

**Universidade Federal de Santa Catarina
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

Juliane Araújo Greinert

**Avaliação de técnicas
para detecção e quantificação
de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.
em água de piscina**

**Florianópolis
2002**

Juliane Araújo Greinert

**Avaliação de técnicas
para detecção e quantificação
de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.
em água de piscina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, visando a
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Regina Monte Barardi

Florianópolis
2002

“Avaliação de técnicas para detecção e quantificação de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de piscina”

POR

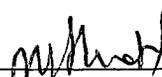
JULIANE ARAÚJO GREINERT

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pela Orientadora e membros da Comissão Examinadora.

Comissão Examinadora:



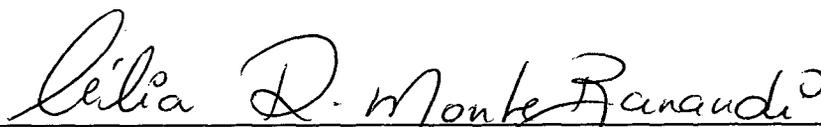
Prof.^a. Dr.^a. Cláudia Maria Oliveira Simões
CIF/CCS/UFSC



Prof. Dr. Mário Steindel
MIP/CCB/UFSC



Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis
FIT/CCA/UFSC



Prof.^a. Dr.^a. Célia Regina Monte Barardi – MIP/CCB/UFSC

**Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

Florianópolis, Março de 2002.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Aplicada, coordenado pelas professoras Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões (Depto. de Ciências Farmacêuticas, CCS) e Dr^a. Célia Regina Monte Barardi (Depto. de Microbiologia e Parasitologia, CCB), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Este trabalho recebeu apoio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e, também, do CNPq através da concessão da bolsa de Mestrado.

*“O homem argumenta, a
natureza age.”*

(Voltaire)

*“O que sabemos é uma gota, o
que ignoramos é um oceano.”*

(Isaac Newton)

Dedico este trabalho aos meus pais queridos, José e Irene, pela educação, por seus exemplos, pelo incentivo e por seu amor. A minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Cláudia Maria Oliveira Simões, por seus ensinamentos, pela orientação, pelo apoio e sua amizade que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Prof.^a Célia Regina Monte Barardi, pela orientação, compreensão e amizade.

Ao Prof. James Joseph Smith, da *Montana Microbiological Services*, pela grande contribuição na execução deste trabalho, pelos seus ensinamentos e sua amizade.

Aos Profs. Mário Steindel e Edmundo Grisard, pelo exemplo de profissionalismo, pelas dicas valiosas e pela amizade.

Ao Prof. Maurício Sedrez dos Reis, Depto. de Fitotecnia, CCA, pela sua disposição em atender-me, pelos seus ensinamentos e pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Nelson da Silva Aguiar, Centro de Desportos, pela liberação da piscina para a realização do estudo.

Ao funcionário da UFSC, Hélio Gregório Rosa, pelo auxílio na coleta das amostras.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao pessoal do Laboratório de Virologia Aplicada, Wanessa, Caroline, Dóris, Thaís, Roniele, Alexandre, Pedro, Cibele, Carla, Luciane, Alessandra, Christiane, Márcia e Cecília pelo carinho, companheirismo, amizade e dedicação.

À Danielle, pelo auxílio na realização deste trabalho e, principalmente, por sua amizade.

À Chrystianne, Marilza e Rogério Goulart, pela amizade, apoio e incentivo.

Ao meu namorado, Rogério, pelo amor, carinho, compreensão e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço em especial aos meus pais, José e Irene, e à minha irmã, Jaqueline, pelo amor, carinho, apoio e incentivo que sempre me proporcionaram.

A Deus pela força e coragem em perseverar.

Aos professores, colegas e amigos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação, gostaria de expressar a minha gratidão.

