluente da E.E.E. Parque Edu Chaves- Local de Coleta.

Figura 4. Córrego Pirajussara – No distrito do Butantã próximo à sua desembocadura no Rio Pinheiros.

Figura 4.1. Poluição as margens do córrego Pirajussara.

Figura 5. Localização dos pontos de amostragem no Município de São Paulo

Figura 6. Número de oocistos/L detectados em águas de esgoto e águas de córrego de Julho a Dezembro de 1998 na Cidade de São Paulo.

Figura 7. Oocisto de *Cryptosporidium* spp por Imunofluorescência (1000X).

Figura 8. Oocisto de *Cryptosporidium* spp por Microscopia de Contraste de Fase (1000X).

Figura 9. Distribuição percentual dos sorotipos de *Salmonella* predominantes em 73 cepas isoladas das águas de esgoto da E.E.E. Parque Edu Chaves.

Figura 10. Distribuição percentual dos sorotipos de *Salmonella* predominantes em 148 cepas isoladas das águas do córrego Pirajussara.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Resumo dos principais surtos de criptosporidiose, associados ao consumo ou contato com águas contaminadas, relatados na literatura no período de 1983 a 1998.
- Tabela 2. Número de oocistos de *Cryptosporidium* spp obtidos nas amostras de águas de esgoto da EEE “Parque Edu Chaves” e águas do córrego “Pirajussara” através das metodologias de “Floculação e Precipitação por CaCO_3 ” e “Membrana Filtrante” realizadas de Julho a Dezembro de 1998.
- Tabela 3. Nível de significância (P) para as metodologias de Floculação e Precipitação por CaCO_3 e Membrana Filtrante a partir da média geométrica do número de oocistos de *Cryptosporidium* spp detectados em amostras de águas de esgoto e córrego.
- Tabela 4. Porcentagem de recuperação de oocistos inoculados em diferentes concentrações em água destilada para determinação da sensibilidade das metodologias
- Tabela 5. Frequência de sorotipos de *Salmonella* isolados de amostras de águas de esgoto da EEE Parque Edu Chaves e águas do córrego Pirajussara da cidade de São Paulo- Julho a Dezembro 1998. Distribuição segundo os grupos sorológicos.
- Tabela 6. Determinação do número mais provável por 100 mL (NMP/100 mL) de Coliformes Totais e *E. coli* para as águas de esgoto da EEE “Parque Edu Chaves” e águas do córrego Pirajussara realizada de Julho a Dezembro de 1998
- Tabela 7. Comparação entre os sorotipos observados em diferentes épocas no município de São Paulo em águas de esgoto, nos trabalhos realizados por Martins (1979), Sanchez (1988) e Farias (2000).
- Tabela 8. Comparação entre os sorotipos observados em diferentes épocas no município de São Paulo em águas superficiais, nos trabalhos realizados por Martins (1979) e Farias (2000).
- Tabela 9: Comparação entre os sorotipos observados no município de São Paulo nas águas de esgoto e córrego do presente trabalho

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado que a pesquisa de microrganismos em águas de esgoto representa um importante parâmetro de avaliação e caracterização de possíveis agentes patogênicos circulantes numa determinada população e suas possíveis implicações à saúde pública.

O presente trabalho teve por objetivos pesquisar nas águas de esgoto da cidade de São Paulo a ocorrência do protozário emergente, *Cryptosporidium* spp, comparando-se duas técnicas de concentração, uma vez que não existem estudos relacionados a presença deste patógeno neste município, e determinar a presença de *Salmonella* spp e seus sorotipos nestas amostras. Para isto foram realizadas coletas semanais nos períodos de Julho à Dezembro de 1998, sendo doze realizadas em uma estação elevatória e doze em um córrego receptor de esgoto no município de São Paulo, aonde foi também determinada a poluição de origem fecal através da densidade de *E.coli*. Para determinação dos oocistos de *Cryptosporidium* as amostras foram concentradas por “floculação e precipitação do carbonato de cálcio” (Vesey et alii, 1993) e através da técnica da “membrana filtrante” (Aldom et alii, 1995) com posterior identificação e confirmação por imunofluorescência direta e contraste de fase, respectivamente. A determinação de *Salmonella* foi realizada segundo “Standard Methods of Water and Wastewater 19th ed.”. Para a determinação de coliformes totais e *E. coli* utilizou-se a técnica de tubos múltiplos, empregando substrato cromogênico e fluorogênico (Colilert 18, Iddex). Os resultados obtidos da análise de 24 amostras indicaram que 100% destas foram positivas tanto para a presença dos oocistos de *Cryptosporidium* sp quanto para o isolamento de *Salmonella* sp. O número de oocistos detectados variou de 0 a 1.200 e de 0 a 1.400 oocistos/L nas amostras de águas de esgoto e córrego respectivamente. Foram isoladas um total de 221 cepas de *Salmonella*. Entre os sorotipos prevalentes encontrados estão *S. panama*, *S. agona*, *S. infantis*, *S. hadar*, *S. onakan* e *S. braenderup*.

Os resultados verificaram a circulação de *Salmonella* spp e *Cryptosporidium* spp no meio ambiente estudado em São Paulo, podendo se constituir em importante fonte de disseminação destes patógenos no meio aquático e na comunidade.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O transporte de microrganismos patogênicos pelas águas tem representado um fator importante no comprometimento dos recursos hídricos e na disseminação de processos infecciosos em populações, especialmente quando sistemas de abastecimento de águas e tratamento de esgotos são precários (RIVERA & MARTINS, 1996).

Epidemias de origem e/ou veiculação hídrica são frequentemente descritas, em diferentes proporções, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Nos Estados Unidos de 1986 a 1996, foram notificadas em torno de 320 epidemias provocadas por águas de consumo e águas recreacionais contaminadas por microrganismos patogênicos, atingindo aproximadamente 500 mil pessoas (LEVINE et alii., 1990; MOORE et alii., 1993; HERWALDT et alii., 1991; KRAMER et alii., 1996a; LEVY et alii., 1998). No Brasil, só no estado de São Paulo de acordo com a divisão hídrica do Centro de Vigilância Epidemiológica deste estado, nos anos de 1996 e 1997, foram notificados 92 surtos de diarreias¹.

As águas de esgoto provenientes das mais variadas atividades humanas têm desempenhado importante papel na disseminação de inúmeros enteropatógenos no meio ambiente, tais como: os vírus, *Rotavírus*, da *Hepatite A*, *Norwalk*, helmintos como o *Ascaris lumbricoides* ou a *Taenia solium*, protozoários como o *Cryptosporidium* e a *Giardia* (DIAS JÚNIOR, 1999) e bactérias, como *Campylobacter*, *E. coli* patogênica, *Leptospira*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia* entre outros, implicando em riscos à saúde do homem e animais (WILLIAMS, 1975; LECLERC & ORGER, 1975; MORSE & DUNCAN, 1976; BURGE & MARSH, 1978; GAMESON et alii, 1978; FEACHEM et alii, 1983; AKIN, 1983; JONES & WATKINS, 1985; SANCHEZ, 1988).

Os riscos à saúde da população, quando em contato com águas de esgoto, vão depender da natureza e número de patógenos excretados, da capacidade dos mesmos

¹ Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac- Divisão Hídrica. Relatório final dos surtos de diarreia notificados a divisão hídrica-CVE 1996-1997, Outubro de 1998.

sobreviverem e se multiplicarem no ambiente, do tratamento aplicado às águas e lodos de esgoto, do tipo de resíduos industriais presentes e de vários fatores demográficos, geográficos e climatológicos (FEACHEM et alii, 1983; PIKE, 1986; SHUVAL et alii, 1986).

Nos últimos 20 anos, dois importantes patógenos para o homem têm se destacado entre outros como causadores de doenças emergentes e re-emergentes² respectivamente: o protozoário parasita intracelular *Cryptosporidium parvum* e a bactéria *Salmonella* spp (SCHMUNIS & CORBER, 1999).

O *Cryptosporidium* é um parasita da subclasse Coccidia, com pelo menos seis espécies do gênero reconhecidas, sendo o *C. parvum* conhecido como a principal espécie responsável por doenças em humanos (FAYER, 1997).

Sua primeira descrição se deu em 1907 por TYZZER em ratos, mas o seu reconhecimento como agente causador de gastroenterite aguda auto-limitada em humanos só se fez a partir de 1980 em pacientes imunocomprometidos (ANÔNIMO, 1982).

Hospedeiros infectados eliminam pelas fezes em torno de 10^9 a 10^{10} oocistos (SMITH & ROSE, 1998), que podem ser transmitidos pelas rotas indivíduo-indivíduo, animal-indivíduo, ou ainda pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos (MMWR, 1995; ROSE, 1990). Os oocistos de *Cryptosporidium* são altamente infectantes e a ingestão de até 30 oocistos podem resultar em infecções humanas (DUPONT et alii, 1995).

Algumas características importantes da presença de oocistos no meio ambiente são a sua resistência ao estresse ambiental, aos processos convencionais de tratamento de água, como a cloração e a filtração, e aos processos de tratamento de esgotos por lodos ativados (MATURANA et alii., 1992).

Recentes estudos de epidemias de criptosporidiose sugerem que a contaminação dos recursos hídricos com oocistos representam um importante fator para o desenvolvimento e transmissão desta doença (D'ÁNTONIO et alii, 1985; HAYES et alii, 1989).

² De acordo com o Instituto de Medicina dos Estados Unidos, doenças emergentes são aquelas cuja incidência em humanos aumentou nos últimos 20 anos, enquanto re-emergentes são aquelas que reaparecem após um significativo declínio na sua incidência.

De 1983 a 1998, 64 epidemias de origem hídrica foram associadas ao *Cryptosporidium* em todo mundo, atingindo aproximadamente 460 mil pessoas, incluindo o maior surto em Milwaukee/ E.U.A com 403 mil pessoas infectadas (UPTON, 1999).

No Brasil, embora subestimada, segundo o Ministério da Saúde a ocorrência da criptosporidiose em portadores do vírus HIV no período de 1980 a abril de 1999 foi de 4691 casos em 155.590 portadores. Segundo a Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, neste mesmo período foram notificados neste estado e município 2070 e 1013 casos, respectivamente em portadores do vírus³.

Foram documentadas infecções endêmicas por *Cryptosporidium* em cidades como Fortaleza, atingindo sobretudo a população mais carente e crianças (SHU-XIAN ZU et alii, 1994; NEWMAN et alii, 1994), e em Santos e São Paulo onde existem altos números de casos de portadores de HIV (SAUDA et alii, 1993).

Em águas de esgoto o número de oocistos presentes é variável, e esta taxa pode ser influenciada pelo tamanho da população.

MADORE et alii (1987), encontraram concentrações de até 13.700 oocistos/L em efluentes de esgoto bruto e 3960 oocistos/L em efluentes tratados. ROSE (1988), relatou que 91% das amostras de efluentes de esgotos dos E.U.A e 77 a 75% dos rios e lagos continham oocistos, bem como em 83% das águas protegidas e 28% das águas tratadas.

No Brasil, poucos estudos foram desenvolvidos com o propósito de determinar a presença e os riscos reais para saúde pública ocasionados por este patógeno no ambiente.

Estudos iniciais foram feitos em São Paulo por GAMBA et alii (1997) nos municípios de Itaquaquecetuba em águas de poços subterrâneos, RÉ (1999) e DIAS JÚNIOR (1999) em Araras, a partir de águas de consumo, superficiais e de esgoto, TOMPS (1998) o fez no distrito de Perus- SP a partir da análise de amostras de águas de consumo e MULLER (1999) em águas tratadas e de mananciais de estações de tratamento de água do município de São Paulo demonstrando a ocorrência e circulação deste patógeno.

³ CRT-DST/AIDS Centro de Referência e Treinamento- doenças sexualmente transmitidas, 1999.

A ausência de uma metodologia padronizada para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* no meio ambiente dificulta a viabilização de um monitoramento ou pesquisa deste patógeno emergente. Uma metodologia recomendada para pesquisa de oocistos na água é a proposta pela US-ENVIRONMENTAL PROTECT AGENCY (EPA), que envolve processos de filtração da amostra através de filtros ou membranas, concentração por centrifugação, purificação utilizando gradientes de densidade ou separação imunomagnética (IMS), análise por imunofluorescência e confirmação por contraste de fase (FEDERAL REGISTER, 1993; LECHEVALLIER et alii, 1995; EPA, 1999; UK- DEPARTMENT ENVIRONMENT, 1998). VESEY et alii (1993a) descreveram a técnica de floculação e precipitação do carbonato de cálcio como método alternativo para concentração da amostra, considerada por alguns autores como uma metodologia simples, eficiente e econômica (SHEPHERD & WYN-JONES, 1996).

Métodos genéticos têm sido desenvolvidos para amostras ambientais na tentativa de otimizar os processos de detecção de oocistos, tornando-os mais rápidos e sensíveis (JHONSON et alii, 1993; JHONSON et alii, 1995; LAXER et alii, 1991, MAYER & PALMER, 1996). Técnicas utilizando indicadores específicos (ROCHELLE et alii., 1997) como as de hibridação com sondas de oligonucleotídeos marcados por quimioluminescência (JHONSON et alii., 1995), endonucleases de restrição (AWAD-el-KARIEU et alii., 1994), PCR (MAYER & PALMER, 1996; KAUCNER & STINEAR, 1998), têm sido estudadas e aplicadas de modo a permitir a identificação de espécies de *Cryptosporidium*.

Para pesquisa de oocistos em águas de esgoto existem algumas dificuldades em função da qualidade da amostra, rica na diversidade de microrganismos e de substâncias inibidoras como o ácido húmico (MAYER & PALMER, 1996). Deste modo faz-se necessário o incentivo de estudos para padronização de uma metodologia ideal de detecção deste patógeno.

A *Salmonella* por sua vez, é um patógeno de reconhecida importância assim como a necessidade de seu controle em saúde pública, principalmente pela ocorrência crescente de cepas multiresistentes à antibióticos (SANCHEZ, 1988). Sua ampla distribuição no ambiente e resistência às condições adversas, bem como a existência de mais de 2.000 sorogrupos, causadores de doenças no homem ou

animais, favorecem a sua disseminação e complexidade de identificação (BITTON, 1994).

Estas bactérias podem sobreviver por 87 dias em águas de abastecimento público, 115 dias em solo de jardim, acima de 30 meses em esterco bovino seco e 28 meses em fezes de aves infectadas (MORSE & DUNCAN, 1974).

A *Salmonella* é transmitida quase exclusivamente pelo consumo de águas e alimentos contaminados, cuja dose mínima infectante é de 10^4 a 10^7 células. Causam febre tifóide, paratifóide e gastroenterites, especialmente em imunocomprometidos, idosos e crianças. São consideradas bactérias patogênicas predominantes nas águas de esgoto, atingindo em torno de 8 mil organismos por 100 ml da amostra. Estima-se que pelo menos 0.1% de uma população já tenha eliminado *Salmonella* em algum período (FEACHEM et alii, 1983).

Sua presença e circulação no ambiente tem sido associada por anos a processos diarreicos em diferentes comunidades (EDWARDS, 1956; BORING et alii, 1971; CRAUN & MCCABE, 1973; CDC, 1977; SATHE et alii, 1983). OHNO et alii (1997) constataram e associaram a alta contaminação por enteropatógenos do Rio La Paz na Bolívia, incluindo-se as salmonelas, com os altos índices de casos de diarreias na população local.

As salmonelas de origem humana e/ou animal têm sido frequentemente isoladas em águas de esgoto tratadas ou não, segundo relatos em diferentes países como Grã-Bretanha (WILSON & BLAIR, 1927), Argentina (FERRAMOLA et alii, 1943), Estados Unidos (BREZENSKI et alii, 1965), França (LECLERC et alii, 1970) e Brasil (MARTINS, 1979; SANCHEZ, 1988). No Canadá, KINDE et alii (1997) demonstraram a positividade para *Salmonella* em 8 de 12 estações de tratamento de esgotos estudadas, mesmo após o tratamento do mesmo, bem como nos seus efluentes. Sua densidade nestas águas pode variar consideravelmente de região a região. Embora concentrações de 10^3 a $10^4/100\text{mL}$ tenham sido detectadas (GELDREICH, 1968), também podem estar ausentes dependendo do tipo de tratamento aplicado ou da presença de substâncias tóxicas (RIVERA & MARTINS, 1996).

A pesquisa de salmonelas em águas de esgotos é de grande importância do ponto de vista epidemiológico, constituindo excelente instrumento para verificar a ocorrência e circulação desse patógeno na comunidade (MARTINS et alii, 1988).

A capacidade de sobrevivência das salmonelas por longos períodos de tempo no meio aquático, aliada à característica dinâmica desse ecossistema, são fatores importantes a serem considerados na cadeia epidemiológica das mesmas, uma vez que essas bactérias podem ser transportadas a longas distâncias e atingir direta ou indiretamente o homem através das mais variadas vias (WRAY & SOJKA, 1977; WHO, 1980; AKIN, 1983; JONES & WATKINS, 1985).

Embora as práticas sanitárias tenham melhorado com o tempo, a ocorrência de salmonelose e a sua associação à epidemias ainda são descritas em países desenvolvidos e em desenvolvimento. De 1993 a 1994 foram notificados nos Estados Unidos 7 óbitos por *Salmonella typhimurium* (KRAMER et alii, 1996a). No Brasil, nos anos de 1996 e 1997, 29 surtos de *Salmonella* foram notificados à divisão hídrica do Centro de Vigilância Epidemiológica do estado de São Paulo. Em 1996 a média foi de 39 casos de salmonelose, enquanto em 1997 foi de 38,5. Até julho de 1998, 303 casos suspeitos de febre tifóide foram notificados, com 60 confirmações laboratoriais⁴.

GOMES et alii (1991) associaram os enteropatógenos a 55% dos casos de diarreia infantil em um hospital da rede pública deste estado sendo 8% associados à *Salmonella*.

Em amostras ambientais das cidades de São Paulo e Santos, MARTINS et alii (1988) estudaram águas de esgoto, do mar e doces e verificaram que os sorogrupos e sorotipos encontrados nos esgotos apresentavam o mesmo padrão de distribuição dos encontrados em coproculturas. O que também foi observado por SANCHEZ (1988) que detectou a presença de *Salmonella* em 98,9% das amostras de águas de esgoto provenientes de vários sistemas coletores do município de São Paulo.

A partir de um programa de monitoramento realizado por 10 anos em águas brutas de nove estações de tratamento de água da Grande São Paulo, foi relatado que 30,6% de 904 amostras apresentaram positividade para *Salmonella* (MARTINS et alii, 1986).

⁴ Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac- Divisão Hídrica. Relatório final dos surtos de diarreia notificados a divisão hídrica-CVE 1996-1997, Outubro de 1998.

A preocupação com o controle das doenças diarreicas é mundial, agravando-se nos países em desenvolvimento, cuja carência de saneamento básico, limita a prevenção e o controle da morbidade e mortalidade associadas a estas doenças.

Segundo a Organização Mundial de Saúde as doenças infecciosas são hoje a maior causa de morte de crianças e jovens adultos em todo mundo somando mais de 13 milhões de mortes por ano (WHO, 1999).

Em países em desenvolvimento as doenças diarreicas acometem em torno de 1,5 bilhões de crianças com até cinco anos de idade a cada ano tendo como grande causa a intensa urbanização e a falta de acompanhamento de melhorias dos serviços de saneamento básico de abastecimento de água e coleta e tratamento de esgotos. (WHO, 1999).

Em um país como o Brasil, que apresentava até 1996, 113,83 milhões de habitantes favorecidos com água tratada e esgotamento sanitário ou seja 71,92% da população brasileira com água tratada e 30,88% da população total com cobertura de esgotos e uma ordem de investimentos na área de saneamento de 14,56 milhões de reais não foram o suficiente para retirar o Brasil do 105 lugar entre os países com maior índice de mortes por doenças infecciosas.(CABES, 1999).

Diversos estudos comprovaram que a análise microbiológica de esgotos com a pesquisa de patógenos, tem se constituído em um excelente instrumento epidemiológico para determinar quais doenças estão ocorrendo na comunidade no momento do estudo e quais os patógenos presentes e que podem se constituir em um risco potencial quando lançados ou despejados, sem tratamento prévio, em ecossistemas aquáticos (GELDREICH, 1968). Levando-se em consideração que em nosso país grande parte das águas de esgoto sanitário não recebem tratamento adequado antes de serem lançados nos corpos d'água e oceanos, a pesquisa de patógenos em águas de esgoto é de grande importância do ponto de vista epidemiológico.