Juliane

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS | iii |
| LISTA DE TABELAS..... | v |
| RESUMO..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| L INTRODUÇÃO | 1 |
| II. OBJETIVOS..... | 4 |
| II.1 GERAL | 4 |
| II.2 ESPECÍFICOS | 4 |
| III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| III.1 ÁGUA COMO VETOR DE PARASITOSSES..... | 5 |
| III.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> | 11 |
| III.2.1 <i>Histórico</i> | 11 |
| III.2.2 <i>Morfologia e Biologia</i> | 12 |
| III.2.3 <i>Patogenia</i> | 14 |
| III.2.4 <i>Epidemiologia</i> | 15 |
| III.2.5 <i>Diagnóstico laboratorial</i> | 15 |
| III.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>GIARDIA</i> | 16 |
| III.3.1 <i>Histórico</i> | 16 |
| III.3.2 <i>Morfologia e Biologia</i> | 17 |
| III.3.3 <i>Patogenia</i> | 19 |
| III.3.4 <i>Epidemiologia</i> | 20 |
| III.3.5 <i>Diagnóstico laboratorial</i> | 21 |
| III.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE A PISCINA OLÍMPICA DA UFSC | 22 |
| III.5 TÉCNICAS EMPREGADAS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>GIARDIA</i> SPP. E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. EM ÁGUA..... | 23 |
| IV. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 32 |
| IV.1 MATERIAL DE ESTUDO | 32 |
| IV.1.1 <i>Amostras de água provenientes da piscina olímpica da UFSC</i> | 32 |
| IV.1.2 <i>Água destilada</i> | 32 |
| IV.2 METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. E <i>GIARDIA</i> SPP. EM ÁGUAS | 32 |
| IV.2.1 <i>Protocolo 1</i> | 33 |
| IV.2.1.1 <i>Procedimento para concentração das amostras de água destilada</i> | 33 |
| IV.2.1.2 <i>Separação imunomagnética</i> | 34 |
| IV.2.1.3 <i>Preparação das amostras para detecção e quantificação por imunofluorescência direta</i> | 35 |
| IV.3.2 <i>Protocolo 2</i> | 36 |
| IV.3.2.1 <i>Procedimento para concentração das amostras de água da piscina olímpica da UFSC</i> | 36 |

| | |
|---|-----------|
| IV.3.2.2 Separação imunomagnética..... | 37 |
| IV.3.2.3 Preparação da amostra para detecção e quantificação por imunofluorescência..... | 38 |
| IV.3 METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM ÁGUAS..... | 39 |
| IV.3.1 Ensaio presuntivo..... | 39 |
| IV.3.2 Ensaio confirmativo..... | 40 |
| IV.3.2.1 Confirmação para coliformes totais..... | 40 |
| IV.3.2.2 Confirmação para coliformes fecais..... | 41 |
| IV.4 CONTROLE DO PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS..... | 41 |
| IV.5 PRECAUÇÕES..... | 41 |
| IV.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 42 |
| V. RESULTADOS..... | 43 |
| V.1 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. E <i>GIARDIA</i> SPP. EM ÁGUA..... | 43 |
| V.1.1 Avaliação da recuperação dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. por precipitação com CaCO ₃ | 43 |
| V.1.2 Avaliação dos controles de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp..... | 46 |
| V.1.3 Avaliação da recuperação dos oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. em diferentes fases do processamento das amostras..... | 47 |
| V.1.4 Avaliação da metodologia para análise das amostras de água da retrolavagem dos filtros da piscina olímpica da UFSC..... | 49 |
| V.2 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PADRONIZADA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. E CISTOS DE <i>GIARDIA</i> SPP. EM AMOSTRAS DE ÁGUA DA RETROLAVAGEM DOS FILTROS DA PISCINA OLÍMPICA DA UFSC..... | 52 |
| V.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DA PISCINA OLÍMPICA DA UFSC..... | 54 |
| VI. DISCUSSÃO..... | 55 |
| VI.1 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. E <i>GIARDIA</i> SPP. EM ÁGUA..... | 57 |
| VI.2 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PADRONIZADA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OOCISTOS E CISTOS EM ÁGUA DA RETROLAVAGEM DOS FILTROS DA PISCINA..... | 64 |
| VI.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DA PISCINA..... | 65 |
| VI.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 66 |
| VII. CONCLUSÕES..... | 67 |
| VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 69 |
| ANEXOS..... | 84 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microscopia eletrônica de *Cryptosporidium* spp.: mucosa do trato intestinal revestida por oocistos. Fonte: <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/cryptosporidium.html>.....13
- Figura 2.** Ciclo biológico do *Cryptosporidium*. Fonte: HEYWORT, 1992.....14
- Figura 3.** Figura 3A: Trofozoíto de *Giardia lamblia* (microscopia eletrônica).
Fonte:http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/giardia_sem.html Figura 3B: Cisto de *Giardia lamblia* corado com iodo. Fonte: http://www.medstat/AllSmallJpg/Giardia_cyst2_Despommier.jpg.....18
- Figura 4.** Ciclo biológico e mecanismos de transmissão e reprodução da *Giardia lamblia*. 1. Fonte: Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>.....19
- Figura 5.** Piscina Olímpica da UFSC Fonte: Centro de Desportos da UFSC.....23
- Figura 6.** Esquema geral da separação imunomagnética. Fonte: Autora.....30
- Figura 7.** Cistos de *Giardia* spp.(forma oval) e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (forma arredondada) marcados em verde com isotiocianato de fluoresceína (FITC), observados no microscópio de epifluorescência. Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>.....31
- Figura 8.** Fluxograma representando o esquema geral do protocolo 1.....33
- Figura 9.** 9A: Estante magnética. Fonte: Autora; 9B: Estante magnética sob agitação orbital. Fonte: Autora.....35
- Figura 10.** Fluxograma representando o esquema geral do protocolo 2.....36
- Figura 11.** 11A: Tubos de 50ml, acoplados ao imã, para separação imunomagnética. Fonte: Autora; 11B: Tubos de 50ml, acoplados ao imã, para separação imunomagnética, sobre a mesa de agitação.Fonte: Autora.....38
- Figura 12.** 12A.Cistos de *Giardia* spp. marcados em verde com FITC e em vermelho com Texas Red® (Color Seed CG®). 12B. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. marcados em verde com FITC e em vermelho com Texas Red® (ColorSeed CG®). Fonte: Autora.....39

Figura 13. Porcentagem média de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em água destilada, em três diferentes pontos do processo (P1= antes da precipitação; P2= antes da centrifugação; P3= antes da separação imunomagnética). Médias de três repetições; as letras minúsculas indicam valores, que diferem estatisticamente entre si, para o Teste de Tukey (5%).....44

Figura 14. Porcentagem média de recuperações dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em água destilada, variando as concentrações de NaHCO_3 0,1M e CaCl_2 0,1M utilizados para a precipitação com CaCO_3 . Médias de três repetições; as letras minúsculas indicam valores, que diferem estatisticamente entre si, para o Teste de Tukey (5%).....45

Figura 15. Porcentagem média de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em água destilada, em três diferentes pontos do processo (P1= antes da precipitação; P2= antes da centrifugação; P3= antes da separação imunomagnética), com volume de 1L. de água destilada. Média de três repetições; as letras minúsculas indicam valores, que diferem estatisticamente entre si, para o Teste de Tukey (5%).....48

Figura 16. Porcentagem média de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em amostras de água da piscina olímpica da UFSC, contidos no padrão interno ColorSeed C&G®.....54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Exemplos do emprego da separação imunomagnética para purificação de parasitas.....29
- Tabela 2.** Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em diferentes pontos do processo, utilizando volume de 10 L de água destilada.....44
- Tabela 3.** Avaliação da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em água destilada, a partir de diferentes volumes de amostra.....45
- Tabela 4.** Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em água destilada, a partir de diferentes volumes de amostra.....45
- Tabela 5.** Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em água destilada, em função das concentrações utilizadas de CaCl_2 0,1M e NaHCO_3 0,1M (1%, 2% e 3%).....46
- Tabela 6.** Avaliação da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em água destilada, utilizando diferentes controles internos.....46
- Tabela 7.** Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em água destilada, utilizando diferentes controles.....47
- Tabela 8.** Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em água destilada, em três diferentes pontos do processo.....48

- Tabela 9.** Avaliação da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em amostras de água da piscina, sem e com tratamento prévio com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%, analisando diferentes volumes na etapa da separação imunomagnética.....50
- Tabela 10.** Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., em amostras de água da piscina, sem tratamento prévio com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%, analisando volumes de 6 e 50 ml na etapa da separação imunomagnética.....50
- Tabela 11.** Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em amostras de água destilada e da piscina, sem tratamento prévio com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%, analisando o volume de 50ml na etapa da separação imunomagnética.....51
- Tabela 12.** Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em amostras de água da piscina, sem e com tratamento prévio com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%, analisando o volume de 50ml na etapa da separação imunomagnética.....51
- Tabela 13.** Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em amostras de água destilada e da piscina, com tratamento prévio com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%, analisando o volume de 50ml na etapa da separação imunomagnética.....52
- Tabela 14.** Avaliação da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. contidos no padrão interno ColorSeed C&G®, relacionando-a com o volume dos precipitados obtidos e resultados das análises das amostras de água coletadas da piscina olímpica da UFSC.....53