1.1. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- ✓ determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp em águas de esgoto e córrego da cidade de São Paulo, através da detecção de seus oocistos;
- ✓ verificar a aplicação para águas de esgoto e córrego das metodologias de concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp propostas neste estudo;
- ✓ realizar o isolamento de *Salmonella* spp e determinar os sorotipos circulantes nestas águas,
- ✓ determinar o nível de poluição nas águas de esgoto e córrego de origem fecal através da determinação da densidade de *E. coli*, e
- ✓ fornecer subsídios para futuros estudos epidemiológicos relacionados com a potencialidade das águas de esgoto na propagação de *Cryptosporidium* e *Salmonella* no nosso meio e suas consequências para saúde pública.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Gênero *Cryptosporidium*: Patogenicidade e Epidemiologia

O *Cryptosporidium* é um protozoário cosmopolita, pertencente ao filo *Apicomplexa*, classe *Coccidia*, ordem *Eucoccidiida* e família *Cryptosporidiidae* que apresenta 6 espécies atualmente reconhecidas do gênero: *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. nasorum*, *C. serpentis*, *C. muris* e *C. parvum* que infectam respectivamente aves, peixes, répteis e mamíferos, sendo o *C. parvum* a única espécie conhecida como infectante para o homem (FAYER, 1997).

Por 48 anos após suas primeiras descrições por TYZZER em 1907 o *Cryptosporidium* manteve-se fora do “foco científico”, até 1955 quando passou a ser relacionado à doenças e mortes em criações de aves e 1971 em gado (SLAVIN, 1955; PANCIERA et alii, 1971).

Infecções por *Cryptosporidium* foram descritas em humanos em 1976 (NIME et alii, 1976; MEISEL et alii, 1976) aumentando na incidência em função do aumento do número de portadores do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) na década de 80 (ANÔNIMO, 1982).

A criptosporidiose é uma doença que pode ser transmitida pelo contato direto entre animal-pessoa ou pessoa-pessoa, ou de forma indireta pelo contato com superfícies ou consumo de água e alimentos contaminados com até 30 oocistos, (MMWR, 1995; ROSE, 1990; DUPONT et alii, 1995) ocasionando após 3 dias de exposição ao agente (FAYER & UNGAR, 1986) uma diarreia profusa com intensa desidratação, fortes dores abdominais, náusea, vômito e ainda febre (NAVIN & JURANEK, 1984).

A diversidade de reservatórios e formas de veiculação de *Cryptosporidium* spp associado à sua capacidade de sobrevivência no meio ambiente gera uma ampla rede de transmissão e fontes de infecção para o homem e/ou animais (Figura 1) (CASEMORE, 1990).

Figura 1: Rotas de transmissão e fontes de infecção de *C. parvum*. As linhas contínuas representam as formas conhecidas e comprovadas, e as linhas descontínuas representam as formas em fase de estudo (CASEMORE, 1990).

De modo geral, a transmissão zoonótica da criptosporidiose é associada à baixas práticas de higiene quando em contato com fezes, leite cru, água ou contato com animais infectados, considerados importantes reservatórios de contaminação humana e ambiental (FAYER, 1997). Diversos autores descreveram infecções por *Cryptosporidium* em adultos e crianças após o contato com vacas, ovelhas e animais domésticos (CURRENT, 1986; CASEMORE, 1990; DAWSON et alii, 1995; SHIELD et alii, 1990) bem como com os animais de estimação, como gatos e cachorros, embora estes sejam raramente descritos como fonte de infecção humana (FAYER, 1997). CURRENT (1986; 1994) ressalta também a importância da transmissão direta entre profissionais da área veterinária, uma vez que foram notificados casos de criptosporidiose nestes indivíduos ou em pessoas que conviviam com os mesmos.

Quando relacionada ao consumo de alimentos contaminados, baseado em alguns estudos epidemiológicos realizados no Reino Unido, a ingestão de certos alimentos, especialmente derivados animais como linguiça fresca ou crua, leite, carne ou peixe em más condições de consumo, aparentam ser fatores de risco para infecção por *Cryptosporidium* (CASEMORE 1990; PALMER & BIFFIN, 1990). Em Maine, nos Estados Unidos, o primeiro relato de infecção por consumo de alimentos contaminados com oocistos de *Cryptosporidium* ocorreu em 1994 após a ingestão de suco de maçã fresco, infectando 213 pessoas (MILLARD et alii, 1994).

A transmissão de *Cryptosporidium* através do meio ambiente, segundo FAYER (1997), vem ganhando reconhecimento especialmente após a ocorrência de numerosos surtos associados ao consumo ou contato com águas contaminadas. Alguns fatores biológicos e características próprias do *Cryptosporidium* facilitam a transmissão da doença através da água. A ausência de uma terapia específica para o seu tratamento e o alto número de oocistos excretados por indivíduos infectados, em torno de 10^9 a 10^{10} oocistos, 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 (MULLER, 1999).

Com a implementação da especificidade e sensibilidade dos métodos de detecção de oocistos, antes restritos à biópsia de tecidos de hospedeiros infectados,

para a observação dos mesmos em amostras de fezes ou outras (FAYER, 1997), a partir de 1983 a criptosporidiose, inicialmente descrita somente em imunocomprometidos, passa a ser relatada em mais de 60 países dos 6 continentes (UNGAR, 1995), envolvendo também indivíduos imunocompetentes, independentemente do sexo e idade, residentes em áreas urbanas e rurais (MULLER, 1999).

Em países desenvolvidos, a determinação da incidência de infecções por *Cryptosporidium* em humanos esta associada ao diagnóstico clínico e laboratorial em centros de saúde, com índices de 1-2% sobre a população total, prevalecendo em crianças (4-5%) de 1 a 5 anos de idade (CRAWFORD & VERMUND, 1988; CASEMORE, 1990; FAYER, 1997; FAYER & UNGAR, 1986; JANOFF & RELLER, 1987; REINTHALER, 1989; TZIPORI, 1988).

Uma vez que a excreção dos oocistos pode ou não coincidir com o período sintomático da doença, podem haver imprecisões quanto a sua real ocorrência, pela carência de maiores informações de sua incidência em indivíduos assintomáticos. SHEPHERD et alii (1988) verificaram uma média de 19 dias para adultos e 17 para crianças transcorridos do início dos sintomas ao término da excreção de oocistos. ROBERTS et alii (1989) estudando amostras de bile em endoscopias de rotina de 169 pacientes assintomáticos detectaram 12,7% de positividade para os oocistos de *Cryptosporidium*, metade destes eliminavam oocistos nas fezes. Outros estudos realizados com crianças de creches afirmaram que a excreção assintomática dos oocistos não é incomum, sugerindo ser subestimado o número de portadores (CRAWFORD et alii, 1988; TANGERMANN et alii, 1991).

Nos países em desenvolvimento as diferentes e muitas vezes baixa sensibilidade das técnicas de pesquisa empregadas levam à variação de ocorrência do *Cryptosporidium* spp em diversas áreas, entretanto permanece o consenso na diminuição da faixa etária atingida, geralmente abaixo dos 3 anos de idade (FAYER, 1997).

Ocorrendo na ordem de 0,1-9,1% na Europa, America do Norte e Oceania (Austrália e Nova Zelândia) e de 3,2-16,7% em países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina (FAYER & UNGAR, 1986; CURRENT & GARCIA, 1991)

a criptosporidiose muda o seu contexto de infecção rara e assintomática para uma das mais prevalentes causas de diarreia no homem e uma ampla variedade de animais (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

No Reino Unido, depois da bactéria *Campylobacter*, o *Cryptosporidium* foi o segundo patógeno entérico mais observado em crianças entre 1 a 5 anos de idade, sendo tão frequente quanto a *Salmonella* e mais que a *Shigella* (PALMER & BIFFIN, 1990).

Em Luzaka, Zambia, cujo índice de indivíduos aidéticos atinge aproximadamente 25% da população, foi comprovada a relação de *Cryptosporidium parvum* com a persistência diarreica em adultos de 4 centros urbanos (KELLY et alii, 1997).

Na Itália, em 1731 membros de um grupo de usuários de drogas de um centro de recuperação, 13,6% dos indivíduos HIV negativo e 30,7% de HIV positivos apresentaram criptosporidiose, com sintomas crônicos sendo observados em 15,4% (POZIO et alii, 1997).

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

Em áreas rurais e urbanas da república da China a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* sp em crianças e adolescentes de até 15 anos, foram de 5,06% e 0,7% respectivamente (CHEN et alii, 1992).

No Brasil de acordo com o Ministério da Saúde de 1988 a abril de 1999 consta a ocorrência de 4.691 casos de criptosporidiose em 155.590 portadores da AIDS. No estado de São Paulo, segundo a Secretaria de Saúde do Estado, 2.070 casos de criptosporidiose ocorreram dentre 78.396 casos de AIDS notificados, e no município, consta a ocorrência de 1.013 casos para o total de 36.336 portadores da AIDS⁵.

Diversos trabalhos têm descrito o *Cryptosporidium* spp como agente de infecções oportunistas em imunocomprometidos ou como importante causa de enterocolites em imunocompetentes (MULLER, 1999), despertando o interesse à sua pesquisa em amostras clínicas em várias cidades do país.

⁵ CRT-DST/AIDS (Centro de Referência e treinamento- doenças sexualmente transmitidas, 1999).

Em São Paulo, GUIZELINE & AMATO (1992) verificaram a prevalência de *Cryptosporidium* spp em fezes de imunodeprimidos e imunocompetentes, com maior incidência em indivíduos HIV positivo e crianças.

MARTINS et alii (1998) estudando a frequência de *Cryptosporidium* spp em pacientes com diarreia na cidade de Ribeirão Preto-SP encontraram positividade de 15,42%.

TOMPS (1998) no distrito de Perus em São Paulo, encontrou prevalência de *Cryptosporidium* spp sobre os demais parasitas intestinais pesquisados em fezes, seguido de *Ascaris lumbricoides*, *Endolimax nana*, *Giardia lamblia* e *Trichuris trichiura*.

Em Santos-SP em 131 pacientes aidéticos o *Cryptosporidium* sp esteve associado à 19,1% dos processos diarreicos nestes indivíduos, seguido da *Isospora belli* (SAUDA et alii, 1993).

No Rio de Janeiro, MOURA et alii (1989) e MADI et alii (1991) relataram o *Cryptosporidium* sp como o organismo mais frequente em diarreias de pacientes HIV positivos, juntamente com a *Entamoeba coli* e a *Endolimax nana*. Enquanto em Fortaleza foram o *Cryptosporidium parvum* e o *Microsporidium* (WUHIB et alii, 1994).

MOITINHO et alii (1997) observaram a ocorrência de *Cryptosporidium* sp em 6,6% de amostras de fezes em crianças no Município de Maringá PR, nas quais não foi observado a presença de outros protozoários ou helmintos.

Em Belém, LOUREIRO et alii (1990) estudando a ocorrência da criptosporidiose em crianças encontraram prevalência de 5,2%.

A determinação da sua ocorrência pela pesquisa de anticorpos na população, bem como a sua incidência em crianças também foi observada.

Em comunidades de Fortaleza NEWMAN et alii (1994) e SHU-XIAN ZU et alii (1994) demonstraram 94% e 75%, respectivamente de soroconversão para *Cryptosporidium* sp.

No nordeste do Brasil de 102 episódios diarreicos acompanhados dos 1476 ocorridos em 4 anos em crianças nascidas em centros urbanos, os oocistos de *Cryptosporidium* sp foram identificados em 7,4% de todas as amostras,

prevalentemente em crianças com diarreia persistente 16,5%, que em crianças com diarreia aguda 8,4% ou não agudas 4% (NEWMAN et alii, 1999).

MANGINI et alii (1992), de Agosto de 1987 a Julho de 1990, verificaram a ocorrência de 17,43% de oocistos de *Cryptosporidium* sp em amostras de fezes de crianças de 1 a 48 meses com diarreia aguda examinadas no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

A partir do estudo realizado inicialmente para detecção de Torovírus em espécimes fecais de crianças com diarreia aguda e persistente foi demonstrado comumente o isolamento de *Cryptosporidium* sp (KOOPMANS et alii, 1997).

Em 310 crianças de 2 a 60 meses em creches de Campinas-SP o *C. parvum* foi detectado em 6,4% das crianças entre 7 a 20 meses sem diferença de sexo, com a possível transmissão por parentes destas crianças que trabalhavam em postos de saúde (73,6%) (FRANCO & CORDEIRO, 1996).

Em Minas Gerais a Unidade Médica da Universidade Federal de Uberlândia registrou de Setembro de 1992 a Agosto de 1993, 4,26 % de positividade para oocistos de *Cryptosporidium* sp nas fezes de crianças de 0 a 12 anos (GENNARI CARDOSO et alii, 1996).

2.1.1. Surtos de Veiculação Hídrica

A determinação da potabilidade das águas devido a ausência do grupo coliformes e *E. coli*, vem sendo seriamente questionada (CRAUN, 1990), alertando para a possível inadequabilidade dos padrões microbiológicos de qualidade da água (BATIK et alii, 1983; CRAUN, 1990) uma vez que epidemias de gastroenterites, hepatites (WILSON et alii., 1982; BLOCH et alii., 1990; MACKENZIE et alii., 1994; KRAMER et alii., 1996b) giardíase e criptosporidiose (HAYES et alii., 1989; SMITH et alii. 1989; SMITH & SMITH, 1990) têm sido descritas em comunidades, aonde estes indicadores encontravam-se adequados (FEDERAL REGISTER, 1989).

PAYMENT et alii (1997), a partir de um estudo realizado de Setembro de 1993 a Dezembro de 1994, demonstraram que 14 a 40% das doenças gastrointestinais são provenientes do consumo de águas, com padrões adequados aos determinados

pela regulamentação Norte Americana referente a cloração das águas e o número de coliformes.

O *Cryptosporidium parvum* tem sido reconhecido mundialmente como um dos maiores contaminantes das águas de consumo. A descrição da contaminação dos recursos hídricos pela presença de oocistos, provavelmente de origem humana e animal, estão frequentemente associadas a surtos diarreicos e consequentemente a altos índices de morbidade e mortalidade, atingindo preferencialmente imunocomprometidos e crianças, mas também imunocompetentes e animais.

Nos Estados Unidos, o *Cryptosporidium parvum* é considerado uma das maiores causas de infecções intestinais pelo consumo de águas, levando a um dos maiores órgãos de proteção e vigilância ambiental do país, a US Environmental Protect Agency (USEPA) à tentativa de desenvolver nos últimos cinco anos, métodos para pesquisa e controle deste contaminante biológico (FAYER, 1997).

Rios, lagos e águas subterrâneas foram todos implicados como fontes de criptosporidiose e a ocorrência de infecções pelo consumo de águas tratadas sugerem a ineficiência dos processos convencionais de tratamento de água, e despertam a preocupação para manutenção e preservação dos pontos de captação da água a ser tratada para o abastecimento público.

O programa de vigilância das doenças de veiculação hídrica (WBDOs), mantido pelo Center for Disease Control e a USEPA, divulgou a ocorrência de 162 epidemias de veiculação hídrica associadas à águas de consumo atingindo 455.531 pessoas e 158 epidemias relacionadas à águas recreacionais acometendo aproximadamente 12.016 pessoas de 1986 a 1996 nos Estados Unidos, sendo 38 ocasionadas por *Cryptosporidium* com 426.274 indivíduos doentes (LEVINE et alii., 1990; MOORE et alii., 1993; HERWALDT et alii., 1991; KRAMER et alii., 1996a; LEVY et alii., 1998). As cinco maiores epidemias documentadas, destacando-se a de Milwaukee, WI (403 mil infectados), tiveram como causa a contaminação dos corpos d'água (rios, lagos, águas subterrâneas e águas tratadas destinadas ao consumo) por águas de esgoto ou por algum tipo de falha durante o tratamento das águas (FAYER, 1997).

No Reino Unido de 1983 a 1998 pelo menos 20 epidemias de criptosporidiose de veiculação hídrica foram registradas acometendo aproximadamente 2 mil pessoas, só na Inglaterra e no País de Gales de Janeiro de 1992 a 31 de Dezembro de 1995, 26 epidemias de veiculação hídrica foram notificadas, 14 implicando o *Cryptosporidium* pelo consumo de águas ou contato com águas de piscina contaminadas por oocistos (FURTADO et alii, 1998).

Segundo CRAUN et alii, apud MULLER (1999), as informações referentes aos surtos de veiculação hídrica não apresentam a dimensão real do problema, uma vez que estes não são corretamente documentados, são inadequadamente investigados e em alguns casos não são relatados ou podem simplesmente não serem reconhecidos.

Os principais surtos de criptosporidiose de veiculação hídrica descritos na literatura no período de 1983 a 1998 estão listados na tabela abaixo (MULLER, 1999).

Tabela 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, USA	(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, USA	(44)	Piscina	ND	ND
1989	Swindon, Oxf., 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, USA	(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, USA	(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 de campo
1993	Milwaukee, USA	(403.000)	Superficial	Convencional	Contaminação por esgoto/ resíduos de atividades agrícolas; falhas no sistema operacional
1993	Yakima, EUS	(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, USA	(27)	Superficial	Filtração	Contaminação por refluxo de tanques sépticos de esgoto

1994	Clarck, EUA	(103)	Superficial	Filtração	Nenhuma falha operacional notada
1994	Missouri, USA	(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, Oxf., UK	(229)	Sistema de distribuição	ND	ND
1994	Trent area, UK	(33)	Sistema de distribuição	ND	ND
1995	Alachua, EUA	(72)	Sistema de distribuição	ND	Inadequado sistema de prevenção de contra-fluxo do lixo, contaminando água da rede de um camping
1995	Devon (Torbay), UK	(575)	Superfície	ND	Alta concentração de oocistos em esgoto descarregadas 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, USA	(22)	Piscina	ND	ND
1996	Clovis, USA	(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

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

2.1.2. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp em Águas e Esgoto

A presença de *Cryptosporidium* spp no meio ambiente é demonstrada pela ocorrência de seus oocistos e a pesquisa da contaminação dos recursos hídricos (rios, lagos, mares, etc) por efluentes de esgotos pode delinear um perfil do nível de poluição ambiental, o potencial quanto aos risco de infecções quando em exposição a estas fontes e as medidas de tratamento a serem aplicadas as águas quando destinadas ao abastecimento público.

Com o aumento populacional, a demanda de água potável leva à necessidade da reciclagem de corpos d'água que muitas vezes recebem lançamentos de esgotos, podendo tornar-se fonte potencial de risco de infecções por *Cryptosporidium* no homem e animais, uma vez que seus oocistos apresentam a capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo sob as mais variadas condições ambientais, permanecendo viáveis na água por até 176 dias, incluindo 35 dias na água do mar, suportando ampla variação de temperatura (CHAURET et alii, 1995), além de quando em contato com as fezes tornarem-se mais resistentes às pressões ambientais por possível proteção quanto à dessecação (ROBERTSON et alii, 1992; FAYER, 1997).

Estudos de prevalência indicam que nos Estados Unidos 91% das águas de esgoto, 77% dos rios, 75% dos lagos, 28% das águas tratadas e surpreendentemente

83% das águas consideradas protegidas (pristinas) são positivas para oocistos de *Cryptosporidium*, em densidades de 1 a 120 oocistos/L, 0,001 a 107 oocistos/L, 0,91 a 0,58 oocistos/L, 0,001 a 0,72 oocistos/L e 0,02 a 0,08 oocistos/L, respectivamente (ROSE, 1988; ROSE, 1997).

De acordo com SMITH & ROSE (1998) no Reino Unido mais de 50% das águas superficiais e 37% das águas tratadas podem estar contaminadas com oocistos de *Cryptosporidium* e em Taiwan 72% dos mananciais de abastecimento público apresentaram oocistos de *Cryptosporidium* sp com 38% de positividade para as águas tratadas.

Pesquisas em águas de esgoto indicam que estas podem conter um número variável de oocistos de *Cryptosporidium* spp, estando diretamente relacionado com o tamanho e o número de pessoas infectadas na população. ROSE et alii (1987) durante um estudo epidemiológico de criptosporidiose observaram em águas de esgoto bruto um decréscimo de 34 oocistos/L para 1,2 oocistos/L do início ao término da epidemia.

A aplicação de tratamento nos esgotos apresenta uma maior resistência quanto a eliminação de *Cryptosporidium*, embora descrita como capaz de diminuir em 99,9% o número de bactérias lançadas pelos efluentes adjacentes as estações.

MADORE et alii (1987) examinando águas de esgoto bruto do Arizona descreveram as densidades de 850 a 13.700 oocistos/L e em efluentes tratados de 140 a 3.960 oocistos/L. DE LEON et alii (1988) também examinando amostras de esgoto bruto e tratado do Arizona demonstraram de 521 oocistos/L a 39.7 oocistos/L, respectivamente.

Nos Estados Unidos a densidade de oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas de esgoto bruto estão na ordem de 4 a 5.180 oocistos/L e em efluentes tratados por lodos ativados de 4 a 1.297 oocistos/L. Em efluentes tratados por lodos ativados e em lagos de estabilização do Reino Unido e do Oeste da África o número de oocistos detectados variaram de 3.3 a 8.51 a 1×10^3 a 2×10^4 oocistos/L (SMITH & ROSE, 1990).