RESUMO

As doenças de veiculação hídrica são um importante problema de saúde pública, pois colocam toda a população em risco. A *Giardia lamblia* e o *Cryptosporidium parvum* são responsáveis por causar várias epidemias de gastroenterites, após a utilização de água para consumo humano e águas recreacionais contaminadas. O número de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. presentes na água geralmente é baixo, portanto as técnicas empregadas para detecção e quantificação devem apresentar alta sensibilidade e especificidade. Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes metodologias para detectar e quantificar cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água de piscina. Assim, foram padronizadas as metodologias de precipitação com carbonato de cálcio, centrifugação, separação imunomagnética e imunofluorescência direta para detecção e quantificação dos cistos e oocistos em água da piscina olímpica da UFSC. O percentual de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. semeados em um volume de 10L de água destilada foi de $0,67 \pm 0,17$. Foram testadas concentrações de 1%, 2%, e 3% de NaHCO_3 0,1M e 1%, 2%, e 3% de CaCl_2 0,1M para otimização da precipitação com CaCO_3 , resultando nos respectivos percentuais de recuperações de oocistos semeados em 1L de água destilada: $20,33 \pm 6,03$, $10,67 \pm 2,51$ e $5,67 \pm 1,53$. As porcentagens de recuperação do padrão interno ColorSeedCG®, semeado em 1L de água destilada, foram de $20,67 \pm 0,58$ para oocistos e $21,67 \pm 2,52$ para cistos. A técnica padronizada (1% de NaHCO_3 0,1M e 1% de CaCl_2 0,1M e ColorSeedCG® semeado em 1L de água) resultou em recuperações de $2,67 \pm 1,15$ para oocistos e $3,33 \pm 1,53$ para cistos em água de retrolavagem dos filtros da piscina. Modificações, tais como a inclusão de uma pré-lavagem da amostra com Tween 20® a 0,01% e utilização de volumes maiores no processo de separação imunomagnética, resultaram em percentuais de recuperação de $23,00 \pm 4,36$ para oocistos e $18,67 \pm 2,08$ para cistos. Após análise das amostras durante os meses de dezembro de 2000 a agosto de 2001, observou-se uma grande homogeneidade nos resultados de recuperação (% de recuperação dos oocistos = $21,67 \pm 5,06$, CV=23%; porcentagem de recuperação de cistos = $21,00 \pm 3,54$, CV=17%). Nos meses de dezembro de 2000 e fevereiro de 2001, ocorreu positividade para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., indicando a necessidade de maior controle dos usuários da piscina devido a presença desses parasitas. As amostras de água da piscina foram negativas para coliformes fecais e totais. A combinação das técnicas de precipitação com CaCO_3 , centrifugação, separação imunomagnética e a imunofluorescência direta, mostrou ser uma ferramenta eficaz para detecção e quantificação de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de piscina.

Palavras-chave: *Giardia* spp.; *Cryptosporidium* spp.; detecção; piscina; água

ABSTRACT

Waterborne disease presents an important public health problem, as large populations are put at risk. The waterborne protozoan pathogens *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* are responsible numerous outbreaks of gastroenteritis, resulting from contaminated drinking and recreational waters. Numbers of waterborne *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts are generally low. In addition, they are most often found with other, non-pathogenic protozoans and microscopic particulate materials. Therefore, techniques employed for their detection and quantification must be of high sensitivity and specificity. The objective of this work was the detection and quantification of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in chlorinated public swimming pool water. For this purpose, the methodologies of calcium carbonate precipitation, centrifugation, immunomagnetic separation and direct immunofluorescence were standardized for the detection and quantification of cysts and oocysts in the water of the Olympic swimming pool at the Federal University of Santa Catarina (UFSC). Recovery of *Cryptosporidium* spp. oocysts seeded in a 10 L volume of distilled water was $0.67 \pm 0.17\%$. Concentrations of 1, 2, 3% of NaHCO_3 0.1 M and 1, 2, 3% of CaCl_2 0,1M were tested for the optimal CaCO_3 precipitation of oocysts seeded in a 1L of distilled water. These resulted in recoveries of $20.33 \pm 6.03\%$, $10.67 \pm 2.51\%$ and $5.67 \pm 1.53\%$, respectively. Percent recoveries using ColorSeedCG® as an internal standard seeded in a 1L of distilled water were 20.67 ± 0.58 for *Cryptosporidium* oocysts and $21.67 \pm 2.52\%$ for *Giardia* cysts. The standardized technique (1% NaHCO_3 0,1M and 1% of CaCl_2 0,1M, ColorSeedCG® seeded in a 1L of water) resulted in recoveries of $2.67 \pm 1.15\%$ of oocysts and $3.33 \pm 1.53\%$ of cysts from swimming pool filter backwash waters. Modifications, such as the inclusion of a sample pre-wash with 0.01% (v/v) Tween 20®, and utilization of greater immunomagnetic separation processing volumes, resulted in percentage recoveries of $23.00 \pm 4.36\%$ for oocysts and $18.67 \pm 2.08\%$ for cysts. Analysis of samples during the period December 2000 through August 2001 indicated similar recovery results (oocysts = $21.67 \pm 5.06\%$, CV=23%; cysts = 21.00 ± 3.54 , CV= 17%.) In December 2000 and February 2001 positive results for *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* spp. occurred in UFSC filter backwash waters. The presence of these parasites indicated the necessity for greater control of the swimming pool users. During these periods swimming pool water samples were negative for total and fecal coliforms. The combination of CaCO_3 precipitation, centrifugation, immunomagnetic separation and direct immunofluorescence techniques when applied to filter backwash samples was shown to be a effective tool for the detection and quantification of *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* spp. in swimming pool water.