No Brasil a pesquisa de *Cryptosporidium* em amostras ambientais são recentes e encontram-se em fase de expansão.

NEWMAN et alii (1994) em Fortaleza e GAMBÁ et alii (1997) no município de Itaquaquecetuba-SP, descreveram a ocorrência de *Cryptosporidium* em águas de poços (subterrânea) utilizadas para o consumo observando a ocorrência de 22,2% (18) e 100% (8) do total de amostras analisadas, respectivamente.

No distrito de Perus em São Paulo, TOMPS (1998) observou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em 50% das 6 amostras de águas de consumo analisadas.

MULLER (1999) demonstrou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp em 74,45% das águas de dois mananciais que abastecem duas Estações de Tratamento de Águas na região metropolitana de São Paulo e confirmou a eficiência do tratamento aplicado nestas águas para apenas uma das estações, uma vez que 22,91% das amostras de águas tratadas foram positivas para este patógeno.

Em Araras- SP a ocorrência e circulação do *Cryptosporidium* spp foi descrita por DIAS JÚNIOR (1999) que verificou 100% de positividade nas águas de esgoto analisadas com densidades de 472 oocistos/L e em 58,4% das águas superficiais, e RÉ (1999) relatou 16,66% de positividade para cistos de *Giardia* sem entretanto detectar oocistos de *Cryptosporidium*.

2.1.3. Métodos de Detecção em Amostras Ambientais

O reconhecimento do *Cryptosporidium* como um agente infeccioso potencialmente de veiculação hídrica, pela descrição de diversos surtos associados ao consumo ou contato com águas contaminadas por seus oocistos, gerou um grande interesse na pesquisa de sua prevalência em amostras de águas (BUTLER & MAYFIELD, 1996) e no desenvolvimento de metodologias mais sensíveis, simples, econômicas, rápidas, reprodutíveis e específicas para sua detecção nestas amostras, uma vez que não há um método padronizado para o seu estudo (JAKUBOWSKI et alii, 1996).

As metodologias que vêm sendo utilizadas para detecção destes organismos na água baseiam-se na concentração dos oocistos de *Cryptosporidium* presentes nestas amostras seguido da sua detecção. Como estes podem ocorrer em baixas densidades

no meio ambiente (JAKUBOWSKI et alii, 1996), métodos de concentração por filtração utilizando membranas de diferentes materiais e diferentes porosidades, centrifugação, cartuchos filtrantes ou ainda precipitação química foram descritos e propostos para a sua pesquisa.

Muitos trabalhos descreveram a filtração de grandes volumes de água através de cartuchos de fibra de vidro e resina ou nylon (JAKUBOWSKI, 1984; MUSIAL et alii, 1987; JAKUBOWSKI et alii, 1996; LECHEVALLIER et alii, 1995) e uma ampla variedade de resultados que podem ou não confirmar a eficiência de recuperação de oocistos por este método. CLANCY et alii (1994) observaram ao inocular quantidades conhecidas de oocistos, que a recuperação pelo método utilizando cartucho era pouco eficiente com níveis de 9% para cistos de *Giardia* e 3% para oocistos de *Cryptosporidium*, enquanto LECHEVALLIER et alii (1991) descreveram que estes resultados podem ser variáveis dependendo do tipo de amostra analisada.

A filtração utilizando membranas têm sido descrita como método eficiente para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de águas tratadas, devido a menor turbidez destas amostras que permite um maior tempo para saturação das membranas, favorecendo a concentração de um maior volume de água. Métodos utilizando membranas de polycarbonato (ONGERTH & STIBBS, 1987; HANSEN & ONGERTH, 1991) ou de acetato de celulose (ALDOM & CHAGLA, 1995; GRACZYK et alii, 1997a) foram descritos com índices de recuperação de oocistos em torno de 5% a 50% para polycarbonato, e de 70,5% a 77,7% para a de acetato de celulose.

Segundo BUTLER & MAYFIELD (1996) e GRACZYK et alii (1997b) as membranas filtrantes têm demonstrado maior eficiência na recuperação de oocistos, facilidade e segurança na manipulação das amostras, além de permitirem estudos de viabilidade e infectividade dos oocistos o que representa, um importante aspecto para a epidemiologia.

De acordo com VESEY et alii (1993a) um dos problemas da concentração por filtração é a compactação de partículas sob ou ao redor dos oocistos encobrindo-os e consequentemente resultando em falso negativos, ou mesmo o acúmulo de partículas autofluorescentes, como as algas, resultando em falso positivos durante a detecção de

oocistos por imunofluorescência ou citometria de fluxo. Deste modo foi proposto um método de concentração de volumes de 10L de água por precipitação e floculação química de carbonato de cálcio contornando assim estas dificuldades, por este causar menos compactação e agregação de partículas, além de ser mais simples e econômico e apresentar uma recuperação de 76% para água deionizada, 73,7% para água de torneira e 75,6% para águas de rio.

TOMPS (1998), DIAS JÚNIOR (1999), RÉ (1999) e MULLER (1999) também verificaram bons resultados a partir do emprego da floculação de carbonato de cálcio em amostras de águas de consumo, de esgoto e tratadas, respectivamente.

Uma metodologia (1623) foi proposta pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e tem sido utilizado como alternativa para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em volumes de 10L de amostras de águas superficiais ou de outros tipos, e consiste na concentração deste volume por filtração, seguido de purificação por separação imunomagnética, detecção dos oocistos por imunofluorescência e confirmação por microscopia de contraste de fase (EPA, 1999).

ZUCKERMAN et alii (1999) também indicaram como método alternativo de concentração para grandes volumes de água, a centrifugação de fluxo contínuo, com deposição de sedimento no fundo do tubo de centrífuga, aspiração do sobrenadante e análise por imunofluorescência em até 2h, com recuperação de até 90% dos oocistos inoculados nas amostras avaliadas, sendo comparado como tão eficiente quanto o método de floculação e precipitação do carbonato de cálcio proposto por VESEY et alii, e de superior qualidade frente a concentração por cartucho, podendo ser utilizado com praticidade por ser compacto, móvel, flexível e reproduzir bons resultados.

Da comparação entre a utilização de cartucho de 1 µm de porosidade, membrana de polycarbonato e um ultrafiltro de fibra, foi observado que todos poderiam ser usados para pesquisa de oocistos com altas recuperações de *Cryptosporidium* em amostras de água (SIMMONS et alii, 1999).

A detecção de *Cryptosporidium* está primordialmente associada a visualização dos oocistos por microscopia de imunofluorescência, acompanhada muitas vezes em amostras de alta turbidez de um processo de purificação feito por separação

imunomagnética, gradiente de densidade de Percoll-sucrose ou soluções de sais (JAKUBOWSKI et alii, 1996).

A citometria de fluxo em conjunto com a separação imunomagnética (IMS) têm reduzido o tempo necessário para o processamento das análises das amostras de água, isto por que reduzem o número de partículas interferentes presentes no meio que poderiam se ligar de maneira inespecífica ao anticorpo, dificultando a análise por imunofluorescência e também por concentrarem o número de oocistos presentes nas amostras (VESEY et alii, 1993b e 1994; STINEAR et alii, 1996; DENG et alii, 1997; JAKUBOWSKI et alii, 1996).

Métodos genéticos baseados na detecção do ácido nucleico de *Cryptosporidium*, como a técnica de PCR tem sido desenvolvidos para amostras ambientais (LAXER et alii, 1991; JOHNSON et alii, 1993; BEJ & MAHBUBANI, 1994; MAYER & PALMER, 1996) afim 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). Porém substâncias como ácido húmico presentes geralmente em amostras ambientais podem inibir e alterar as reações por PCR, sendo ainda necessário um aprimoramento desta técnica (JAKUBOWSKI et alii, 1996).

A eletroquimioluminescência, entretanto, tem sido descrita como um método simples, de fácil execução e alta reprodutibilidade dos resultados além de ser quantitativa e não requerer análise microscópica e ser específica para *C. parvum* detectando até 1 oocisto em 1 mL de amostra com uma turbidez de até 10.000 NTU (LEE et alii, 1999b).

Apesar de uma grande variedade de estudos mais sofisticados estarem sendo realizados e testados para pesquisa de oocistos em água como a citometria de fluxo, cultura de células, métodos colorimétricos, ELISA, PCR, métodos imunoenzimáticos e eletroquimioluminescência a imunofluorescência permanece como um dos métodos mais indicados para pesquisa de *Cryptosporidium* (VESEY et alii, 1993b; LEE et alii, 1999a; FAYER, 1997).

A determinação da viabilidade dos oocistos detectados são consideradas indispensáveis para a confirmação dos riscos para este patógeno, uma vez que

somente oocistos viáveis e infectantes podem se constituir em problemas à saúde, sendo entretanto incipientes os métodos e estudos com este intuito.

2.2. Gênero *Salmonella*: Patogenicidade e Epidemiologia

Entre os bacilos gram-negativos causadores de gastroenterites, aqueles pertencentes ao gênero *Salmonella* merecem especial atenção, por serem causa de morbidade e mortalidade em diversos países levando a problemas de ordem social e econômica. Este gênero, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é caracterizado por um grupo de bacilos mesófilos não produtores de esporos, anaeróbios facultativos e na sua grande maioria, produtores de gás a partir da glicose. São conhecidos cerca de 2.300 sorotipos de *Salmonella*, todos relacionados a doenças no homem e animais, os quais são classificados de acordo com sua composição antigênica: antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi). Destes, apenas *S. pullorum* e *S. gallinarum* são imóveis (JAY, 1996).

As salmonelas podem ser divididas em dois grupos principais, segundo sua patogenicidade e epidemiologia: sorotipos adaptados a hospedeiros específicos e sorotipos ubiqüitários (encontrados em várias espécies). Entre os sorotipos adaptados ao homem, estão os agentes etiológicos das febre tifóide e paratífóide, *S. typhi* e *S. paratyphi* A e B, que produzem quadros clínicos geralmente graves e cuja infecção se caracteriza por um estado febril prolongado ou febre entérica, podendo causar septicemias. Outros sorotipos estão adaptados a espécies animais, como é o caso da *S. abortusovis* que causa aborto em ovelhas e a *S. gallinarum* que causa sérias infecções em aves domésticas. Os sorotipos ubiqüitários, na sua grande maioria, não apresentam um hospedeiro específico, infectando indistintamente homens e animais (SANCHEZ, 1988).

A patogenicidade da *Salmonella* é influenciada pela idade, dose infectante e condições de saúde do hospedeiro. Crianças, neonatos, idosos e indivíduos imunocomprometidos são geralmente mais susceptíveis que adultos, que quando

infectados usualmente desenvolvem uma gastroenterite auto-limitada (TRABULSI et alii, 1997).

A transmissão desta importante zoonose está intimamente relacionada ao consumo de alimentos, particularmente os de origem animal, mas também podem ser adquiridas pelo contato ou consumo de águas contaminadas (LOUREIRO, 1990).

É estimado que cerca de 2 a 4 milhões de casos de salmonelose ocorrem anualmente nos Estados Unidos e sua incidência tem aumentado a cada ano neste e em outros países industrializados (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 1997). De acordo com o “United States Department of Health and Human Services” “Center for Disease Control” em Atlanta, apud WORCMAN-BARNINKA (1997), um terço dos casos de doenças transmitidas por alimentos é ocasionado pela *Salmonella*. De 1981 a 1985, 380 epidemias de veiculação alimentar por *Salmonella enteritidis* envolvendo 13.056 pessoas ocorreram neste país (MISHU et alii, 1994).

Na Europa Ocidental, a Salm-Net (Rede Europeia de Vigilância para *Salmonella*) verificou que a *S. enteritidis* manteve-se como uma importante causa de doença no ano de 1995 na Áustria, Escócia, Espanha, Holanda, Inglaterra e Gales, Suécia e Suíça onde ocorreram 30 mil casos de infecções por este sorotipo (EUROSURVEILLANCE, 1997a). Na França, o Centro Nacional de Referência de *Salmonella* (CNR) neste mesmo período, notificou um número maior do que o esperado de casos de infecção humana por *Salmonella dublin*, levando este órgão a desenvolver uma investigação para determinar a amplitude e o impacto deste surto e identificar a fonte e o veículo de transmissão desta doença para a adoção de medidas adequadas ao seu controle (EUROSURVEILLANCE, 1996).

No Brasil, de acordo com o sistema de informações sobre mortalidade (SIM) do SUS, as febres tifóide e paratifóide foram causa de mortalidade, com 24 óbitos registrados até 1996, e morbidade em todas as regiões do país totalizando 2.313 casos confirmados da doença até o mês de Junho de 1998, predominando na região Nordeste (1.551) seguido das regiões Norte (448), Sul (162), Sudeste (142) e Centro-Oeste (10) (CABES, 1999).

No estado de São Paulo a taxa de letalidade para a febre tifóide nos anos de 1995, 1996 e 1997 foram de 5,88%, 2,38% e 6,66%, respectivamente, embora a sua incidência tenha decrescido desde 1960 quando eram observados coeficientes de

incidência por 100 mil habitantes de 5,10 para 0,05 em 1996 e 0,03 em 1997. Destacando-se nestes dois últimos períodos como as regiões onde ocorreram o maior índice de casos os municípios de Campinas com 84 (27,7%) e São José do Rio Preto com 31 (10,2%) e a capital do estado com 48 (15,8%) casos notificados⁶.

A vigilância da salmonelose é descrita em todo mundo especialmente após o aparecimento de cepas multirresistentes à antibióticos, o que dificulta o seu controle e tratamento. A Organização Mundial de Saúde assinalou recentemente um aumento alarmante de estirpes de *Salmonella* resistentes aos antibióticos devido ao uso abusivo dos mesmos em criações intensivas. Na França mais de 80% das cepas de *Salmonella* de animais e humanos revelaram-se resistentes a mais de um dos antibióticos utilizado preferencialmente no tratamento desta doença (EUROSURVEILLANCE, 1997b). O aumento da resistência ao tratamento por ampicilina (18 para 78%), cloranfenicol (15 para 78%), tetraciclina (53 para 89%) e co-trimoxazol (3 para 37%) também foi observado em *S. typhimurium* na Espanha por GALLARDO et alii (1999).

A circulação no meio ambiente de cepas de *Salmonella* provenientes de populações humanas ou animais resistentes a antibióticos aumentam os riscos de disseminação e persistência desta zoonose. No Brasil, SANCHEZ (1988) descreveu que 67,1% das cepas isoladas nas águas de esgoto dos municípios de São Paulo e da cidade de Santos eram resistentes a mais de um antimicrobiano e FARIAS (1997) em Belém evidenciou para 11 antimicrobianos avaliados 56,1% de resistência em cepas isoladas em amostras humanas, de 79% em amostras de isolados de esgotos, de 78,9% em rios e de 64,5% em igarapés.

A presença de *Salmonella* na população e no meio ambiente são constantemente descritas dado o seu isolamento em diversos tipos de amostras em diferentes localidades.

GONZALEZ- HEVIA et alii (1999), realizando um estudo retrospectivo em Asturias na Espanha, para *Salmonella* sp isoladas de amostras de casos humanos ou outras procedências nos anos de 1990 a 1996, obtiveram um total de 3.225 cepas com 45 diferentes sorotipos, prevalecendo *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. virchow* e *S. hadar*. Do total, 3.193 cepas foram coletadas de amostras humanas, 32 de esgotos e

⁶ Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”- Divisão Hídrica. Febre Tifóide

águas superficiais, 22 de alimentos e 2 de fezes de animais. No local de estudo as gastroenterites foram umas das maiores causas de doenças na comunidade (97%), e 75 epidemias associadas a estes sorotipos foram registradas neste período.

TAVECHIO et alii (1996) notificaram em São Paulo a presença deste agente a partir do seu isolamento em amostras de fezes (73,5%), sangue (13,4%) líquido cefalo raquidiano (2%), águas de esgoto (5,2%), outros tipos de amostras ambientais (8,7%), produtos de origem animal (20,2%) e alimentos (30,7%) a partir do estudo realizado com 5.490 cepas de *Salmonella* isoladas de 1991 a 1995 de infecções humanas (2.254) e não humanas (3.236). Quanto aos sorotipos isolados em amostras humanas deste estado TAUNAY et alii (1996) observaram uma mudança no perfil dos mesmos ao longo dos anos. De 1950 a 1966 predominavam *S. newport* (19,9%), *S. anatum* (17,6%) e *S. typhimurium* (11,1%), esta última passando a predominar na população (77,7%) a partir de 1970 até 1982 após o período de 1968 a 1969 onde houveram epidemias de origem hospitalar causadas por este sorotipo. A partir de 1983 até 1990 um declínio de *S. typhimurium* foi observado com o aumento de outros sorotipos, destacando-se *S. agona* como o segundo mais prevalente.

Segundo GOMES et alii (1991) depois da *Escherichia coli* e do rotavírus as salmonelas são a terceira maior causa de diarreia em crianças no estado de São Paulo. Dados semelhantes também foram observados, a partir do estudo com amostras de pacientes hospitalizados, por DE ANDRADE et alii (1998) e PALMA et alii (1997) diferindo apenas quanto a ordem de prevalência dos patógenos, o primeiro ainda classificando a *Salmonella* como a terceira maior causa, porém seguida da *Shigella*, e o segundo como proporcionalmente ao rotavírus.

De modo geral a presença de *Salmonella* na população humana e animal desperta o interesse para a sua pesquisa e o seu monitoramento, uma vez que a contaminação por fezes de hospedeiros infectados ou outras fontes do meio ambiente pode colocar em risco a saúde destas populações dada a intrincada cadeia de disseminação deste patógeno por diversas fontes.

2.2.1. Surtos de Veiculação Hídrica

A décadas a citação da pesquisa de *Salmonella* em amostras humanas e ambientais vêm sendo realizadas para elucidação da complexa rede de transmissão deste agente. Infecções por *Salmonella* são prevalentemente descritas como de veiculação alimentar (MOHLE-BOETANI et alii, 1999; TREPKA et alii, 1999), entretanto a literatura já evidenciou que a sua propagação também pode se desenvolver através de águas de recreação, consumo humano, irrigação de hortaliças, dessedentação de animais ou ainda as utilizadas para o preparo de alimentos, especialmente quando expostas a contaminação por esgotos (FEACHEM et alii, 1983; SOUZA, 1984; JONES & WATKINS, 1985; EVISON, 1985).

Segundo Edwards, apud SANCHEZ (1988) surtos de veiculação hídrica por *Salmonella* são descritos desde 1920 na América do Norte, Grã-Bretanha e em vários países Europeus.

SATHE et alii (1983) descreveram a eclosão de uma epidemia de febre tifóide ocorrida na cidade de Sangli na Índia, no período de 1975 a 1976. Os autores relatam que a contaminação da água do reservatório público com água de esgoto foi responsável pela explosiva epidemia, que atingiu 9 mil pessoas num período de 12 semanas.

MCGINNIS & DE WALLE (1983) confirmaram, o consumo de águas de poços contaminadas por *Salmonella*, como causa da epidemia de febre tifóide ocorrida em 1972 na cidade de Yakima, no estado de Washington nos Estados Unidos além de outros 11 surtos de febre tifóide similares. Realizando também estudos em diversos tipos de solo concluiu que distâncias menores que 30 metros entre a fossa séptica e o poço não foram o suficiente para evitar a infiltração na água subterrânea levando a contaminação das mesmas, sugerindo deste modo uma série de medidas para a proteção destas águas .

FEACHEM et alii (1983) em um trabalho de revisão sobre a epidemiologia das salmonelas, relataram uma série de doenças de veiculação hídrica e enfatizaram que as implicações com águas de abastecimento como causa da doença são usualmente circunstanciais, considerando que as epidemias são frequentemente

temporárias ou intermitentes. Relataram ainda que as doenças de veiculação hídrica, devido a contaminação cruzada com esgotos, são de caráter explosivo e aparecem inesperadamente, durando poucos dias, mas com sérias repercussões.

No Território de Sanidad de Alava, Vitoria, uma epidemia de veiculação hídrica de *S. ohio* foi notificada atingindo 59 pessoas, incluindo 56 crianças e 3 adultos (MOLINERO et alii, 1998).

Em São Paulo, segundo a Divisão Hídrica do Centro de Vigilância Epidemiológica, 92 manifestações epidêmicas de diarreia ocorreram neste estado nos anos de 1996 e 1997, sendo a *Salmonella* associada a 29 ocorrências (31,5% do total), sendo 17 por *Salmonella* sp e 12 por *Salmonella enteritidis* com aproximadamente 330 casos da doença confirmados. Entre as localidades onde foram observados surtos de salmonelose destacam-se: a Capital do Estado e os municípios de Mogi das Cruzes, Osasco, Araçatuba, Araraquara, Franca, Marília, Piracicaba, Presidente Prudente, São João da Boa Vista, São José dos Campos, São José do Rio Preto e Sorocaba ⁷.