I. INTRODUÇÃO

As doenças infecto-contagiosas constituem um problema relevante em saúde pública, e são apontadas como a principal causa de morte no mundo. A incidência de muitas doenças infecciosas, que já eram controladas e o aparecimento de novas infecções causadas por patógenos antes desconhecidos ou mesmo patógenos já conhecidos, mas veiculados de forma diferente da habitual, segundo MARSHALL *et al.* (1997) foi decorrente dos seguintes fatos:

- a evolução dos meios de transporte, que colaboram para a rápida disseminação de patógenos;
- o uso indiscriminado de medicamentos anti-infecciosos, que tem como consequência o desenvolvimento de mecanismos de resistência dos microrganismos;
- as alterações do comportamento sexual humano, que contribuem para o aumento da incidência de certas doenças sexualmente transmissíveis;
- a destruição dos ecossistemas, que resulta no desequilíbrio ecológico e conseqüente, veiculação de patógenos humanos através do meio ambiente.

As doenças, que podem ser transmitidas através de alimentos contaminados, águas residuais, água para consumo e águas recreacionais, são um importante problema sanitário por colocar toda a população em risco (ROSE & SLIFKO, 1999).

Muitos agentes infecciosos, veiculados através de águas e alimentos, podem causar doenças em humanos. Dentre eles os principais estão: bactérias (*Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Leptospira*, *Escherichia* etc.), vírus (rotavírus, vírus da hepatite A, enterovírus, vírus Norwalk, adenovírus, poliovírus, echovírus, vírus coxsackie A e B etc.), helmintos (*Schistosoma*, *Taenia*, *Dracunculus medianensis*, *Echinococcus granulosus*, *Ascaris lumbricoides* etc) e protozoários (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba castellani*, *Naegleria fowleri*, *Microcystis aeruginosa* etc.) (MACÊDO, 2000).

Infecções múltiplas provocadas por patógenos entéricos (transmitidos por alimentos e/ou águas) são muito comuns nos países em desenvolvimento. No caso específico de protozoários intestinais humanos, o *Cryptosporidium parvum* aparece frequentemente associado com a *Giardia lamblia* (TZIPORI, 1988).

Os cistos de *Giardia* spp. e os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são amplamente encontrados, como contaminantes de águas marinhas (JOHNSON *et al.*, 1997), de águas não tratadas e liberadas para consumo e recreação (WALLIS *et al.*, 1996; BUKHARI *et al.*, 1997; KARANIS, SCHOENEN, SEITZ, 1998; FRANCO, ROCHA-EBERHARDT, CANTUSIO NETO, 2001; ONO *et al.*, 2001). Tanto a *Giardia* spp. quanto o *Cryptosporidium* spp. são, freqüentemente, os agentes causais de inúmeras epidemias de diarreia ocorridas por contaminação da rede pública de distribuição de água (FISK, 1987; RICHARDSON *et al.*, 1991; MORRIS, NAUMOVA, GRIFFITHS, 1998), em viajantes que ingeriram água contaminada (GOSTIN *et al.*, 2000), por ingestão de alimentos contaminados (ROSE & SLIFKO, 1999) e após a utilização de piscinas contaminadas (BELL *et al.*, 1993; McANULTY, FLEMING, GONZALEZ, 1994; MACKENZIE, KAZMIERCZAK, DAVIS, 1995).

Atualmente, as piscinas são locais de fácil acesso à prática de atividades físicas consideradas importantes para a saúde e a convivência social. A OMS (Organização Mundial da Saúde) considera a saúde como um estado completo de bem-estar físico, mental e social e não apenas um estado de ausência de doenças. Assim, a utilização de piscinas combina atividades físicas e sociais, mas dependendo do tratamento da água e dos critérios utilizados para seleção dos usuários, propicia riscos à saúde dos banhistas, com a transmissão de doenças como micoses, criptosporidiose e a giardíase, entre outras.

Segundo MACÊDO (2000), a presença de banhistas portadores de determinadas patologias podem contaminar outros usuários destes locais de banho coletivo. Outro aspecto a ser considerado na transmissão desses patógenos é a qualidade da água da piscina, pois um tratamento inadequado, apesar de levar à redução da flora bacteriana ainda não atinge níveis considerados seguros, o que também facilita a transmissão de doenças.

Em Santa Catarina, o Decreto nº 24.981 da Secretaria de Saúde (SANTA CATARINA, 1985) dispõe sobre o abastecimento de água no Estado, e preconiza que as águas de piscina destinadas à balneabilidade devem seguir os parâmetros de potabilidade fixados na Legislação Federal em vigor, e obedecer ainda os seguintes requisitos: pH entre 7,2 e 8,0; cloro residual entre 0,3 e 0,7 ppm podendo chegar até a 2 ppm quando a água for rica em sais de amônia; contagem de bactérias inferior a 200 colônias por mL em 80% de 5 ou mais amostras consecutivas, e ausência de bactérias do grupo coliforme (coliformes fecais e totais) em 10mL de amostra em 5 amostras consecutivas.