Durante o período de 1977 a 1981 o Chile esteve envolvido em uma epidemia de febre tifóide originada provavelmente pelo consumo de alimentos contaminados por vendedores de rua e águas contaminadas utilizadas para irrigação de lavouras. As principais áreas afetadas foram a capital, Santiago, e suas localidades vizinhas com o aumento abrupto do índice de morbidade por 100 mil habitantes de 57,6 em 1949 e 1976 para 120, 8 em 1978 (FICA et alii, 1996).

Em 1993 uma grande epidemia causada por *Salmonella typhimurium* pelo consumo de águas oriundas do sistema de abastecimento público foi constatada em Gideon, Mo, uma cidade com 1.100 habitantes e cujo tratamento não recebe cloração. Como o número de indivíduos afetados eram iguais ou cresciam proporcionalmente ao consumo das águas pela população, medidas de segurança, como a fervura destas águas diminuíram os riscos de infecção, porém mais de 650 pessoas ficaram doentes, 15 foram hospitalizadas e 7 morreram (ANGULO et alii, 1997).

Na Espanha foram descritos epidemias por sorotipos de *Salmonella* por PAC SA et alii (1998) em uma área rural de Castellon, gerada pelo consumo de águas de

um aqueduto local, destinadas ao consumo e irrigação de hortaliças na região, por *Salmonella richmond* e USERA et alii (1995) de febre tifóide pelo consumo de águas de uma fonte da Catalonia.

Nos Estados Unidos, de 1993 a 1994 segundo o boletim de vigilância para doenças de veiculação hídrica ocorreram 30 epidemias associadas ao consumo de águas atingindo 405.336 pessoas. Embora a maior parte de indivíduos infectados tenham sido por *Cryptosporidium parvum*, em Milwaukee, também foram descritos surtos por *Campylobacter jejuni*, *Shigella soonei*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholera* não O1 e finalmente um surto com 7 mortes por *S. thyphimurium* (KRAMER et alii, 1996a).

2.2.2. Ocorrência de *Salmonella* spp em Águas e Esgoto

As salmonelas têm sido frequentemente isoladas em diferentes amostras de águas de rios, lagos, águas tratadas, de esgotos, recreacionais e águas de irrigações, e as implicações e riscos à saúde do homem e animais quando em contato com as mesmas vão depender da natureza e número de patógenos excretados por estas populações, da capacidade dos mesmos sobreviverem e multiplicarem-se no ambiente, do tratamento aplicado às águas e lodos de esgotos, dos tipos de resíduos industriais presentes e de vários fatores demográficos, geográficos e climatológicos (FEACHEM et alii, 1983; PIKE, 1986; SHUVAL et alii, 1986).

A capacidade de sobrevivência das salmonelas por longos períodos de tempo no meio aquático, aliado a característica dinâmica desse ecossistema, são fatores importantes a serem considerados na sua cadeia epidemiológica, uma vez que estas bactérias podem ser transportadas a longas distâncias e atingir direta ou indiretamente o homem através das mais variadas vias (WRAY & SOJKA, 1977; WHO, 1980; AKIN, 1983; JONES & WATKINS, 1985).

A avaliação do significado das diferentes rotas que se interrelacionam na transmissão e disseminação das salmoneloses é imprescindível para localizar os

⁷ Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac- Divisão Hídrica. Relatório final

principais fatores de riscos para a adoção de medidas de controle visando a sua interrupção, redução ou erradicação como causa de doenças (SANCHEZ, 1988).

A ocorrência de *Salmonella* em águas superficiais são geralmente relatadas pela contaminação cruzada com águas de esgoto ou por descartes de material fecal nas mesmas. Um exemplo para confirmação desta afirmação é dado pelos estudos conduzidos, na região costeira de Fortaleza, no estado do Ceará nos meses de Junho, Setembro e Dezembro de 1993 e Março de 1994, em que foram observados maiores isolamentos de *Salmonella* nas áreas que recebiam a influência direta de esgotos, e em menor número nas áreas que sofriam influência indireta dos mesmos (MELO et alii, 1997), e também na Bolívia, fazendo-se uma amostragem das águas de um rio altamente poluído, o La Paz, próximas as áreas mais ou menos populosas que o margeiam aonde foram observadas a contaminação por diversos tipos de microrganismos patogênicos *E. coli* enteropatogênicas, enteroinvasivas e três *Salmonella* do grupo O4 (OHNO et alii, 1997).

A ocorrência de *Salmonella* em diferentes amostras de águas pode ser observada em vários países.

Em 128 amostras de águas coletadas de 4 rios e um lago na Grécia, a presença de *Salmonella* foi na ordem de 6,2% (ARVANITIDOU et alii, 1997).

No Brasil, em Belém a presença de *Salmonella* no meio ambiente foi constatada a partir do isolamento de 62 cepas em amostras de águas de esgoto, de 38 águas de rios e 31 de igarapés (FARIAS, 1997). LOUREIRO (1990) também isolou 43 cepas de *Salmonella* em águas de esgoto com 21 sorotipos diferentes com padrões semelhantes ao de coproculturas isoladas na mesma época do estudo na população humana.

No estado de São Paulo e cidade de Santos a partir do estudo onde foram examinadas 894 amostras de águas de esgotos, do mar e doces, para determinação do significado sanitário deste enteropatógeno, foram isoladas 5.430 cepas de *Salmonella* observando-se a contribuição humana para o meio ambiente uma vez que os sorogrupos e sorotipos de *Salmonella*, com exceção de *S. agona*, apresentaram padrão similar aos obtidos em coproculturas. Nas águas de esgoto provenientes de

hospitais predominou o sorotipo *S. typhimurium* var. 0:5- que também foi o mais frequentemente isolado de coproculturas. A influência da contaminação por esgotos foi também observada em águas de mananciais e nas praias mais poluídas pela presença dos mesmos sorotipos observados em esgotos (MARTINS et alii, 1988).

A vigilância da poluição por *Salmonella* dos recursos hídricos especialmente as que podem vir a ser utilizadas para o abastecimento público também têm gerado programas de monitoramento para esta bactéria. A partir de um programa realizado por 10 anos em águas brutas de nove estações de tratamento de água da Grande São Paulo, foi relatado que 30,6% de 904 amostras apresentaram positividade para *Salmonella* (MARTINS et alii, 1986).

As águas de esgoto provenientes das mais variadas atividades humanas têm desempenhado importante papel na disseminação deste microrganismo patogênico, especialmente em países em desenvolvimento, devido as péssimas condições de saneamento a que grande parte da população de baixo nível sócio-econômico está exposta e pela precariedade dos sistemas de tratamento de águas residuárias existentes em muitas regiões podendo se constituir em risco à saúde da população (FEACHEM et alii, 1983; SHUVAL et alii, 1986).

A ocorrência em águas de esgoto não é de surpreender, considerando-se o grande número excretado nas fezes humanas e de animais. Estima-se que 1% da população humana excreta ou excretou este microrganismo em algum período, além da grande contribuição de fezes de animais domésticos nos esgotos urbanos (FEACHEM et alii, 1983; MORSE & DUNCAN, 1976; WRAY & SOJKA, 1977; JONES & WATKINS, 1985). A pesquisa de salmonelas nestas águas é de grande importância do ponto de vista epidemiológico, constituindo-se em um excelente instrumento para verificar a ocorrência e circulação desse patógeno na comunidade (MARTINS et alii, 1988).

As salmonelas de origem humana e/ ou animal têm sido frequentemente isoladas em águas de esgoto tratadas ou não, segundo relatos em diferentes países como Grã-Bretanha (WILSON & BLAIR, 1927), Argentina (FERRAMOLA et alii, 1943), Estados Unidos (BREZENSKI et alii, 1965), França (LECLERC et alii, 1970) e Brasil (MARTINS 1979; SANCHEZ 1988). No Canadá, KINDE et alii (1997)

demonstraram a positividade para *Salmonella* em 8 de 12 estações de tratamento de esgotos estudadas, mesmo após o tratamento do mesmo, bem como nos seus efluentes. Sua densidade nestas águas pode variar consideravelmente de região a região. Embora concentrações de 10^3 a 10^4 / 100 mL tenham sido detectadas (GELDREICH, 1968), também podem estar ausentes dependendo do tipo de tratamento aplicado ou da presença de substâncias tóxicas (RIVERA & MARTINS, 1996).

SANCHEZ (1988) confirmou a presença desta bactéria na quase totalidade das amostras de águas de esgoto provenientes dos sistemas coletores do município de São Paulo e afirmou que estas, em especial as geradas por hospitais ou Instituições de Saúde, constituem-se em importantes fontes de disseminação de *Salmonella* multiresistente no meio aquático e na comunidade.

Levando-se em consideração que no nosso país grande parte das águas de esgoto provenientes das populações em geral (humana e animal), bem como resíduos líquidos infecciosos gerados por Instituições de Saúde não recebem tratamento adequado antes de serem lançados nos corpos d'água e oceanos, a pesquisa de salmonelas em águas de esgoto é de grande importância do ponto de vista epidemiológico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização da Região de Amostragem

O Estado de São Paulo, de acordo com a companhia responsável pelo saneamento neste estado, SABESP, tinha em 1996, todas as suas 625 sedes municipais dotadas de sistemas de abastecimento e cerca de 90,03% da população total do estado correspondendo a 30.675.803 habitantes, atendidos. Neste ano, tinham acesso ao fornecimento de água um total de 1.096 localidades, incluindo sedes municipais e vilas. Quanto ao esgotamento sanitário, o atendimento no estado alcançava 611 de suas 625 sedes municipais, beneficiando 22.465.038 pessoas, correspondendo a 65,93% da população total (CABES, 1999).

Com 9.646.185 habitantes até 1996, segundo o censo de 1991 da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE, o município de São Paulo, um dos maiores centros industriais brasileiros, beneficiava 8.632 mil habitantes com esgotamento sanitário, através de sua rede coletora de 1.777 mil ligações e 15.692 Km de extensão, coletando um volume de 2.093 mil m³/dia de águas de esgoto. Nas 5 Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) ativas apenas 499 mil m³/dia dos volumes coletados eram tratados, sendo o restante lançado sem tratamento prévio nas bacias hidrográficas da região (CABES, 1999).

Planos de médio e longo prazo de execução neste município, como o Projeto Tietê, que entre outras coisas visa a construção de novas redes coletoras para o direcionamento das águas de esgoto de estações elevatórias para as estações de tratamento dos mesmos, bem como a recuperação das águas dos principais rios e afluentes da bacia hidrográfica do Alto Tietê (Tiête, Pinheiros, Tamanduateí, Juqueri e Cotia), foram criados e estão em fase de desenvolvimento para a conservação e proteção destas águas proporcionando o múltiplo uso dos seus recursos e garantindo a proteção dos mananciais de abastecimento de água atuais e futuros, uma vez que esta unidade encontra-se seriamente comprometida e se constitui como a principal

exportadora da poluição urbana e industrial para outras unidades hidrográficas deste Estado.

Embora as áreas de mananciais destinadas ao abastecimento público sejam mantidas em regiões de proteção ambiental, é fato comprovado pela descrição de numerosos casos na literatura que a circulação de águas poluídas podem, por algum tipo de acidente, acabar levando a contaminação destes recursos com riscos a saúde da população.

A seleção dos locais de amostragem para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp conforme a metodologia proposta (Figura 2), foram feitos em dois pontos onde estudos anteriores foram realizados para a pesquisa de outros tipos de agentes e cujas águas provém de populações de baixa renda e portanto sujeitas a maiores índices de infecções por microrganismos patogênicos.

Figura 2. Fluxograma para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp em amostras de águas de esgoto e águas de córrego da cidade de São Paulo.

3.1.1. Pontos de amostragem

3.1.1.1. Estação Elevatória de Esgoto (E.E.E.) Parque Edu Chaves

Estações Elevatórias de Esgotos, segundo a NB-569 da Associação Brasileira de Normas Técnicas/ABNT, são instalações que se destinam ao transporte de esgotos em uma situação em que não é possível fazer com que o mesmo escoe em conduto livre e por gravidade de um ponto para outro, sendo nesta situação necessário o bombeamento do mesmo utilizando-se bombas centrífugas, direcionando-o, de um modo geral, para uma estação de tratamento de esgotos.

A estação elevatória de esgoto (E.E.E.) “Parque Edu Chaves” recebe águas de esgoto de aproximadamente 236 mil pessoas, residentes nos bairros Vila Constança, Jardim Brasil, Parque Edu Chaves, Cidade Brasil, Vila São Rafael, Jardim Modelo, Vila Nivi, e uma grande parcela das vilas Santa Teresinha e Alegria e do Jardim Neila, dos distritos Jaçanã e Vila Medeiros da região Norte da cidade de São Paulo, lançando-os sem tratamento, no córrego Cabuçu de Cima que transporta estas águas para o Rio Tietê (Figuras 3, 3.1 e 5).

3.1.1.2. Córrego Pirajussara

O córrego “Pirajussara” recebe águas de esgoto ao longo do seu percurso ao atravessar o município de Taboão da Serra e alguns bairros dos distritos Vila Sônia e Butantã da região Oeste da cidade de São Paulo como o Jardim Jussara, Jardim Trussardi, Jardim Ademar, Jardim Peri-Peri e Instituto da Previdência até desembocar no Rio Pinheiros (Figuras 4, 4.1 e 5).

3.2. Amostras

Foram coletadas, de Julho a Dezembro de 1998, doze amostras de águas de esgoto doméstico “*in natura*” no efluente da estação elevatória de esgoto (E.E.E.) Parque Edu Chaves e doze amostras de águas do córrego Pirajussara próximo ao seu local de desembocadura no rio Pinheiros, respectivamente, a cada quinze dias, totalizando 24 amostras.

Figura 3. Estação Elevatória de Esgoto Parque Edu Chaves - Ponto de Elevação do esgoto por bombeamento

Figura 3.1. Efluente da E. E. E. Parque Edu Chaves - Local de coleta

Figura 4. Córrego Pirajussara – No distrito do Butantã, próximo a sua desembocadura no rio Pinheiros

Figura 4.1. Poluição às margens do Córrego Pirajussara

Figura 5. Localização dos pontos de amostragem no Município de São Paulo

3.3. Amostragem

As amostras foram coletadas com auxílio de balde e cordel previamente desinfetados com uma solução de hipoclorito de sódio a 10% e colocadas em frascos plásticos estéreis de polipropileno e transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Microbiologia Ambiental/ ICB-USP.

A cada 100mL da amostra foram adicionados 0,3 mL de uma solução de EDTA a 15% para inativação de metais pesados.

3.3.1. Para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp

Foram coletados volumes totais de 9L em cada ponto de amostragem, sendo 5L necessários para a metodologia de “Floculação e Precipitação do Carbonato de Cálcio” e 2L para a “Técnica da Dissolução da Membrana Filtrante” para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e volumes de 2L para pesquisa de *Salmonella* spp.

3.3.2. Para determinação de Coliformes Totais e *E. coli*

Para determinação de Coliformes Totais e *E. coli* foram coletadas volumes de 100mL, 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).

3.4. Procedimentos Analíticos para Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

3.4.1 Métodos de Concentração

Para concentração das amostras foram realizadas as técnicas de “Floculação e Precipitação do Carbonato de Cálcio (CaCO_3)” (VESEY et alii, 1993a) e a “Técnica da Dissolução da Membrana Filtrante” (ALDOM & CHAGLA, 1995).

3.4.1.1. Técnica da Floculação e Precipitação do Carbonato de Cálcio (CaCO_3)

Após o transporte, cada 5L de amostra foram transferidos para frascos de vidro de 10L (SHOTT) sendo adicionado, 50 mL de Cloreto de Cálcio 1M e 50 mL de Bicarbonato de Sódio 1M. A amostra teve o pH ajustado para 10 com Hidróxido de Sódio 5 N e foi mantida em repouso por 4h em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e descartado e o precipitado dissolvido em 100 mL de Ácido Sulfâmico 10% com posterior transferência deste volume para um tubo de centrifuga de 500 mL. Após a centrifugação a 3000 g por 15' a 10°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento transferido para um tubo de centrifuga de 50 mL. As amostras foram novamente centrifugadas a 3000 g por 15' a 10°C, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensão em solução eluente (Tween 80, 1%, SDS 1%, PBS 10X) resultando um volume final de 5 mL, a ser submetido posteriormente à análise por imunofluorescência (IF).

A cada estágio de transferência do sedimento entre os tubos de centrífuga, foram realizadas lavagens com uma solução de Tween 80 a 0,01% de modo a diminuir as perdas de material que poderiam permanecer aderidos à parede dos mesmos.

3.4.1.2. Técnica da Dissolução da Membrana Filtrante

Dois litros de amostra, foram filtrados através de uma membrana de acetato de celulose (Millipore) de 142mm de diâmetro e 1,2 μm de porosidade utilizando-se um sistema de filtração constituído de bomba de pressão positiva, vasilhame de pressão e porta filtro de aço inoxidável estéril (Millipore). Após a filtração, a membrana foi transferida para um saco de polipropileno estéril e a esta foi adicionado 200 mL de Acetona homogeneizando-se este material por 15' (Stomacher 400 Lab Blender-Seward). Após a homogeneização este material foi transferido para tubos de centrifuga de 500 mL e centrifugado a 650 g por 15' a 10°C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensão e centrifugado a 650 g por 15' a 10°C sucessivamente com 200 mL de Acetona, 200 mL de Etanol 95%, 200 mL de Etanol 70% e 200 mL de Solução Eluente. O sedimento final foi ressuspensão em solução eluente resultando um volume de 5mL a ser submetido posteriormente à análise por imunofluorescência (IF).

3.4.2. Detecção dos oocistos

A detecção dos oocistos de *Cryptosporidium* spp foi feita a partir da técnica de imunofluorescência (IF) utilizando-se o Kit de Imunofluorescência Direta – Merifluor® *Cryptosporidium/ Giardia* Direct Imunofluorescent Detection da Meridian Diagnostics, Inc/ USA.

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 das amostras previamente concentradas, assim como 10 µL dos controles positivo e negativo nos respectivos poços das lâminas. Estes volumes foram distribuídos uniformemente com auxílio de alças descartáveis e após a secagem à temperatura ambiente, estas foram fixadas com 5 µL de metanol.

Adicionou-se à cada amostra uma gota do reagente de detecção contendo anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* marcados com FITC e uma gota de reagente contra-corante. As lâminas foram mantidas abrigadas da luz em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 35 °C. Posteriormente, o excesso dos reagentes foi retirado com solução de lavagem 1X concentrada, colocando-se por fim, 1 gota de meio de montagem (solução tampão contendo glicerol, formalina e antiqúedante) em cada poço da lâmina e cobriu-se com lamínula, vedando com esmalte.

Os oocistos foram observados nos aumentos de 200X, 400X e 1000X e quantificados com o auxílio de microscópio de epifluorescência (DAS Leica DM LB®/ Germany).

Após a realização da IF o restante dos concentrados das amostras, foram mantidos em tampão formalina 10% a 4°C.

A confirmação da presença dos oocistos foi realizada pela observação da morfologia dos mesmos por contraste de fase.

3.4.3. Contagem dos oocistos

A determinação do número de oocistos de *Cryptosporidium* spp foi feita pela contagem dos mesmos durante a leitura das lâminas de IF. A estimativa do número de oocistos/L presente nas amostras foi calculada a partir das seguintes fórmulas:

$$\text{Nº de oocistos detectados/ lâmina} \times \frac{\text{volume utilizado/ lâmina}}{\text{volume total do sedimento}}$$

$$X = \text{nº de oocistos detectados na amostra}$$

$$X \times \frac{\text{volume total da amostra coletada}}{\text{volume em 1L de amostra}}$$

$$X = \text{nº de oocistos de } \textit{Cryptosporidium} \text{ spp/ litro de amostra}$$

3.4.4. Controle negativo

Como controle negativo das metodologias empregadas neste estudo, as etapas descritas nos itens 3.4.1.1, 3.4.1.2, 3.4.2 e 3.4.3 foram feitas utilizando-se como amostra água destilada estéril.

3.4.5. Sensibilidade da metodologia

A sensibilidade das metodologias de concentração empregadas foi avaliada a partir da recuperação de oocistos purificados (controle positivo do Kit de Imunofluorescência direta – Merifluor® *Cryptosporidium/ Giardia* Direct Immunofluorescent Detection da Meridian Diagnostics, Inc/ USA) inoculados em 1L de água destilada nas concentrações $10^4, 10^3, 10^2$, seguida da realização das etapas descritas nos itens 3.4.1.1, 3.4.1.2, 3.4.2 e 3.4.3.

3.5. Pesquisa de *Salmonella* spp

3.5.1. Concentração das Amostras

Volumes de 2L provenientes de cada ponto de amostragem foram filtrados através de membranas de éster de celulose (Millipore) com 142 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade, utilizando-se um sistema de filtração constituído de bomba de pressão positiva, vasilhame de pressão e porta filtro de aço inoxidável estéril (Millipore) (MARTINS, 1979).

3.5.2. Enriquecimento das Amostras

Após a filtração as membranas foram divididas ao meio e colocadas nos meios de enriquecimento, caldo Selenito (DIFCO) acrescido de 0.04g/ litro de Novobiocina (PESSOA & PEIXOTO, 1971) que foi incubado a 42,5°C durante 24-48 e 120 horas, e no caldo Rappaport-Vassiliadis (OXOID) (VASSILIADIS, 1983) que foi incubado a 35°C durante 24-48 horas.

3.5.3. Isolamento

Após o período de enriquecimento procedeu-se o isolamento das colônias de *Salmonella* utilizando-se os seguintes meios de cultura seletivos e diferenciais: ágar Verde Brilhante (BG; DIFCO), ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD; OXOID) e ágar Sulfito de Bismuto (BS; OXOID). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e após o período de incubação foram selecionadas colônias típicas para *Salmonella*, de acordo com as seguintes características: ágar Verde Brilhante (BG): colônias de coloração rosa a vermelha, ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD): colônias vermelhas com ou sem centro negro, ágar Sulfito de Bismuto (BS): colônias negras, verde escuras ou verde claras, com ou sem brilho metálico.

3.5.4. Identificação Presuntiva

Foram isoladas de cada placa, até 5 colônias típicas, que foram inoculadas em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI; DIFCO) (LOUREIRO, 1990) e incubadas a 35°C por 24 horas. Todas as culturas que apresentaram reações positivas para as provas de fermentação da glicose, produção de gás e H₂S, foram transferidas para o ágar Trypticase Soja (TSA; DIFCO) e incubadas a 35°C por 24 horas.

3.5.5. Identificação Bioquímica

Todos os isolados mantidos em ágar TSA foram submetidos a identificação bioquímica pelo sistema API20E (bioMérieux S.A./ France).

A identificação de um organismo neste sistema é feita a partir da realização de 20 testes bioquímicos, Beta-galactosidase (ONPG), Arginina diidrolase (ADH), Lisina descarboxilase (LDC), Ornitina descarboxilase (ODC), Citrato de Simmons (CIT), formação de H₂S (H₂S), Urease (URE), Triptofano desaminase (TDA), Indol (IND), Voges-Proskauer (VP), hidrólise de Gelatina (GEL), Glucose (GLU), Manitol (MAN), Inositol (INO), Sorbitol (SOR), Ramnose (RHA), Sacarose (SAC), Melibiose (MEL), Amigdalina (AMY) e Arabinose (ARA) com posterior interpretação dos resultados realizada a partir do manual do fabricante.

3.5.6. Sorologia

As culturas que apresentaram leitura positiva para o gênero *Salmonella* no sistema API20E, foram testadas frente aos antissoros polivalentes somático (“O”) e flagelar (“H”) (Probac) segundo metodologia recomendada por KAUFFMANN (1972) e LeMINOR & ROHDE (1982), sendo a leitura realizada através da técnica de soroaglutinação rápida, adaptada à caixa de Huddleson. As cepas que apresentaram soroaglutinação positiva foram encaminhadas em ágar TSA à Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/ RJ) para posterior sorotipagem.

3.6. Determinação de Coliformes Totais e *E.coli*.

A determinação de coliformes totais e *E. coli* foi feita conforme a “Técnica dos Tubos Múltiplos” empregando substrato cromogênico e fluorogênico (Colilert 18, IDEXX/ USA) segundo “Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater 19th ed.” (APHA, 1995).

3.7. Análise Estatística dos Resultados

Para avaliação da eficiência de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp entre as duas metodologias de concentração empregadas, precipitação do carbonato de cálcio e técnica de dissolução da membrana filtrante, os resultados obtidos foram avaliados para determinação do nível de significância a partir da média geométrica de oocistos detectados.

4. RESULTADOS

4.1. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp nas amostras de águas de esgoto e águas de córrego.

Os resultados referentes as análises das 12 amostras das águas de esgoto da EEE e 12 amostras das águas do córrego Pirajussara para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp, realizadas no período de Julho a Dezembro de 1998, estão apresentados na Figura 6 e Tabela 2.

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp foram detectados em 100% do total das amostras analisadas. Para as águas de esgoto da EEE o número de oocistos detectados variou de 0 a 1.200 oocistos/L. Enquanto para as águas do córrego variou de 0 a 1.400 oocistos/L (Tabela 2).

Figura 6. Média do número de oocistos/L detectados em águas de esgoto e águas de córrego de Julho a Dezembro de 1998 na Cidade de São Paulo.

4.1.1. Imunofluorescência direta (IF) e Microscopia de Contraste de fase

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp detectados por IF apresentaram-se de forma arredonda ou ligeiramente ovalada, de coloração verde devido a fluoresceína com brilho periférico e parede definida (Figura 7), em contraste com outras partículas observadas no campo com forma, tamanho, cor, brilho e colorações diferenciadas geralmente avermelhadas. A microscopia de contraste de fase permitiu a confirmação dos oocistos pela visualização da parede e eventualmente de estruturas internas dos mesmos (Figura 8).

Figura 7. Oocisto de *Cryptosporidium* spp por Imunofluorescência (1000X).

Figura 8. Oocisto de *Cryptosporidium* spp por Microcopia de Contraste de Fase (1000X).

4.1.2. Técnica de Flocculação por Carbonato de Cálcio e Dissolução da Membrana filtrante como metodologias de concentração

A densidade mínima de oocistos detectados para as metodologias de concentração empregadas foram: pela técnica de concentração por flocculação e precipitação por Carbonato de Cálcio de 60 oocistos/L, e para concentração por Membrana Filtrante 50 oocistos/L nas águas da EEE. Enquanto para as águas do córrego foram respectivamente de 48 e 50 oocistos/L (Tabela 2).

Tabela 2. Número de oocistos de *Cryptosporidium* spp obtidos nas amostras de águas de esgoto da EEE “Parque Edu Chaves” e águas do córrego “Pirajussara” através das metodologias de “Floculação e Precipitação por CaCO_3 ” e “Membrana Filtrante” realizadas de Julho a Dezembro de 1998.

Data da coleta	Nº de oocistos/L detectados			
	EEE Parque Edu Chaves		Córrego Pirajussara	
	Membrana Filtrante	Floculação e precipitação por CaCO_3	Membrana Filtrante	Floculação e precipitação por CaCO_3
01/07/98	150	360	480	240
15/07/98	1200	544	300	200
29/07/98	500	680	600	160
26/08/98	280	528	150	900
09/09/98	200	440	300	300
23/09/98	1200	352	1400	120
07/10/98	1200	624	1000	300
21/10/98	160	0	150	340
04/11/98	150	240	1000	48
18/11/98	500	60	0	240
02/12/98	50	340	50	80
15/12/98	150	80	150	320

4.1.3. Análise Estatística dos Resultados

Testes estatísticos foram utilizados para comparar a eficiência de detecção de oocistos entre os métodos de concentração empregados. As médias geométricas do número de oocistos obtidos para cada metodologia nos dois diferentes locais de coleta foram analisadas e mostraram que os métodos não diferiram entre si apresentando um nível de significância de até 5% (Tabela 3).

4.1.4. Controle negativo

No controle negativo para as metodologias empregando como amostra água destilada estéril, não foram observados oocistos de *Cryptosporidium*.

Tabela 3. Nível de significância (P) para as metodologias de Floculação e Precipitação por CaCO_3 e Membrana Filtrante a partir da média aritmética do número de oocistos de *Cryptosporidium* spp detectados em amostras de águas de esgoto e córrego.

Método de Concentração	Média de oocistos/L	
	EEE “Parque Edu Chaves”	Córrego “Pirajussara”
CaCO_3	354	270,67
Membrana filtrante	478,33	465
Valor de P	0,405	0,190

4.1.5. Sensibilidade das metodologias

Na análise para determinação da sensibilidade das metodologias empregadas a partir da inoculação de oocistos de *Cryptosporidium* spp purificados em diferentes concentrações (10^4 , 10^3 , 10^2) em água destilada estéril, foi observado que o processo de filtração conseguiu detectar 22% para a menor concentração dos oocistos inoculados (1×10^2), enquanto o processo por precipitação com CaCO_3 detectou 23%. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem de recuperação de oocistos inoculados em diferentes concentrações em água destilada para determinação da sensibilidade das metodologias

Amostra	Método	Concentração de oocistos		
		1×10^4	1×10^3	1×10^2
Água destilada	Filtração	69,2%	42,%	22%
	CaCO_3	71,8%	39%	23%

4.2. Pesquisa de *Salmonella* spp em amostras de águas de esgoto da EEE Parque Edu Chaves e águas do córrego Pirajussara

4.2.1. Pesquisa e Isolamento

Os resultados referentes à pesquisa de *Salmonella* a partir das 12 amostras das águas de esgoto da EEE e 12 amostras das águas do córrego Pirajussara, realizadas no período de Julho a Dezembro de 1998, resultou no isolamento de 221 cepas de *Salmonella*.

As 12 amostras de águas de esgoto e córrego coletadas (100%) revelaram-se positivas quanto a presença de *Salmonella*.

4.2.2. Sorotipos de Maior Frequência

Foram isoladas 73 e 148 de cepas de *Salmonella* na EEE e no córrego, respectivamente, englobando 19 sorotipos identificados e 1 *Salmonella* sp. A frequência e a distribuição dos sorotipos isolados estão demonstrados na Tabela 5.

Na EEE os sorotipos mais frequentes de *Salmonella* foram: *S. panama* (26%), *S. agona* (19%), *S. Hadar* (16%), *S. braenderup* (11%) e *S. othmarschen* (8%), *S. infantis* (7%) e *S. derby* (3%), os demais sorotipos corresponderam ao percentual de 10% (Tabela 5 e Figura 9). No córrego os sorotipos mais frequentes foram: *S. panama* (28%), *S. infantis* (18%), *S. onakam* (11%), *S. agona* (8%), *S. hadar* (7%), *S. mbandaka* (5%), *S. indiana* (5%), *S. give* (4%), *S. derby* (4%) e os demais sorotipos corresponderam à 10% (Tabela 5 e Figura 10).

Tabela 5. Frequência de sorotipos de *Salmonella* isolados de amostras de águas de esgoto da EEE Parque Edu Chaves e águas do córrego Pirajussara da cidade de São Paulo- Julho a Dezembro 1998.

Sorotipos	Nº e (%) de isolamentos		total	
	EEE Parque Edu Chaves	Córrego Pirajussara	Nº	%
<i>S. panama</i>	19 (26%)	40 (28%)	59	26,7
<i>S. infantis</i>	5 (7%)	27 (18%)	32	14,5
<i>S. agona</i>	14 (19%)	12 (8%)	26	11,8
<i>S. hadar</i>	12 (16%)	10 (7%)	22	9,9
<i>S. onakam</i>	-	16 (11%)	16	7,2
<i>S. othmarschen</i>	6 (8%)	4 (2,7%)	10	4,5
<i>S. braenderup</i>	8 (11%)	2 (1,4%)	10	4,5
<i>S. mbandaka</i>	-	8 (5%)	8	3,6
<i>S. indiana</i>	-	8 (5%)	8	3,6
<i>S. derby</i>	2 (3%)	6 (4%)	8	3,6
<i>S. give</i>	-	6 (4%)	6	2,7
<i>Salmonella sp</i> (4,5:d:-)	5 (7%)	-	5	2,3
<i>S. bredeney</i>	-	3 (2%)	3	1,4
<i>S. montevideo</i>	-	2 (1,4%)	2	0,9
<i>S. saintpaul</i>	-	1 (0,7%)	1	0,5
<i>S. typhimurium</i>	1 (1,5%)	-	1	0,5
<i>S. newport</i>	-	1 (0,7%)	1	0,5
<i>S. bovismorbificans</i>	-	1 (0,7%)	1	0,5
<i>S. enteritidis</i>	1 (1,5%)	-	1	0,5
<i>S. havana</i>	-	1 (0,7%)	1	0,5
	73	148	221

Figura 9. Distribuição percentual dos sorotipos de *Salmonella* predominantes em 73 cepas isoladas das águas de esgoto da E.E.E. Parque Edu Chaves.

Figura 10. Distribuição percentual dos sorotipos de *Salmonella* predominantes em 148 cepas isoladas das águas do córrego Pirajussara.

4.3. Determinação de Coliformes Totais e *E. coli*

Na tabela 6 estão apresentados os resultados para a caracterização dos pontos de amostragem quanto ao nível de contaminação fecal.

Tabela 6. Determinação do número mais provável por 100 mL (NMP/100 mL) de Coliformes Totais e *E. coli* para as águas de esgoto da EEE “Parque Edu Chaves” e águas do córrego Pirajussara realizada de Julho a Dezembro de 1998

Data da coleta	EEE Parque Edu Chaves		Córrego Pirajussara	
	Coliformes totais NMP/ 100 mL	<i>E. coli</i> NMP/ 100 mL	Coliformes totais NMP/ 100 mL	<i>E. coli</i> NMP/ 100 mL
01/07/98	3×10^7	5×10^6	1.7×10^7	1.7×10^6
15/07/98	9×10^7	1.7×10^7	5×10^7	5×10^6
29/07/98	3×10^7	2.7×10^6	5×10^7	3×10^6
26/08/98	1.6×10^8	2.4×10^7	1.6×10^8	2.2×10^7
09/09/98	1.4×10^7	3×10^6	5×10^6	1.3×10^6
23/09/98	5×10^7	8×10^6	2.4×10^7	3×10^6
07/10/98	1.3×10^7	5×10^6	2.3×10^6	8×10^5
21/10/98	8×10^6	3×10^6	1.3×10^7	3×10^6
04/11/98	3×10^7	1.4×10^6	5×10^7	5×10^6
18/11/98	2.4×10^7	8×10^6	5×10^7	5×10^6
02/12/98	1.7×10^7	3×10^6	3×10^7	8×10^6
15/12/98	3×10^7	8×10^6	5×10^7	8×10^6

5. DISCUSSÃO

5.1. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp nas amostras de águas de esgoto e córrego.

Neste estudo, oocistos de *Cryptosporidium* spp foram pesquisados em 12 amostras de águas de esgoto coletadas no efluente da “Estação Elevatória de Esgoto Parque Edu Chaves” e em 12 amostras de águas do córrego “Pirajussara” coletadas próximo ao seu local de desembocadura no Rio Pinheiros e foram detectados em 100% das mesmas (Figura 6). As densidades de oocistos encontradas nas águas de esgoto variaram de 0 a 1.200 oocistos por litro, enquanto nas águas de córrego de 0 a 1.400 oocistos por litro (Tabela 2).

MADORE et alii (1987) ao avaliarem a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em águas de esgotos, verificaram densidades mais elevadas que as observadas neste estudo, pois detectaram 13.700 oocistos por litro em efluentes não tratados, e altas densidades (3.960 oocistos/L) em efluentes tratados. Em águas superficiais que sofriam influência das águas de esgoto, 5.800 oocistos por litro foram detectados, sugerindo que estes não eram retidos pelo tratamento e que os corpos d'água estariam sendo contaminados por estas descargas de efluentes contaminadas por humanos e animais, vazamentos de fossas sépticas, águas recreacionais, resíduos agrícolas e pela erosão de solos expostos à fezes infectadas.

As frequências de 100% de oocistos observadas para as águas de esgoto e águas de córrego são concordantes com os dados obtidos por ROSE (1988) ao verificar no oeste dos Estados Unidos que os oocistos de *Cryptosporidium* atingiam 91% das amostras de águas de esgoto, assim como 77% dos rios e 75% dos lagos. As diferenças para as densidades de oocistos observadas em diferentes localidades podem ser dadas pelo número de hospedeiros infectados nas mesmas.

Segundo ROSE et alii (1987) a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em águas de esgoto pode ser influenciada pelo tamanho e número de pessoas

infectadas em uma população. Durante uma inspeção das águas de esgoto de uma comunidade que passava por uma epidemia de veiculação hídrica por *Cryptosporidium* observou-se o decréscimo de 34 para 1,2 oocistos por litro após o término da mesma. Estes números embora abaixo dos encontrados nas águas de esgoto do nosso estudo, foram associados a epidemia de criptosporidiose.

Uma vez que o efluente da estação elevatória é lançado sem nenhum tratamento no córrego ao lado da mesma, parece ser evidente que a presença e o lançamento de oocistos nestas águas pode representar risco futuro quanto a ocorrência de criptosporidiose no município de São Paulo.

DIAS JÚNIOR (1999) em Araras, município de São Paulo, verificou 100% de positividade nas duas amostras de águas de esgoto analisadas neste local com densidades de 427 oocistos por litro e nos rios que recebiam influência dos efluentes da estação de tratamento de 6 a 148 oocistos por litro, demonstrando a contribuição significativa do esgoto doméstico na circulação desses microrganismos no meio aquático e outra possível fonte de infecção para criptosporidiose neste estado.

A ocorrência de oocistos nas águas do córrego, em densidades tão elevadas quanto ou mesmo superiores as das águas de esgoto (Figura 6) ilustra e confirma a contaminação das mesmas por esgotos domésticos. Por na verdade serem águas superficiais, estas não deveriam receber lançamentos de altas densidades de esgotos, entretanto a presença de populações carentes residentes próximas as margens do córrego, que provavelmente não são beneficiadas por redes de esgotos, obrigam estas a usufruírem das águas do córrego para a eliminação de seus esgotos, contaminando o mesmo.

Em comparação com outros trabalhos realizados em águas superficiais, as águas do córrego Pirajussara apresentaram densidades de oocistos bem mais elevadas que as observadas em diferentes países por SMITH & ROSE (1998). 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.

De acordo com FAYER (1997), que também observou altas frequências de oocistos em águas superficiais, em pesquisas realizadas nos Estados Unidos e Canadá nos quais oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em águas superficiais

(rios, lagos e nascentes) com percentagem de amostras positivas de 9,1 a 100% e concentrações de 0 a 240 oocistos por litro e a sua influência em amostras de águas protegidas da atividade antrópica, em que os 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.

MULLER (1999) a partir do estudo realizado para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas de mananciais e tratadas da região metropolitana de São Paulo verificou que a qualidade dos mananciais deste estado com 74,45% de positividade para as águas brutas das duas estações de tratamento estudadas e de 33,33% para as águas tratadas das mesmas, estão sendo fortemente influenciadas pelas condições de saneamento da região, por inúmeras ocupações irregulares e pela poluição proveniente do Rio Tiête que recebe despejos de esgotos sem nenhum tratamento. Diante da problemática da presença de oocistos nos reservatórios de água superficial, da capacidade de sobrevivência do *Cryptosporidium* no ambiente e da resistência destes ao tratamento de água convencional e também devido a baixa dose infectiva a criptosporidiose pode vir a se tornar um sério problema à saúde pública.

Embora não se tenha realizado um trabalho em paralelo de coproculturas nas populações residentes nos locais próximos aos pontos de coleta para determinação da origem dos oocistos detectados nas amostras, a presença destes e a eliminação por populações humanas ou animais com a contaminação do meio ambiente, segundo alguns autores, é comprovada, podendo representar fontes de infecção para *Cryptosporidium*. Estudos iniciais vêm sendo realizados no Brasil para determinação da ocorrência de *Cryptosporidium* em amostras humanas, de animais e ambientais para determinação do real risco para este parasita.

Em Fortaleza, NEWMAN et alii (1993) demonstraram a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes de animais e sugeriram que estes poderiam ser a fonte da contaminação das águas superficiais e tratadas das águas locais, podendo ser esta a razão da taxa de criptosporidiose nesta região considerada endêmica no país.

No trabalho realizado no município de São Paulo no distrito de Perus onde altos valores de morbidade por diarreias foram registrados no Pronto Atendimento

Local, foi constatada a incidência de oocistos de *Cryptosporidium* em 14% das 75 amostras de fezes analisadas entre Dezembro de 1997 a Abril de 1998, sendo o patógeno prevalente nestas amostras frente a outros parasitas estudados. A provável fonte de infecção nesta comunidade seriam as águas provenientes da rede pública e as águas de poços consumidas pela população dada a detecção de oocistos nestas águas (TOMPS, 1998).

Outra característica a ser avaliada, seria a determinação da sazonalidade para este protozoário nas amostras de águas de esgoto e córrego deste município, uma vez que estes dados representam aspectos importantes para a epidemiologia de um patógeno, entretanto como este foi o primeiro trabalho a ser desenvolvido nestes tipos de amostra desta localidade os objetivos ficaram restritos à comprovação da ocorrência de *Cryptosporidium* spp nestas águas, com a proposta de em estudos posteriores serem abordados com maior propriedade esta análise.

Alguns estudos sugerem que o índice de chuvas estariam intimamente associado com o número de oocistos em águas. Considerando-se que neste estudo as maiores densidades de oocistos foram encontradas no período de Julho a Setembro de 1998, época com menores índices pluviométricos na região, e menores densidades foram observadas de Outubro a Novembro, período em que ocorreram chuvas esporádicas registradas durante o período de coleta, não foi possível fazer qualquer avaliação de sazonalidade, mesmo por que o estudo não foi realizado por um período de um ano completo.