Segundo a Legislação Federal em vigor (BRASIL, 2000), a água de alimentação das piscinas deve apresentar as mesmas características de uma água potável, ou seja, deve respeitar os parâmetros estabelecidos pela Portaria nº 1469 do Ministério da Saúde. Esta Portaria, inclusive, recomenda a pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir um padrão de ausência de vírus, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (BRASIL, 2000).

Segundo ROSE *et al.* (1989), o número de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. presentes na água geralmente é baixo, sendo que a presença de algas e outros contaminantes pode interferir na detecção e identificação destes protozoários. Portanto, as técnicas utilizadas para a concentração, detecção e identificação destes patógenos nas amostras ambientais devem ser mais sensíveis e específicas. Internacionalmente, existem vários testes em desenvolvimento para a realização do monitoramento destes protozoários em água. No Brasil, apesar da exigência da Portaria nº 1469, eles ainda não são empregados rotineiramente.

Pelo exposto, fica evidenciada a necessidade e a importância da detecção e da quantificação de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em águas tratadas ou não, para consumo e para recreação humana.

II. OBJETIVOS

II.1 Geral

Avaliar diferentes metodologias para detectar e quantificar cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água de piscina.

II.2 Específicos

- Padronizar o método de concentração dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água através da precipitação com carbonato de cálcio.
- Padronizar a técnica de separação imunomagnética acoplada à imunofluorescência direta para a purificação, detecção e a quantificação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. semeados em água destilada.
- Aplicação das técnicas para detecção e quantificação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água provenientes da piscina olímpica da UFSC.
- Avaliação da eficiência das técnicas empregadas através da comparação dos valores de recuperação obtidos neste trabalho com valores descritos na literatura.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1 ÁGUA COMO VETOR DE PARASIToses

Conservar e proteger a saúde do ambiente foi o centro das preocupações do novo modelo de desenvolvimento planejado na Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento – UNCED 92, realizada em junho de 1992 no Rio de Janeiro. No mesmo ano, na Conferência Mundial de Meio Ambiente/Rio 92, em um documento assinado por 170 chefes de Estado - Agenda 21, ficaram decididas as principais ações em defesa da água. Segundo ANDREOLI, LARA, FERNANDES, (1999), o documento propõe ações relativas à avaliação dos recursos hídricos, proteção da qualidade das águas e dos ecossistemas aquáticos, abastecimento de água potável, saneamento, e impactos das mudanças climáticas sobre os recursos hídricos.

A água é um dos principais componentes dos organismos vivos, sendo que nos humanos corresponde a 70% do peso corporal e 90% da composição do sangue. O desenvolvimento das civilizações conduziu à necessidade de melhorar as condições de vida, e o armazenamento da água era fundamental para que estes povos pudessem sobreviver em épocas de escassez de água. A importância da utilização dos recursos hídricos e o seu domínio podem ser observados conforme a cronologia da utilização da água, apresentada por MACÊDO (2000) como segue:

- 9.000 a.C.: potes de barro, não cozidos, surgem para o armazenamento da água;
- 7.000 a.C.: surgem os potes de cerâmica cozida para o armazenamento da água;
- 5.000 a.C.: a irrigação começa a ser utilizada na Mesopotâmia e no Egito, com canais de drenagem;
- 2.900 a.C.: construção da primeira represa no Egito, pelo Faraó Menes para abastecer a capital Memphis;
- 2.500 a.C.: primeiro sistema eficiente de distribuição de água, no vale do Indo, Índia, que abastecia a cidade de Mohenjo-daro, e possuía canais para levar a água até às casas e um sistema completo de coleta de esgoto;
- 1.900 a.C.: construção da primeira represa de pedra pelos Assírios;

- 700 a.C.: construção do primeiro aqueduto por Ezequiel, rei de Judá, para abastecer a cidade de Jerusalém;
- 691 a.C.: o rei da Assíria, Sennaquebe, constrói um canal de 80 Km e um aqueduto de 330m;
- século XVIII: construção da primeira usina de dessalinização de água, no Chile, na cidade de Las Salinas; o sistema utilizava energia do sol para evaporar e condensar a água;
- 1829: construção da primeira estação de tratamento de água em Londres: a água do rio Tâmesa era filtrada com areia; o cloro começou a ser utilizado ainda no século XIX;
- 1946: a primeira grande usina de dessalinização de água é instalada no Kuwait;
- 1951: inicia-se o processo de fluoretação da água.

A partir da cronologia do aproveitamento da água, percebe-se que a água é essencial para o desenvolvimento da vida humana, uma vez que praticamente todas as atividades realizadas pelo homem, sejam elas urbanas, industriais ou agropecuárias dependem substancialmente dela (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1994; VIANA, 1997).

Segundo a ONU (Organização das Nações Unidas), através do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), vinte e uma nações sofrem com a falta de água e o consumo mundial foi multiplicado por seis no último século (RAINHO, 1999). Para MACÊDO (2000), aliadas à falta de água, estão ainda a sua má distribuição e a contaminação desse recurso.