MULLER (1999) ao avaliar a ocorrência deste patógeno nas águas de mananciais de São Paulo observou que não houveram variações de sazonalidade durante o período de um ano em que foram realizadas as análises, no entanto algumas amostras de água bruta após chuvas esporádicas (outubro/98, março e maio/99) apresentaram alta densidade de oocistos, justificado possivelmente pelo aumento do nível de água das represas neste período, possibilitando o arraste de sedimentos das margens para dentro dos reservatórios, é importante salientar que altas densidades de oocistos também foram detectadas em períodos de baixa pluviosidade (Abril e Junho).

Alguns estudos descritos por ALTHERHOLT et alii (1998) têm demonstrado que a ocorrência de oocistos em água é intermitente, apresentando variação sazonal,

aumentando a concentração de oocistos e cistos em períodos com altos índices pluviométricos enquanto THURMAN et alii (1998) mantém a hipótese de que não existe um padrão de sazonalidade para a ocorrência de oocistos deste patógeno no meio aquático.

Este estudo comprovou a presença e o lançamento em águas de esgotos de oocistos de *Cryptosporidium* na cidade de São Paulo, contribuindo com maiores informações para a ocorrência deste patógeno neste município.

5.2. Avaliação das metodologias propostas para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp em amostras de água de esgoto e córrego.

As duas metodologias para concentração de amostras de águas de esgoto e águas de córrego utilizadas nesta pesquisa, precipitação do carbonato de cálcio e a dissolução da membrana filtrante, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* (análise qualitativa), quando consideradas as análises na estação elevatória ou nas águas do córrego (Tabela 3).

Estes resultados corroboram com alguns estudos realizados anteriormente, nos quais foram utilizadas as mesmas metodologias para a concentração de águas superficiais (MULLER, 1999), águas de consumo (TOMPS, 1998) e esgotos (DIAS JÚNIOR, 1999).

Devido a elevada carga orgânica destes tipos de amostras e a expectativa de nestas haverem maiores densidades de oocistos, foram alterados os volumes a serem analisados pelo método de precipitação utilizados por VESEY et alii (1993a) de 10L para 5L e na dissolução por ALDOM & CHAGLA (1995) de 3L para 1L, não sendo entretanto observadas restrições para a detecção de *Cryptosporidium*, uma vez que os oocistos foram detectados em todas as amostragens (Tabela 2).

Quanto a praticidade, o método da precipitação do carbonato foi executado mais facilmente que o da dissolução da membrana filtrante durante a manipulação e processamento das amostras. O que também foi observado por MULLER (1999) em águas de turbidez mais elevada, como as águas superficiais de rios e represas.

Embora tenha sido possível a análise das águas de esgoto e das águas do córrego pela técnica da membrana filtrante, a alta turbidez destas amostras saturava a

membrana rapidamente limitando o volume a ser analisado, tornando-se um obstáculo de execução da técnica. De acordo com ALDOM & CHAGLA (1995), GRACZYK et alii (1997a) e MULLER (1999) esta metodologia é mais apropriada para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água tratada.

De modo geral a técnica da membrana filtrante tem sido descrita como apresentando uma recuperação de oocistos de 70,5% (ALDOM & CHAGLA, 1995) a 77,7% (GRACZYK et alii, 1997a) e a floculação por carbonato de 76% em águas deionizada, 73,3% em águas tratadas e 75,6% em águas de rio (VESEY et alii, 1993a).

SHEPERD & 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 tratadas e águas de rio, e indicaram que a floculação apresentou melhor recuperação dos dois parasitas nos dois tipos de água. ONGERTH & STIBBS (1987) realizaram uma análise semelhante a esta com amostras de água de rio, reservatórios e sistemas de distribuição, inoculadas com cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* e os resultados demonstraram que a floculação química e membrana filtrante apresentaram resultados similares, enquanto os filtros apresentaram menor recuperação.

Métodos de concentração por centrifugação de fluxo contínuo vêm sendo aplicados na pesquisa de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* com recuperação em torno de 4 a 100% (WHITMORE & CARINGTON, 1993; GOATCHER et alii, 1995; BORCHARDT & SPENCER, 1996). ZUCKERMAN et alii (1999) ao analisarem grandes volumes de água verificou que esta técnica de concentração foi superior a por filtração com cartucho e de resultado semelhante a concentração por carbonato de cálcio com recuperação para oocistos de *Cryptosporidium* em torno de 73% quando inoculados em água tratada.

Embora os concentrados não tenham sido submetidos a um processo de purificação para a redução de sólidos suspensos para detecção por IF dos oocistos de *Cryptosporidium* spp, a observação por microscopia não foi prejudicada na quase totalidade das análises. Mas, é necessário ressaltar que a aplicação de um processo de purificação em amostras de alta turbidez por gradientes de separação como o de

Percoll-sucrose, para diminuição da matéria orgânica, ou a eliminação de possíveis interferentes que podem vir a dificultar a detecção dos oocistos tem sido propostas, mas também questionadas, dada a descrição na literatura de perdas com consequente redução de oocistos detectáveis durante o procedimento do mesmo (LECHEVALLIER et alii, 1995).

A inoculação em diferentes concentrações de oocistos purificados em amostras de água destilada demonstraram que menores concentrações inoculadas refletiam em menores recuperações de oocistos, do mesmo modo que, maiores concentrações resultaram em maior recuperação (Tabela 4). Uma vez que esta análise foi desenvolvida somente em água destilada, faz-se necessário novas pesquisas, em trabalhos futuros, com amostras de caráter semelhante ao das águas de esgoto e córrego para a pesquisa de oocistos, para a obtenção de um parâmetro de recuperação nestes tipos de amostra com todos os possíveis interferentes presentes nas mesmas.

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 (MULLER, 1999).

Devido aos resultados obtidos, pode-se sugerir para pesquisa de oocistos em amostras de alta turbidez, como as de água de esgoto e águas de córrego o emprego da floculação e precipitação do carbonato de cálcio para concentração das amostras, visto o seu processamento mais simples, seu baixo custo e a sua eficiência na detecção de oocistos.

5.3. Pesquisa de *Salmonella* nas amostras de águas de esgoto e córrego.

A pesquisa realizada nas 12 amostras de águas de esgoto e 12 amostras de águas do córrego, resultaram em 100% de positividade para *Salmonella* com o isolamento de 221 cepas. A ocorrência de salmonelas em águas de esgoto e águas poluídas por estas fontes vêm sendo notificadas na literatura ao longo dos anos em diversos países, com o intuito de determinar e auxiliar no monitoramento deste patógeno, dado o reconhecimento de sua transmissão por veiculação hídrica, e da

relação entre hospedeiros infectados nas populações humana e animal e a sua presença no meio ambiente.

SANCHEZ (1988), verificou a contribuição humana para a presença de *Salmonella* em águas de esgoto, ao avaliar as principais linhas e redes coletoras do município de São Paulo, incluindo-se estações elevatórias e de tratamento de esgotos, efluentes de hospitais, aeroportos, estações rodoviária e ferroviária, detectando valores tão elevados de incidência quanto aos obtidos neste trabalho, com 98,9% das amostras positivas para *Salmonella*, descrevendo com bastante precisão, a partir dos sorotipos isolados nas coproculturas e nas amostras de águas de esgoto, uma concordância com o índice de infecções humanas passadas na época. Um dado importante e de destaque nesta pesquisa a ser comparado com os resultados de isolamento na estação elevatória onde foi realizado o trabalho, foi a obtenção no mesmo local, há 12 anos, de *Salmonella* resistentes a antibióticos em 100% das amostras.

Embora não tenham sido realizadas amostragens no córrego receptor do esgoto proveniente da estação elevatória para determinação da ocorrência de *Salmonella* nestas águas, é sabido a capacidade de sobrevivência das mesmas por longos períodos de tempo no meio aquático e a influência favorável dos lançamentos de esgotos no transporte desta bactéria por longas distâncias, podendo atingir direta ou indiretamente o homem através das mais variadas vias. Deste modo, estas águas podem ser responsáveis pelo transporte e circulação de salmonelas neste município.

MELO et alii (1997) ao avaliarem a influência do lançamento de águas de esgotos na balneabilidade de algumas praias de Fortaleza (Ceará) constataram que, embora as áreas que sofriam influência direta dos esgotos fossem as com maior índice de isolamentos para *Salmonella*, regiões distantes a estas também passavam a ser atingidas pela circulação das águas por esta enterobactéria.

O isolamento de *Salmonella* em todas as amostragens das águas do córrego Pirajussara comprovam a contaminação e o comprometimento dos corpos d'água por lançamentos de esgotos das populações vizinhas ao mesmo, e mesmo que estas águas não sejam destinadas a recreação ou captação para o abastecimento público, pelo seu alto grau de poluição, é importante frisar que estas circulam na região metropolitana

e podem de algum modo, como por exemplo nas enchentes que atingem o mesmo, influir na transmissão da salmonelose.

Um exemplo da transmissão da *Salmonella* por águas poluídas foi observado na Bolívia onde a incidência elevada da morbidade por *E. coli*, *Shigella* spp e *Salmonella* spp em crianças com até três anos de idade são relacionadas ao contato com as águas do Rio La Paz considerado altamente poluído por estes patógenos, em residentes próximos a este (OHNO et alii, 1997).

Quanto aos sorotipos de *Salmonella*, dos 73 e 148 isolados nas águas de esgoto da E.E.E e nas águas do córrego Pirajussara, respectivamente, verificou-se o total de 19 diferentes sorotipos identificados e 1 *Salmonella* sp.

Na E.E.E. os sorotipos mais frequentes de *Salmonella* foram: *S. panama* (26%), *S. agona* (19%), *S. hadar* (16%), *S. braenderup* (11%), *S. othmarschen* (8%), *S. infantis* (7%) e *S. derby* (3%), os demais sorotipos corresponderam ao percentual de 10%. No córrego os sorotipos mais frequentes foram: *S. panama* (28%), *S. infantis* (18%), *S. onakam* (11%), *S. agona* (8%), *S. hadar* (7%), *S. mbandaka* (5%), *S. indiana* (5%), *S. give* (4%) e *S. derby* (4%) e os demais sorotipos corresponderam à 10% (Tabela 5 e Figuras 9 e 10).

Estes resultados corroboram com alguns autores a partir do estudo em amostras de águas de esgoto no Brasil. Conforme CÂMARA et alii (1982) em amostras de águas de esgoto do Rio de Janeiro, *S. Agona* também foi um dos sorotipos mais frequentes e FARIAS (1997) em Belém no Pará relatou *S. Agona*, *S. hadar* e *S. infantis* como mais frequentes.

Fazendo- se uma comparação com trabalhos desenvolvidos há alguns anos em amostras de águas de esgoto deste município (Tabela 7) pode-se constatar poucas mudanças para os sorotipos circulantes nestas águas. Uma explicação para as sutis variações, pode ser dada pelas diferenças nos pontos e número de amostragens realizadas por cada autor, uma vez que Martins e Sanches realizaram 49 e 324 amostragens, respectivamente, em todo o município de São Paulo e o presente estudo fez 24 amostragens em águas de esgoto provenientes de comunidades da região Norte deste município (E.E.E) e de esgotos originados no município do Taboão da Serra e região Oeste do município de São Paulo.

Tabela 7. Comparação entre os sorotipos observados em diferentes épocas no município de São Paulo em águas de esgoto, nos trabalhos realizados por Martins (1979), Sanchez (1988) e Farias (2000).

MARTINS (1979)	SANCHEZ (1988)	FARIAS (2000)
<i>S. agona</i> (17,4%)	<i>S. agona</i> (54,91%)	<i>S. panama</i> (26%)
<i>S. typhimurium</i> var. 0:5- (14,6%)	<i>S. infantis</i> (11,37%)	<i>S. agona</i> (19%)
<i>S. anatum</i> (11,7%)	<i>S. typhimurium</i> (9,45%)	<i>S. hadar</i> (16%)
<i>S. infantis</i> 0:14+ (10,7%)	<i>S. derby</i> (5,74%)	<i>S. braenderup</i> (11%)
<i>S. derby</i> (7,8%)	<i>S. panama</i> (5,06%)	<i>S. othmarschen</i> (8%)
<i>S. minnesota</i> (7,7%)	<i>S. minnesota</i> (2,22%)	<i>S. infantis</i> (7%)
<i>S. panama</i> (4,4%)	<i>S. anatum</i> (1,9%)	<i>S. derby</i> (3%)

Com exceção da *S. othmarschen*, todos os demais sorotipos mais isolados nas amostras das águas de esgoto da E.E.E., foram observados também em isolamentos de coprocultivos humanos ao longo de 40 anos no estado de São Paulo de acordo com TAUNAY et alii (1996), demonstrando a ocorrência destes sorotipos na população deste estado e portanto a sua eliminação nas águas de esgoto.

Embora as águas do córrego sejam consideradas como águas de esgoto devido a sua grande poluição, é necessário descreve-las como águas superficiais uma vez que estas deveriam ser classificadas deste modo. Portanto da comparação realizada (Tabela 8) quanto aos sorotipos mais observados nas águas superficiais (águas brutas de captação para tratamento) deste município por Martins com os sorotipos mais observados neste estudo observa-se que *S. infantis* e *S. agona* mesmo após 20 anos permanecem como uns dos sorotipos mais observados nestes tipos de amostras, os demais variaram ao longo deste período.

Tabela 8. Comparação entre os sorotipos observados em diferentes épocas no município de São Paulo em águas superficiais, nos trabalhos realizados por Martins (1979) e Farias (2000).

MARTINS (1979)	FARIAS (2000)
<i>S. quiniela</i> (13,9%)	<i>S. panama</i> (28%)
<i>S. infantis</i> (12%)	<i>S. infantis</i> (18%)
<i>S. anatum</i> (10,7%)	<i>S. onakam</i> (11%)
<i>S. agona</i> (8,1%)	<i>S. agona</i> (8%)
<i>S. newport</i> (5,3%)	<i>S. hadar</i> (7%)

Comparando-se os sorotipos encontrados nas águas de esgoto da estação elevatória com os das águas do córrego, verifica-se que 5 entre os mais frequentes são comuns a estas águas.

Tabela 9: Comparação entre os sorotipos observados no município de São Paulo nas águas de esgoto e córrego do presente trabalho

águas do córrego	águas de esgoto
<i>S. panama</i> (28%)	<i>S. panama</i> (26%)
<i>S. infantis</i> (18%)	<i>S. agona</i> (19%)
<i>S. onakam</i> (11%)	<i>S. hadar</i> (16%)
<i>S. agona</i> (8%)	<i>S. braenderup</i> (11%)
<i>S. hadar</i> (7%)	<i>S. othmarschen</i> (8%)
<i>S. mbandaka</i> (5%)	<i>S. infantis</i> (7%)
<i>S. indiana</i> (5%)	<i>S. derby</i> (3%)
<i>S. give</i> (4%)	
<i>S. derby</i> (4%)	

Entre os sorotipos mais observados nas águas do córrego, com exceção de *S. onakam* e *S. indiana* todos os demais foram isolados em coprocultivos humanos de 1950-1990 (TAUNAY et alii, 1996), demonstrando a ocorrência destes sorotipos na população deste estado e portanto a sua eliminação na forma de esgotos nas águas do córrego.

Pela circulação em grande parte da região metropolitana do estado de São Paulo dos rios ou afluentes que são atingidos pelas águas de esgoto e córrego estudadas, a ocorrência de salmonelas nestas águas podem vir a se constituir em fontes de infecções e riscos à saúde da população deste município ou de outros que recebem as influências destas águas.

5.4. Pesquisa de Coliformes totais e *E. coli* nas águas de esgoto e nas águas do córrego.

Embora sejam esperados altos índices de coliformes nas águas de esgoto, a determinação dos indicadores microbiológicos nestas águas foi realizada a fim de se estabelecer posteriormente uma comparação com as águas do córrego.

Os valores observados para coliformes totais e *E. coli* para o córrego estudado (Tabela 6) foram semelhantes aos encontrados na estação elevatória de esgoto, demonstrando o lançamento de esgotos nestas águas. Os índices encontrados para *E. coli* correspondem aos já relatados para coliformes fecais por MARTINS (1979) quando pesquisadas as estações de tratamento de esgotos de Pinheiros, do Jabaquara e do Ipiranga.

A emissão de esgotos sem tratamento, conforme o observado no córrego, indica a necessidade de maiores investimentos no sentido de promover a construção ou a implementação das redes coletoras de esgotos, direcionando-os a um tratamento em estações de tratamento dos mesmos, e o aumento do volume de esgotos tratados neste estado, diminuindo a poluição orgânica das águas deste município.

6. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos pode-se concluir:

- A ocorrência de *Salmonella* spp e de oocistos de *Cryptosporidium* spp em 100% das amostras das águas de esgotos da estação elevatória “Parque Edu Chaves” e das águas do córrego “Pirajussara” demonstraram a circulação destes patógenos no meio ambiente podendo se constituir em importante fonte de disseminação dos mesmos no ecossistema aquático e na comunidade.
- As metodologias utilizadas para a concentração das amostras das águas de esgoto e águas do córrego, precipitação do carbonato de cálcio e dissolução da membrana filtrante, não apresentaram diferença significativa para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp, sugerindo-se entretanto a utilização da precipitação química devido a sua maior praticidade e facilidade de execução em amostras de alta turbidez.
- Foram isoladas e identificadas 221 cepas de *Salmonella*, sendo 73 advindas das águas da estação elevatória “Parque Edu Chaves” e 148 das águas do córrego “Pirajussara”. Entre os 19 sorotipos identificados, prevaleceram nas águas de esgoto *S. panama* (26%), *S. agona* (19%), *S. hadar* (16%), *S. braenderup* (11%), *S. othmarschen* (8%), *S. infantis* (7%) e *S. derby* (3%), enquanto nas águas do córrego foram *S. panama* (28%), *S. infantis* (18%), *S. onakam* (11%), *S. agona* (8%), *S. hadar* (7%), *S. mbandaka* (5%), *S. indiana* (5%), *S. give* (4%) e *S. derby* (4%). Cinco entre os sorotipos mais frequentes, foram comuns às águas de esgoto e córrego.
- Os altos índices de *E. coli* encontrados nas águas do córrego “Pirajussara” confirmam a poluição das mesmas por esgotos, alertando para a necessidade da implementação de redes coletoras de esgotos com o tratamento dos mesmos para a preservação das águas superficiais deste município.

7. RECOMENDAÇÕES FINAIS

Considerando que:

No presente estudo foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp na totalidade das amostras analisadas;

O lançamento de águas de esgoto sem tratamento no meio ambiente, e em especial nos corpos d'água, pode provocar riscos sanitários e a contaminação de águas com múltiplos usos (para fins recreacionais, abastecimento humano, dessedentação de animais, etc.) com estes patógenos;

O significado incerto da presença de oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente, a sua baixa dose infectiva, a inexistência de um tratamento terapêutico específico e de métodos padronizados para o seu estudo, podem vir a se constituir em problemas sérios para saúde pública;

Recomenda-se que:

Sejam realizados esforços a nível nacional no sentido de desenvolvimento e aplicação de tecnologias adequadas de tratamento de esgotos, antes de serem lançados nos corpos d'água, na tentativa de minimizar os riscos sanitários, devido a presença de microrganismos patogênicos;

Sejam incentivadas as investigações epidemiológicas relativas a vigilância de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp em águas de esgoto, superficiais e de consumo, considerando a ampla distribuição e sobrevivência destes patógenos no ecossistema aquático, no sentido de esclarecer pontos da cadeia epidemiológica da criptosporidiose e salmonelose no nosso meio, na tentativa de localizar, minimizar ou interromper as principais vias de transmissão destes parasitas;

Sejam tomadas medidas por parte dos órgãos competentes, no sentido de realizar mudanças na política governamental do país com o aumento de rendas e investimentos na área de saneamento básico;

Sejam realizados investimentos na pesquisa e desenvolvimento de métodos, simples, econômicos, eficientes e aplicáveis à realidade brasileira para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIN, E.W. Public health risk assessment in relation to the managements of municipal wastes on lands. In: Workshop on international transportation, and utilization or disposal of sewage sludge including recommendation, Washington, D.C., 1983. *Pan American Health Organization (PAHO), Wolrd Health Organization (OMS)*, PNS/ 85-01, 1983. 218 p.
- ALDOM, J.E. & CHAGLA, A.H. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. *Letters Appl. Microbiol.*, 20 :186-7, 1995.
- ALTHERHOLT, T.B.; LeCHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; ROSEN, J.S. Effect of rainfall on *Giardia* and crypto. *J. Am. Water Work Assoc.*, 90: 66-80, 1998.
- ANGULO, F.J.; TIPPEN, S.; SHARP, D.J.; PAYNE, B.J.; COLLIER, C.; HILL, J.E.; BARRETT, T.J.; CLARCK, R.M.; GELDREICH, E.E.; DONNELL, H.D. JR; SWERDLOW, D.L. A community waterborne outbreak of salmonellosis and the effectiveness of a boil water order. *Am. J. Public. Health.*, 87: 580-4, 1997.
- ANÔNIMO. Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *MMWR*, 31: 589, 1982.
- APHA (American Public Health Association) Standard methods for the examination of water and wastewater. 19 ed. Washington, APHA, 1995.
- ARVANITIDOU, M.; PAPA, A.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DANIELIDES, V.; KATSOUYANNOPOULOS, V. The occurrence of *Listeria* and *Salmonella* spp. in surface waters. *Microbiol. Res.*, 152: 395-7, 1997.
- AWAD-EL-KARIEM, F.M.; WASHURST, D.C.; McDONALD, V. Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restrition. *Parasitology.*, 109: 19-22, 1994.
- BATIK, O.; CRAUN, G.F.; PIPES, W.O. Routine coliform and water borne disease outbreaks. *H. Environ. Health.*, 45: 227-30, 1983.

¹ De acordo com:

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

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

- BEJ, A.K. & MAHBUBANI, M.H. Applications of the polimerase chain reation (PCR) in vitro DNA-amplification method in environmental microbiology. In: PCR technology: current inovations. Berlin: CRC Press, 1994. P. 327-39.
- BITTON, G. Pathogens and parasites in domestic wastewater. In: Wastewater Microbiology- New York: Wisley-Liss, 1994. p.77-100.
- BLOCH, A.B.; STRAMER, S.L.; SMITH, J.D.; MARGOLIS, H.S.; FIELDS, T.W.; McKINLEY, C.P.; GERBA, J.E.; MAYNARD, J.E.; SIKES, R.K. Recovery of hepatitis A virus from a water supply responsible for a commom source outbreak of hepatitis A. *Am. J. Public. Health.*, 80: 428-30, 1990.
- BORCHARDT, M.A. & SPENCER, S.K. Recovery of *Cryptosporidium* and *Giardia* from environmental samples using a blood cell separator. In: PROCEEDINGS AWWA CONFERENCE., Boston, MA: WQCT, 1996.v.1.
- BORING, J.R.; MARTIN, W.T.; ELLIOT, L.M. Isolation of *Salmonella typhimurium* from municipal water, Riverside, California, 1965. *Am. J. Epidemiol.*, 93: 49-54, 1971.
- BREZENSKI, F.T.; RUSSOMANO, R.; DEFALCO, P. The occurrence of *Salmonella* and *Shigella* in post-chlorinated and non chlorinated sewage effluents and receiving waters. *Health Lab. Sci.*, 2: 40-7, 1965.
- BURGE, W.D. & MARSH, P.B. Infections disease hazards of landspreading sewage wastes. *J. Environ.Anal.*, 7: 1-9, 1978.
- BUTLER, B.J. & MAYFIELD, C.I. *Cryptosporidium* spp. - A review of the organism, the disease, and implications for managing water resources. Ontario: Canada, Waterloo Centre for Groundwater Research, 1996.
- CABES (Catálogo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental). Guia de saneamento ambiental no Brasil -1998. 18 ed, ABES, Janeiro de 1999.
- CÂMARA, F.P.; COSTA, G.A.; HOFER, E.; ALMEIDA, D.F. Drug resistance in *Salmonella* strains isolated from raw sewage in Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Biol.*, 42: 421-4, 1982.
- CASEMORE, D.P. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiol. Infect.*, 104, 1990.
- CDC (CENTER FOR CONTROL DISEASE). Foodborne and waterborne disease outbreaks, annual summary, 1976. Atlanta, Ga., 1977. 82 p. (Publication CDC 78-8185).
- CETESB, São Paulo. Guia de Orientação e preservação de amostras de água, 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.*, p. 1567-85, Nov. 1995.
- CHEN, Y.G.; YAO, F.B.; LI, H.S.; SHI, W.S.; DAI, M.X.; LU, M. *Cryptosporidium* infection and diarrhea in rural and urban areas of Jiangsu, people's republic of China. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 492-4, 1992.
- CLANCY, J.L.; GOLLNITZ, W.D.; TABIB, Z. Commercial laboratories: how accurate are they?. *J. Am. Water Works Assoc.*, 86: 89-97, 1994.
- CRAUN, F.G. & McCABE, L.J. Review of the causes of waterborne disease outbreaks. *J. Am. Water Works Assoc.*, 65: 74-8, 1973.
- CRAUN, G.F. Causes of waterborne outbreaks in the United States. *Water Sci. Technol.*, 22: 89-98, 1990.
- CRAWFORD, F.G. & VERMUND, S.H. Human cryptosporidiosis. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 16: 113, 1988.
- CRAWFORD, F.G.; VERMUND, S.H.; MA, J.Y.; DECKELBAUM, R.J. Asymptomatic cryptosporidiosis in a New York city day care center. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 7:806, 1988.
- CURRENT, W.L. & HAYNES, T.B. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. *N. Engl.J.Med.*, 308: 1252-7, 1983.
- CURRENT, W.L. *Cryptosporidium*: its biology and potential for environmental transmission. *CRC. Crit. Rev. Environ. Contr.*, 17: 21, 1986.
- CURRENT, W.L. & GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4: 325-58, 1991.
- CURRENT, W.L. *Cryptosporidium parvum*: household transmission. *Ann. Intern. Med.*, 120: 518, 1994.
- D'ÁNTONIO, R.G.; WINN, R.E.; TAYLOR, J.P.; GUSTAFSON, T.L. CURRENT, W.L.; RHODES, M.M.; GARY, G.W.; ZAJAC, R.A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann. Intern.Med.*, 103: 886-8, 1985.
- DAWSON, A.; GRIFFIN, R.; FLEETWOOD, A.; BARRET, N.J. Farm visits and zoonoses. Public Health Laboratory Service. *Communic. Dis. Rep. (Rev)*., 5 (R81), 1995.
- DE ANDRADE, J.A.; GOMES, T.A.; FAGUNDES NETO, U. Mortality in breast-fed infants with persistent diarrhea: risk factors associated with death. *Arq. Gastroenterol.*, 35: 62-8, 1998.

- DE LEON, R.; NARANJO, J.E.; ROSE, J.B.; GERBA, C.P. Enterovirus, *Cryptosporidium* and *Giardia* monitoring of wastewater reuse effluent in Arizona. In: Implementing Water Reuse, Symposium IV. *Am. Water Works Assoc.*, Denver, CO. p.833-46, 1988.
- DENG, M.Q.; CLIVER, D.O.; MARIAN, T.W. Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3134-8, 1997.
- DIAS JÚNIOR, O. Ocorrência de cistos de *Giardia* sp e oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas superficiais e esgoto no município de Araras-SP. São Paulo, 1999. 110 p. [Dissertação de mestrado- Universidade Presbiteriana Mackenzie]
- DUPONT, H.L.; CHAPPELL, C.L.; STERLING, C.R.; OKHUYSEN, P.C.; ROSE, J.B.; JAKUBOWSKI, W. The infectivity of *C. parvum* in health volunteers. *N.Engl.J.Med.* 332: 855-9, 1995.
- EDWARDS, P.R. *Salmonella* and salmonellosis. *An. N.Y. Acad. Sci.*, 66: 43-53, 1956.
- EPA. Anonymous. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/ FA.EPA: 821-R-99-006. April. 1999. Draft.
- EUROSURVEILLANCE. Surto de infecção por *Salmonella dublin* em França, novembro- dezembro 1995 (on line). Available from <http://www.ceses.org/eurosurv>, 1996.
- EUROSURVEILLANCE. *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* na Europa Ocidental, de 1993 a 1995: relatório de vigilância da Salm-Net (on line). Available from <http://www.ceses.org/eurosurv>, 1997a.
- EUROSURVEILLANCE. Vigilância da resistência das salmonelas aos antibióticos (on line). Available from <http://www.ceses.org/eurosurv>, 1997b.
- EVISON, L.M. Bacterial pollution of coastal waters in the U.K. and mediterranean. *J. Appl.Bacteriol.*, (Suppl.): 815-935, 1985.
- FARIAS, E.W.C. Sensibilidade aos antimicrobianos de amostras de *Salmonella* isoladas de ambientes aquáticos e de casos de diarreia humana no município de Belém- Pará, 1997. [Dissertação apresentada para obtenção de Grau- Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará].
- FAYER, R. & UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.*, 50: 458-84, 1986.
- FAYER, R. *Cryptosporidium* and criptosporidiosis. Boca Raton, CRC Press, 1997. 251p.

FDA Center for Food Safety & Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins 1992 (Bad Bug Book) online. Available from <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>, 1997.

FEACHEM, R.G.; BRADLEY, D.J.; GARELICH, H.; MARA, D.D. Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management. New York: John Wiley, 1983. 501 p. (World bank in studies in water supply and sanitation, 3).

FEDERAL REGISTER. Part II and III, Environmental Protection Agency, 40FCR Parts 141 and 142. National primary drinking water rules and regulations. Total coliforms 54 (124), p. 27487-568, 1989.

FEDERAL REGISTER. Proposed ICR protozoan method for detection *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by a fluorescein antibody procedure, 1993.

FERRAMOLA, R.; MONTEVERDE, J.J.; LEIGUARDA, R.H. Investigación de bacterias del genero *Salmonella* em água y liquido cloacal. *Bol. Obras Sanit.Nac.*, 7: 103-6, 1943.

FICA, A.E.; PRAT-MIRANDA, S.; FERNANDEZ-RICCI, A.; D'OTTONE, K.; CABELLO, F.C. Epidemic typhoid in Chile: analysis by molecular and conventional methods of *Salmonella typhi* strain diversity in epidemic (1977-1981) and non epidemic (1990) years. *J. Clin. Microbiol.*, 34: 1701-07, 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.

FURTADO, C.; ADAK, G.K.; STUART, J.M.; WALL, P.G.; EVANS, H.S.; CASEMORE, D.P. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales. *Epidemiol. Infect.*, 121 (1): 109-19, 1998.

GALLARDO, F.; RUIZ, J.; MARCO, F.; TOWNER, K.J.; VILA, J. Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance. *J. Med. Microbiol.*, 48: 367-74, 1999.

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 [no prelo].

GAMESON, A.L.H.; AGG, A.R.; STANFIELD, G.; GOULD, D.J. Investigations of sewage discharges to some British coastal waters. Stevenage. *Water Res. Center*, 1978. 96 p. (Technical Report, TR67).

GELDREICH, E.E. The bacteriological aspects of stormwater pollution. *J. Waters Pollut. Control Fed.*, 40: 1861-76, 1968.

- 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.*, Rio J., 911: 551-4, 1996.
- GOATCHER, L.J.; POON, P.; DAVIS, E. Use of a continuous flow centrifuge system for the determination of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. In: AMERICAN SOCIETY MICROBIOLOGY GENERAL MEETING, 95., Washington: ASM, 1995. p. 437.
- GOMES, T.A.T.; RASSI, V.; MacDONALD, K.L.; SILVA RAMOS, S.R.T.S.; TRABULSI, L.R.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C.; CANDEIAS, J.A.N.; IVEY, C.; TOLEDO, M.R.F.; BLAKE, P.A. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *J. Infect. Dis.*, 164: 331-7, 1991.
- GONZALEZ – HEVIA, M.A.; CRUZ MARTIN, M.; LOBATO, M.J.; GUTIERREZ, F.; SOLANO, P.; ALVAREZ-RIESGO, J.A. *Salmonella* and salmonellosis in the Asturias district, Spain, during a seven year period (1990-1996). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 17: 166-70, 1999.
- GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; FAYER, R. Recovery of waterborne oocysts of *Cryptosporidium* from water samples by the membrane-filter dissolution method. *Parasitol. Res.*, 83: 121-125, 1997a.
- GRACZYK, T.K.; FAYER, R.; CRANFIELD, M.R.; OWENS, R. *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from water by the membrane filter dissolution method retain their infectivity. *J. Parasitol.*, 83: 111-14, 1997b.
- GUIZELINE, E. & AMATO, N.V. Isolation of oocysts of *Cryptosporidium* sp. in loose stools of patients with AIDS and of immunocompetent children and adults in São Paulo, Brazil. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo.*, 47: 150-2, 1992.
- HANSEN, J.S. & ONGERTH, J.E. Effect of time and watershed characteristic on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2790-5, 1991.
- HAYES, E.B.; MATTE, T.D.; O'BRIEN, T.R.; MCKINLEY, T.W.; LOGDSON, 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.
- 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: 1-21, 1991.

- JAKUBOWSKI, W.S. Detection of *Giardia* cysts in drinking water: state of the art. In Erlandsen, S.L. & Meyer, E.A. *Giardia and Giardiasis* New York: Plenum, 1984. p.263-86.
- JAKUBOWSKI, W.S.; BOUTROS, S.; FABER, F.; FAYER, F.; GHIORSE, W.; LECHEVALLIER, M.; ROSE, J.B.; SHAUB, S.; SIGNGH, A.; STERWART, M. Environmental methods for *Cryptosporidium*. *J. Am. Water Works Assoc.*, 88: 107-21, 1996.
- JANOFF, E.N. & RELLER, L.B. *Cryptosporidium* species, a protean protozoan. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 967, 1987.
- JAY, J.M. *Modern Food Microbiology*. 5ed. New York: International Thomson, pg.507-26, 1996.
- JOHNSON, D.W.; PIENIAZER, N.; ROSE, J.B. DNA probe hybridization and PCR detection of *Cryptosporidium* compared to immunofluorescence assay. *Water Sci. Technol.*, 27: 77-84, 1993.
- JOHNSON, D.W.; PIENIAZEK, N.J.; GRIFFIN, D.W.; MISENER, L. ROSE, J.B. Developmet of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ.Microbiol.*, 61: 3849-55, 1995.
- JONES, F. & WATKINS, J. The water cycle as a source of pathogens. *Appl. Bacteriol., (Suppl.)*, 59: 279-365, 1985.
- KAUCNER, C & STINEAR, T. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription- PCR. *Appl. Environ.Microbiol.*, 64: 1743-49, 1998.
- KAUFFMANN, M.D. Kauffmann-white schema. In: *Serological diagnosis of Salmonella species*. 1ed. Copenhagen, Williams & Wilkins, 1972. p. 59-123.
- KELLY, P.; BABOO, K.S.; NDUBANI, P.; NCHITO, M.; OKEOWO, N.P.; LUO, N.P.; FELDMAN, R.A.; FARTHING, M.J.G. Cryptosporidiosis in adults in Lusaka, Zambia, and its relationship to oocyst contamination of drinking water. *J. Infect. Dis.*, 176: 1120-3, 1997.
- KINDE, H.; ADELSON, M.; ARDANS, A.; LITTLE, E.H.; WILLOUGHBY, D.; BERCHTOLD, D.; READ, D.H.; BREITMEYER, R.; KERR, D. TARBELL, R.; HUGHES, E. Prevalence of *Salmonella* in municipal sewage treatment plant effluents in southern California. *Avian Dis.*, 41: 392-8, 1997.

- KOOPMANS, M.P.; GOOSEN, E.S.; LIMA, A.A.; McAULIFFE, I.T.; NATARO, J.P.; BARRET, L.J.; GLASS, R.I.; GUERRANT, R.L. Association of torovirus with acute and persistent diarrhea in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 16: 504-7, 1997.
- KRAMER, M.H.; HERWALDT, B.L.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; JURANEK, D.D. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1993-1994. *MMWR Surveill Summ.*, 45: 1-33, 1996a.
- KRAMER, M.H.; HERWALDT, B.L.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; JURANEK, D.D. Surveillance for waterborne disease outbreaks, United States, 1993-1994. *J. Am. Water Works Assoc.*, 88: 66-80, 1996b.
- 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. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2610-16, 1991.
- 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.
- LECLERC, H.; CATSARAS, M.; SAVAGE, C; EYMARD, C. Sur l'isolement des *Salmonella* dans les milieux fortement pollués. II. Essais sur des eaux résiduaires. *Ann. Inst. Pasteur Lille.*, 21: 227-94, 1970.
- LECLERC, H. & ORGER, C. Les eaux usées des abattoirs et leur importance épidémiologique. *Rev. Epidemiol. Méd. Soc. Santé Publique*, 23: 429-44, 1975.
- LEE, Y.M.; JOHNSON, P.W.; ARROWOOD, M.J.; FURNESS, B.W.; PICHETTE, S.C.; GRADY, K.K.; STEURER, F.J.; MAC KENZIE, W.R.; TSANG, V.C.W.; REEH, P.; MITCHELL, L.; MURCHISON, S.R.; ALVAREZ, S.; SNIDER, C.E.; VONALT, K.M.; BERGMIRE-SWEAT, D. Use of an electrochemiluminescence assay for detecting *Cryptosporidium parvum* oocysts in fecal and environmental samples during an outbreak in Brushy Creek, Texas. In: INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON WATERBORNE PATHOGENS EXTEND ABSTRACTS. Milwaukee-Wisconsin, 1999a.
- LEE, Y.M.; JOHNSON, P.W.; CALL, J.L.; ARROWOOD, M.J.; TSANG, V.C.W. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water and human fecal samples by electrochemiluminescence assay. In: INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON WATERBORNE PATHOGENS EXTEND ABSTRACTS. Milwaukee-Wisconsin, 1999b.

- LeMINOR, L. & RHODE, R. Guidelines for the preparation of *Salmonella* antisera. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris: Inst. Pauster, 1982, 50p.
- LEVINE, W.C.; STEPHENSON, W.T.; CRAUN, G.F. Waterborne disease outbreaks, 1986-1988. *MMWR 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 MMWR Surveill Summ.*, 47: 1-34, 1998.
- LOUREIRO, E.C.B. Contribuição ao estudo bacteriológico de *Salmonella* oriundas de diferentes fontes da região amazônica brasileira. São Paulo, 1990. 102 p. [Dissertação de mestrado –Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- 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.*, Rio J., 84: 117-22, 1990.
- MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, D.G.; ADDISS, K.R.; FOX, J.B.; DAVIS, J.P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, 331: 161-7, 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. Parasitol.*, 73 (4): 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 associados a pacientes com diarreia em Ribeirão Preto-SP. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 30: 31-2, 1998.
- MARTINS, M.T. *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário. São Paulo, 1979. 22 p. [Tese de doutorado- Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo].

- MARTINS, M.T.; SANCHEZ, P.S.; MARQUES, E.; MONTEIRO, C.K.; MOLINA, A.G. Ten year survey of *Salmonella* and enterovirus in raw and treated waters in the Great São Paulo area, Brazil. *Water. Sci. Technol.*, 10: 53-60, 1986.
- MARTINS, M.T.; PESSOA, G.V.A.; SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.Z.; MONTEIRO, C.K.; COIMBRÃO, C.A.; MARQUES, E.; IRINO, K. Isolamento de *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário. *Rev. Microbiol.*, 19: 29-39, 1988.
- MATURANA, V.M.; ARES-MAZÁS, M.E.; DURAN-OREIRO, D.; LORENZO-LORENZO, M.J. Efficacy of activated sludge in removing *Cryptosporidium parvum* oocysts from sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3514-6, 1992.
- MAYER, C.L. & PALMER, C. Evaluation of PCR and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2081-5, 1996.
- MCGINNIS, J.A. & DE WALLE, F. The movement of typhoid organisms saturated, permeable soil. *J. Am. Water Works Assoc.*, 75: 266-71, 1983.
- MEISEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C.E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in a immunosuppressed patient. *Gastroenterology.*, 70: 1156, 1976.
- MELO, M.T.; VIEIRA, R.H.; SAKER-SAMPAIO, S.; HOFER, E. Coliforms and *Salmonella* in sewerage near to domestic sewage sources in Fortaleza (Ceara, Brazil). *Microbiologia.*, 13: 463-70, 1997.
- MILLARD, P.S.; GENSHEIMER, K.F.; ADDISS, D.G.; SOSIN, D.M.; BECKETT, G.A.; HOUCK-JANKOSKI, A.; HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *J. Am. Med. Assoc.*, 272: 1592, 1994.
- MISHU, B.; KOEHLER, J.; LEE, L.A.; RODRIGUE, D.; BRENNER, F.H.; BLAKE, P.; TAUXE, R.V. Outbreaks of *Salmonella enteritidis* infections in the United States, 1985-1991. *J. Infect. Dis.*, 169: 547-52, 1994.
- MMWR- Assessing the public health threat associated with waterborne cryptosporidiosis report of a workshop. *MMWR*, 44: 1-15, 1995.
- MOHLE-BOETANI, J.C.; REPORTER, R.; WERNER, S.B.; ABBOTT, S.; FARRAR, J.; WATERMAN, S.H.; VUGIA, D.J. An outbreak of *Salmonella* serogroup saphra due to cantaloupes from Mexico. *J. Infect. Dis.*, 180: 1361-4, 1999.
- 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.