Segundo alguns pesquisadores, as fontes de poluição dos recursos hídricos estão divididas em três grandes grupos. O primeiro grupo é o das águas residuárias urbanas (esgotos) que contêm detritos urbanos, restos de alimentos, sabões e detergentes. Para GÜNTER (1980), por possuir dejetos humanos, esse recurso está contaminado com bactérias e parasitas, alguns dos quais são patogênicos ao homem, pois podem ser provenientes de pessoas infectadas doentes ou portadoras de agentes infecciosos. No segundo grupo, se enquadram as águas residuárias de origem agropecuária, contendo dejetos que, por meio das chuvas e proximidade aos leitos de rios ou nascentes, atingem

águas superficiais ou lençóis subterrâneos veiculando zoonoses e agrotóxicos (MOTA, 1995). O terceiro grupo é o das águas residuárias industriais, onde se observa uma grande quantidade de substâncias tóxicas, como por exemplo, compostos orgânicos, petróleo e derivados, detergentes e compostos inorgânicos, incluindo metais pesados (GÜNTER, 1980; VARELA, 1987; MOTA, 1995).

Conforme ANDREOLI (1999), o tratamento das águas residuárias urbanas, da agropecuária e industriais, tem importância para a saúde pública e para a conservação dos mananciais. Isto levou, principalmente nos países desenvolvidos, ao desenvolvimento de tecnologias para o tratamento e monitoramento da sanidade dos recursos hídricos.

A água, tão necessária à vida humana, pode ser responsável por muitas doenças, quando serve de veículo para a transmissão de uma variedade de microrganismos resultantes da ingestão de água contaminada pelo ser humano, do emprego de água poluída para irrigação, pesca e recreação, ou seja, as chamadas doenças de veiculação hídrica (MACÊDO, 2000). Atualmente, cerca de 1,4 bilhão de pessoas não tem acesso à água limpa. Conforme RAINHO (1999), a cada oito segundos morre uma criança devido a doenças relacionadas com o uso de água contaminada, e 80% das enfermidades no mundo são originárias desse tipo de contaminação.

A doença diarréica é a quarta maior causa de mortes no mundo, resultando em torno de 3 milhões de óbitos/ano e está diretamente relacionada com a falta de saneamento (MURRAY & LOPEZ, 1997). A maioria delas ocorre em crianças menores de 5 anos de idade, em países em desenvolvimento (BERN *et al.*, 1992).

Nos Estados Unidos, a gastroenterite é a segunda maior causa de infecções (sendo a primeira as infecções respiratórias virais). Segundo DENNHEY (2000), o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que, aproximadamente 35 milhões de episódios de diarréias ocorrem anualmente em crianças, resultando em mais de 200.000 hospitalizações e cerca de 500 mortes.

No Brasil, 60% das internações anuais são resultado da falta de saneamento e 30% das mortes de crianças com menos de um ano ocorrem devido à diarréia. Dos municípios

brasileiros apenas 8% possuem tratamento adequado de esgoto e 58% não têm estações de tratamento de água, o que corresponde a 54 milhões de pessoas sem acesso à rede de distribuição de água, e mais de 100 milhões não têm esgotos tratados (MACÊDO, 2000).

Dentre as enfermidades mais comumente transmitidas pela água incluem-se a amebíase, o cólera, as hepatites A e E, as shigeloses, as infecções por rotavírus, a giardíase e a criptosporidiose (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1994; MOTA, 1995; DESSELBERGER, 1998).

De acordo com SLIFKO *et al.* (2000), a *Giardia* spp. e o *Cryptosporidium* spp. tornaram-se importantes patógenos contaminantes da água por três principais fatores: a criptosporidiose pode ocorrer em diversos animais (zoonoses); uma baixa densidade de contaminação com cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. infectantes já é suficiente para poluir o meio aquático e causar infecções e esses cistos e oocistos resistem aos processos de tratamento e são insensíveis aos desinfetantes comumente utilizados no tratamento da água.

A excreção de um grande número de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., através das fezes de animais ou de humanos infectados, aliada à contaminação direta da água, podem aumentar o risco de ocorrência de epidemias. Adicionalmente, a contaminação do solo por fezes humanas e/ou de animais também pode provocar a infecção de animais que alimentam-se de pastagens cultivadas nestes locais. Após períodos intensos de chuva, os cursos de água também são contaminados por esses cistos e oocistos. A associação de todos estes fatos provoca, então, um nível considerável de contaminação ambiental (MARSHALL *et al.*, 1997; THOMPSON, 2000).

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. e os cistos de *Giardia* spp. são altamente resistentes às variações ambientais (FAYER *et al.*, 1991; CIMERMAN & CIMERMAN, 1999) e aos desinfetantes químicos usualmente utilizados (PEETERS *et al.*, 1989; KORICH *et al.*, 1990; BITTON, 1994; RUFFELL, RENNECKER, MARIÑAS, 2000).