- MOLINERO, M.E.; FERNANDEZ, I.; GARCIA-CALABUIG, M.A.; PEIRO, E. Investigation of waterborne *Salmonella ohio* outbreak. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 16: 230-2, 1998.
- 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. *MMWR CDC Surveill Summ.*, 42: 1-22, 1993.
- MORSE, E.V. & DUNCAN, M.A. Salmonellosis- An environmental health problem. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 165: 1015-9, 1974.
- MORSE E.V. & DUNCAN, M.A. *Salmonella* as monitors of fecal pollution in the aquatic environment. *J.Environ.Sci.Health.*, 11: 591-601, 1976.
- 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. Rio J.*, 84: 527-33, 1989.
- MULLER, A.P.B. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo. São Paulo, 1999. p 113. [Dissertação de Mestrado- Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo].
- MUSIAL, C.E.; ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R.; GERBA, C.P. Detection of *Cryptosporidium* in water using polypropylene cartridge filters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 687-92, 1987.
- NAVIN, T.R. & JURANEK, D.D. Cryptosporidiosis: clinical epidemiologic and parasitologic review. *Rev.Infect. Dis.*, 6: 313-27, 1984.
- NEWMAN, R.D.; WUHIB, T.; LIMA, M.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C.L. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an 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.
- NIME, F.A.; BUREK, J.D.; PAGE, D.L.; HOLSCHER, M.A.; YARDLEY, J.H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70: 592, 1976.

- OHNO, A.; MARUI, A.; CASTRO, E.S.; REYES, A.A.B.; ELIO-CALVO, D.; KASITANI, H.; ISHII, Y.; YAMAGUCHI, K. Enteropathogenic bacteria in the La Paz river of Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 57: 438-44, 1997.
- ONGERTH, J.E. & STIBBS, H.H. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 672-6, 1987.
- PAC SA, M.R.; ARNEDO, A.; BENEDICTO, J.; ARRANZ, A.; AGUILAR, V.; GUILLEN, F. Epidemic outbreak of *Salmonella richmond* infection in Castellon, Spain. *Rev. Panam. Salud Publica.*, 3; 96-101, 1998.
- PALMA, D.; OLIVA, C.A.; TADDEI, J.A.; FAGUNDES NETO, U. Acute diarrhea: stool water loss in hospitalized infants and its correlation with etiologic agents and lactose content in the diet. *Arq. Gastroenterol.*, 34: 186-95, 1997.
- PALMER, S.R. & BIFFIN, A. H. Criptosporidiosis in England and Wales: prevalence and clinical and epidemiological features. *Br. Med. J.*, 300: 774, 1990.
- PANCIERA, R.J; THOMASSEN, R.W.; GARNER, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.*, 8: 479, 1971.
- PAYMENT, P.; SIEMIATYCKI, J.; RICHARDSON, L.; RENAUD, G.; FRANCO, E.; PRÉVOST, M. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *Int. J. Environ. Health Res.*, 7: 5-31, 1997.
- PESSOA, G.V.A. & PEIXOTO, E.S. Caldo- selenito- novobiocina. Um meio de maior seletividade para o isolamento de *Salmonella* nas fezes. *Rev.Inst.Adolfo Lutz.*, 31: 1-3, 1971.
- PIKE, E.B. Recent UK research on incidence, transmission and control of *Salmonella* and parasitic ova in sludge. In: BLOCK J.C.; HAVELAAR, A.H.; HERMITE, P.L. (Eds) Epidemiological studies of risks associated with the agricultural use of sewage sludge: knowledge and needs. New York: Elsevier, 1986. p. 50-9.
- POZIO, E.; REZZA, G.; BOSCHINI, A.; PEZZOTI, P.; TAMBURRINI, A.; ROSSI, P.; DI FINE, M.; SMACCHIA, C.; SCHIESARI, A.; GATTEI, E.; ZUCCONI, R.; BALLARINI, P. Clinical cryptosporidiosis and human immunodeficiency virus (HIV)- induced immunosuppression: findings from a longitudinal study of HIV-positive and HIV-negative former injection drug users. *The Journ. Infect. Dis.*, 176: 969-75, 1997.
- 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* spp e cistos de *Giardia lamblia*. São Paulo, 1999. 132p. [Dissertação de mestrado- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

- REINTHALER, F. F. Epidemiology of cryptosporidiosis in children in tropical countries. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 33: 505, 1989.
- RIVERA, I.N.G. & MARTINS, M.T. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. *Rev. Ciênc. Farm.*, 17: 115-36, 1996.
- ROBERTS, W.G.; GREEN, P.H.R.; MA, J.; CARR, M.; GINSBERG, A.M. Prevalence of cryptosporidiosis in patients undergoing endoscopy- evidence for an asymptomatic carrier state. *Am. J. Med.*, 87: 537, 1989.
- ROBERTSON, L.J.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, H.V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3494-500, 1992.
- ROCHELLE, P.A.; DE LEON, R.; STEWART, M.H.; WOLFE, R.L. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 106-14, 1997.
- ROSE, J.B.; GERBA, C.P.; LOGSDON, G.A.; HAYES, E.; MATTI, T.; JURANEK, D.D. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in a distribution system after a waterborne outbreak. *Water Quality Technology Conference*. Baltimore, MD. Nov. 15-19. *J. Am. Water Works Assoc.*, 79: 47, 1987.
- ROSE, J.B. Occurrence and significance of *Cryptosporidium* in water. *J. Am. Water Works Assoc.*, 80: 53-8, 1988.
- ROSE, J.B. Occurrence and control of *Cryptosporidium* in drinking water. In *Drinking water microbiology*. New York: Springer-Verlag, 1990. p. 294-321.
- ROSE, J.B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annu. Rev. Public Health.*, 18: 135-61, 1997.
- SANCHEZ, P.S. Sorotipos de *Salmonella* em águas de esgoto e perfil de resistência a antimicrobianos. São Paulo, 1988. 229p. [Tese de doutorado- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- SATHE, P.V. ; KARANDIKAR, V.N.; GUPTE, M.D.; NIPHADKAR, K.B.; JOSHI, B.N.; POLAKHARE, J.K.; JAHAGIRDAR, P.L.; DEODHAR, N.S. Investigation report of an epidemic of typhoid fever. *Int. J. Epidemiol.*, 12: 215-9, 1983.
- 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.

- SCHMUNIS, G.A. & CORBER, S.J. Tourism and emerging and re-emerging infectious diseases in the americas: what physicians must remember for patient diagnosis and care. *Braz. J. Infect. Dis.*, 3: 31-49, 1999.
- SHEPHERD, R.C.; REED, C.L.; SINHA, G.P. Shedding of oocysts of *Cryptosporidium* in immunocompetent patients. *J. Clin. Pathol.*, 41: 1104, 1988.
- 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.
- SHIELD, J.; BAUMER, J.H.; DAWSON, J.A.; WILKINSON, P.J. Cryptosporidiosis- an educational experience. *J. Infect.*, 21: 297, 1990.
- SHUVAL, H.I.; ADIN, A. FATTAL, B.; RAWITZ, E.; YEKUTIEL, P. Wastewater irrigation in developing countries: health effects and technical solutions. 1986. 325p. [World Bank Technical Paper, 51; UNDP Project Management Report, 6].
- SHU-XIAN ZU; LI, JIN-FEN, J.; BARRET, L.J. FAYER,.; R.; SHU, SHU-YU, S.; McAULIFFE, J.F.; (Mandell, G.L. e cols.,1995). ROCHE, J.K. & GUERRANT, R.L. Seroepidemiologic study of *Cryptosporidium* infection in children from rural communities of anhui, China and Fortaleza, Brazil. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 51: 1-10, 1994.
- SIMMONS, O.D.; JULIANO, J.J.; HEANEY, C.D.; FRANCY, D.S.; SCHAEFER, F.W.; SOBSEY, M.D. Comparison of filtration methods for primary recovery of *Cryptosporidium parvum* from water. In: International simposium on waterborne pathogens extended abstracts., Milwaukee, Wisconsin, 1999.
- SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.*, 65: 262, 1955.
- SMITH, H.V.; PATTERSON, W.J.; HARDIE, R.; GREENE, L.A.; BENTON, C.; TULLOCH, W.; GILMOUR, R.A.; GIRDWOOD, R.W.A.; SHARP, J.C.M.; FORBES, G.I. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis caused by post-treatment contamination. *Epidemiol. Infect.*, 103: 703-15, 1989.
- SMITH, H.V. & ROSE, J.B. Waterborne cryptosporidiosis. *Parasitol. Today.*, 6: 8-12, 1990.
- SMITH, H.V. & SMITH, P.G. Parasitic protozoan in drinking water. *Endeavour.*, 14: 74-9, 1990.
- SMITH, H.V. & ROSE, J.B. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitol. Today.*, 14: 14-22, 1998.

- SOUZA, L.C. Salmonelas e coliformes de origem fecal em amostras de águas usadas na dessedentação de animais do município de Botucatu, São Paulo, 1984. 77p. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
- 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.
- TANGERMANN, R.H.; GORDON, S.; WIESNER, P.; KRECKMAN, L. An outbreak of cryptosporidiosis in a day care center in Georgia. *Am. J. Epidemiol.*, 133: 471, 1991.
- TAUNAY, A.E.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, 38: 119-27, 1996.
- TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, 38: 315-22, 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. São Paulo, 1998. 103p. [Dissertação de mestrado. Universidade Mackenzie].
- TRABULSI, L.R.; CAMPOS, L.C. LORENÇO, R. Salmoneloses. In: Veronesi, R.; Focaccia, R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Ateneu, 1997, p.856-63.
- TREPKA, M.J.; ARCHER, J.R.; ALTEKRUSE, S.F.; PROCTOR, M.E.; DAVIS, J.P. An increase in sporadic and outbreak-associated *Salmonella enteritidis* infections in Wisconsin: the role of eggs. *J. Infect.Dis.*, 180: 1214-9, 1999.
- TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in perspective. *Adv.Parasitol.*, 27:63, 1988.
- UK DEPARTMENT OF THE ENVIRONMENT. Transport and the regions. *Cryptosporidium* in water supplies. Available from <http://www.dwi.detr.gov.uk/crypto/bouo.htm>, 1998.
- UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium*. In: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4ed. London: Churchill Livingstone, 1995. p. 2500-10.
- UPTON, S.J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis Available from <http://www.ksu.edu/parasitology/topics>, April, 1999.

- USERA, M.A.; ECHEITA, A.; ALADUENA, A.; ALVAREZ, J.; CARRENO, C.; ORCAU, A.; PLANAS, C. Investigation of an outbreak of water-borne typhoid fever in Catalonia in 1994. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 13: 450-4, 1995.
- VASSILIADIS, P. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of *Salmonellas*: an overview. *J. Appl. Bacteriol.*, 54: 69-76, 1983.
- VESEY, G.; SLADE, J.P.; BYRNE, M.; SHEPERD, K.; FRICKER, C.R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 82-6, 1993a.
- VESEY, G.; SLADE, J.S.; BYRNE, M.; SHEPERD, 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.
- WHITMORE, T.N. & CARRINGTON, E.G. Comparison of methods for recovery of *Cryptosporidium* from water. *Water Sci. Technol.*, 27: 69-76, 1993.
- WHO. *Salmonella* surveillance. *Bull. Who.*, 58: 671-806, 1980.
- WHO. World Health Organization Report on Infectious Diseases REMOVING OBSTACLES TO HEALTHY DEVELOPMENT (on line). Available from <http://www.who.org/infectious-disease-report/pages/textonly.html>, 1999.
- WILLIAMS, B.M. Environmental considerations in salmonellosis. *Vet. Rec.*, 96: 318-21, 1975.
- WILSON, W.J. & BLAIR, E.M. Mc. V. Use of a glucose bismuth sulphite iron medium for the isolation of *B.typhosus* and *B. proteus*. *J. Hyg.*, 26: 374-91, 1927.
- WILSON, R.; ANDERSON, L.J.; HOLMAN, R.P.; GARY, C.W.; GREENBERG, H.B. Waterborne gastroenteritis due to the Norwalk agent: clinical and epidemiological investigation. *Am. J. Public. Health.*, 72: 72-8, 1982.
- WORCMAN-BARNINKA, D. Avaliação do método de enriquecimento diferencial em meio rappaport-vassiliadis semi-sólido modificado (MSRV) no isolamento de *Salmonella* spp. de alimentos, 1997. pg 74 [Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
- WRAY, C. & SOJKA, W.J. Review of the progress of dairy science: bovine salmonellosis. *J. Dairy Sci.*, 44: 383-425, 1977.

WUHIB, T.; SILVA, T. M.; NEWMAN, R.D.; GARCIA, L.S.; PEREIRA, M.L.; CHAVES, C.S.; WAHLQUIST, S.P.; BRIAN, R.T.; GUERRANT, R.L.; SOUSA, A.Q. Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.*, 170: 494-7, 1994.

ZUCKERMAN, U.; ARMON, R.; TZIPORI, S.; GOLD, D. Evaluation of a portable differential continuous flow centrifuge for concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 955-61, 1999.

8. ANEXOS

Material e Equipamentos utilizados para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp.

Equipamentos

Vasilhame de Pressão e porta filtro de aço inoxidável (Millipore)

Bomba de pressão positiva (PRIMAR- FAABE/ mod.141- tipo 2VC1/4)

Stomacher 400 Lab Blender (SEWARD- mod. BA7021)

Centrifuga Sorvall® RC 5C PLUS (Sorvall Products L.P.- mod.RC-5C+/ USA)

Centrífuga CELM (mod. LS-II)

Estufa (PRIMAR- FAABE/ mod. 216) a 35°C

Microscópio de Epifluorescência (DAS Leica DM LB- Germany)

Vortex (Tecnal- TE 162- mod. 162)

Banho Maria Techne Tempette TE-8A (mod. FAP8D)

Balança analítica AA 200- Denver Instrument Company

Balança Acculab V-1mg- Fisatom

PHmêtro digital PHD 10

Luz ultravioleta

Frascos plásticos de polipropileno com capacidade para 5L

Frascos de vidro (SHOTT) com capacidade para 10L

Frascos de diluição

Micropipetas 10, 100, 200 e 1000µL

Tubos de centrifuga com capacidade para 500mL e 50 mL

Pipetas guardadas de 1, 2, 5 e 10 mL

Erlenmeyer, Balão Volumétrico e Becker de Vidro Pyrex®

Provetas de 100, 200 e 1000mL

Pipetas pasteur

Funil de vidro Pyrex®

Fitas de pH

Materiais de Consumo

Membrana de acetato de celulose com 142mm de diâmetro e 1,2 µm de porosidade

Membrana de éster de celulose com 142mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade

Sacos Plásticos de Polipropileno (SEWARD)

Kit de Imunofluorescência Direta – Merifluor® *Cryptosporidium/ Giardia* Direct
Imunofluorescent Detection da Meridian Diagnostics, Inc/ USA.

Antissoros Polivalentes somático e flagelar – PROBAC

Meios de Cultura e Reagentes

Álcool metílico (SYNTH)

Cloreto de Cálcio – SIGMA

Bicarbonato de Sódio – SIGMA

Hidróxido de Sódio - MERCK

Ácido Sulfâmico – SIGMA

Acetona - MERCK

Etanol - MERCK

Solução eluente (Tween 80, 1%; SDS 1% e PBS 10X)

Tampão formalina a 10%

Tween 80 a 0,001%

Novobiocina -INLAB

Colilert 18, IDEXX-USA

Hipoclorito de sódio 10%

Preparações de Soluções e Meios

Foram utilizados de preferência meios desidratados, de procedência DIFCO e OXOID, cujo preparo obedeceu às instruções dos fabricantes.

Partes representativas de cada partida dos meios preparados foram submetidos a testes de controle de qualidade para se verificar sua esterilidade, especificidade e seletividade.

Meios de Enriquecimento

- Caldo selenito com novobiocina segundo Pessoa & Peixoto, 1971

Obtido sob a forma desidratada do laboratório DIFCO, USA preparado segundo as recomendações do fabricante e adicionando-se 0,04g de novobiocina sódica como impediante.

- Meio Rappaport- Vassiliadis segundo Vassiliadis, 1983

Obtido sob a forma desidratada do laboratório OXOID, USA preparado segundo as recomendações do fabricante.

Meios Seletivos Indicadores

- Ágar Verde Brilhante, descrito por Kristensen, Lester e Jürgens em 1925 e modificado por Kauffman em 1966 (ágar BG)

Obtido sob a forma desidratada do laboratório DIFCO, USA preparado segundo as recomendações do fabricante.

- Ágar Xilose Lisina Desoxicolato, segundo Taylor (ágar XLD)

Obtido sob a forma desidratada do laboratório OXOID, USA preparado segundo as recomendações do fabricante.

- Ágar Sulfito de Bismuto, segundo Wilson e Blair (BS ágar)

Obtido sob a forma desidratada do laboratório OXOID, USA preparado segundo as recomendações do fabricante.

Meio de Identificação Presuntiva

- Ágar Tríplice Açúcar Ferro (ágar TSI)

Obtido sob a forma desidratada do laboratório DIFCO, USA preparado segundo as recomendações do fabricante.

Meio de Conservação

- Ágar Trypticase Soja (ágar TSA)

Obtido sob a forma desidratada do laboratório DIFCO, USA preparado segundo as recomendações do fabricante.

- Solução de Ácido Sulfâmico 10%

Ácido Sulfâmico (Sigma)p.a ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$)	20 g
Água destilada q.s.p.	200mL

O ácido sulfâmico foi preparado no momento do uso sendo que 20g de $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ foi devidamente pesado e dissolvido em água destilada sob agitação para um volume final de 200mL.

- Solução de Bicarbonato de sódio 1M

Bicarbonato de sódio (Sigma) p.a (NaHCO_3)	8,4g
Água destilada q.s.p	100mL

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 100mL.

- Solução de Cloreto de Cálcio 1M

Cloreto de Cálcio (Sigma)p.a (CaCl_2)	14.7g
Água destilada q.s.p.	100mL

A solução foi preparada no momento do uso sendo que o cloreto de cálcio foi devidamente pesado e dissolvido em água destilada, sob agitação para um volume final de 100mL.

- Hidróxido de sódio 5M

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

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

- Solução Estoque Tween 80 1%

Tween 80 (Sigma)	1mL
Água destilada	99mL

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

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

- Solução Eluente (solução detergente tamponada) pH 7,4

Dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%	100mL
Tween 80 1%	100mL
Tampão fosfato (PBS) 10X	100mL
Antifoam A (Sigma)	0,1mL
Água destilada q.s.p.	1000mL

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

- Solução Estoque de Tampão fosfato 10X concentrada (PBS10X)

Cloreto de sódio (Merck) p.a. (NaCl)	80g
Fosfato de potássio monobásico (J.T.Baker) p.a. (KH ₂ PO ₄)	2g
Fosfato de sódio bibásico (Sigma) p.a (NaPO ₄ 12H ₂ O)	29g
Cloreto de potássio (Merck) p.a. (KCl)	2g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Todos os reagentes foram devidamente pesados e diluídos em água destilada para um volume final de 1000mL.

- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS 1%)

SDS (Sigma) p.a. (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	10g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Dissolveu-se o SDS em água destilada para um volume final de 1000mL

- Tampão Formalina 10%

Fosfato dissódico hidrogenado (Na ₂ HPO ₄)	0,762g
Fosfato de sódio hidrogenado (NaH ₂ PO ₄)	0,019g
Formalina	100mL
Água destilada q.s.p.	1000mL

Dissolveu-se os sais em formalina completando-se o volume de 1000mL com água destilada.

ABSTRACT

A lot of studies have shown the value on researching in sewage several pathogenic microorganisms to determine possible enteropathogens that are present in communities and the risks for public health.

The aims of this study were to determine the occurrence and the levels of *Cryptosporidium* spp and *Salmonella* spp in sewage and wastewater in São Paulo since there is no recent studies of this pathogens in sewage of this city. A total of twenty four samples were collected weekly from July to December of 1998 in an effluent sewage station (12) and a river (12) that receives a domestic discharge of São Paulo city. The detection of *Cryptosporidium* oocysts was made using two procedures for concentration by flocculation (Vesey et alii, 1993) and by membrane filtration (Aldom & Chagla, 1995), and oocysts were identified by direct immunofluorescence assay and the presence was confirmed by phase contrast microscopy. *Salmonella* isolation was made using membrane filtration method (Martins, 1979). The results showed the occurrence of *Cryptosporidium* sp and *Salmonella* spp in 100% of samples. A total of 221 strains of *Salmonella* were isolated and among the prevalent serotypes were detected *S. panama*, *S. agona*, *S. infantis*, *S. hadar*, *S. onakan* e *S. braenderup*.

The presence of *Salmonella* and *Cryptosporidium* in environmental samples studied in São Paulo can represent a possible source for dissemination of these pathogens in aquatic environment and community.