A título ilustrativo, pode-se citar a resistência dos microrganismos à desinfecção por cloro, que segue a seguinte ordem: bactérias na forma vegetativa < vírus entéricos < bactérias esporuladas < cistos de protozoários (BITTON, 1994).

Portanto, os parâmetros da avaliação tradicional da qualidade da água, baseada apenas na medida dos níveis de um patógeno específico, como por exemplo, coliformes fecais, que é o que ocorre frequentemente na maioria dos países, não são suficientes para atestar tal qualidade (BITTON, 1994; EATON, CLESCERI, GREENBERG, 1995; VESEY *et al.*, 1997; QUINTERO-BETANCOURT & LEDESMA, 2000).

Muitas epidemias de giardíase e criptosporidiose causadas, respectivamente, por *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* têm ocorrido, principalmente, pela sua disseminação através da água. A primeira epidemia de criptosporidiose relatada ocorreu no verão, em Braun Station, subúrbio de San Antonio, no Estado do Texas, EUA (D'ANTONIO *et al.*, 1985). Em 1988, aproximadamente 100.000 pessoas foram infectadas em Oxford, Reino Unido, apesar do sistema de tratamento da água e os parâmetros usados para atestar sua qualidade estarem sendo rigorosamente seguidos (POULTON, COLBOURNE, DENNIS, 1991; RICHARDSON *et al.*, 1991). Fato similar ocorreu em Milwaukee, EUA, nos meses de março e abril de 1993, quando ocorreu a maior epidemia de criptosporidiose desse país, com 403.000 casos de diarreia. Foi demonstrado que o Lago Michigan, uma das fontes de abastecimento de água desta região, durante o período da epidemia, estava com uma concentração de dejetos muito maior do que o normal, indicando uma provável relação entre essa epidemia e a contaminação parasitológica da água que abastecia a cidade (MACKENZIE *et al.*, 1994; EISENBERG *et al.*, 1998; MORRIS *et al.*, 1998). Outras numerosas epidemias vêm sendo relatadas nos EUA e em outras partes do mundo.

Durante os meses de julho a setembro de 1998, a cidade de Sydney, Austrália, foi surpreendida por uma contaminação maciça de sua rede de distribuição de águas de consumo e recreação por *Cryptosporidium* spp. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram repetidamente encontrados em amostras coletadas do sistema de distribuição. Segundo CLANCY (2000), as concentrações relatadas dos parasitas variaram desde amostras negativas até amostras contendo 1.000 parasitas por 100L de água residual

(efluentes). Esta quantidade elevada de parasitas, até então, não havia sido observada em qualquer outro local do mundo.

Esse acontecimento fez com que a qualidade da água naquele país fosse totalmente reavaliada. Segundo STEIN (2001), o custo da epidemia foi estimado em A\$33 milhões, que incluiu A\$20 milhões pagos em indenizações aos usuários, A\$13 milhões para o monitoramento da água e A\$2,5 milhões por alegações de prejuízos devido à epidemia. Estes custos não incluíram o capital investido em melhoramento do sistema e infraestrutura. No entanto, segundo o mesmo autor, não foi observado aumento algum no número de casos de criptosporidiose na mesma época.

Em vista deste fato, o governo australiano solicitou uma auditoria para investigar as causas da contaminação. CLANCY (2000) investigou o laboratório responsável pelo monitoramento e constatou sérios problemas na qualidade, o que tornou suspeitos os dados referentes aos protozoários encontrados. Além disso, resultados obtidos por outros laboratórios indicaram que os laudos originais estavam errados, e esta autora concluiu que a confiança apenas nos dados do monitoramento criou uma crise na qualidade da água quando, na realidade, nenhum problema ou risco para a saúde pública existiu.

ALLEN e RICE (1994) fizeram uma revisão das questões regulatórias, técnicas e administrativas relativas ao uso de dados de monitoramento de patógenos em água para consumo. Eles concluíram que, além do valor científico, isoladamente estes dados não podem interferir nas decisões relativas à saúde pública, devido às limitações oferecidas pelas técnicas empregadas. Para garantir o consumo seguro da água que é distribuída à população, os autores são enfáticos ao sugerirem que todos os esforços devem ser direcionados para a construção e manutenção de um sistema ótimo de tratamento de água, pois esse é o melhor caminho a ser seguido quando se quer fornecer água de alta qualidade à população. Além disso, apontam para a criação de medidas regulatórias e administrativas, tais como, regulamentação dos métodos a serem usados no monitoramento de patógenos em águas; desenvolvimento e manutenção de um sistema de certificação de laboratório para que possam realizar esses monitoramentos; manutenção de recursos públicos para custeio do monitoramento em todo o país; criação de programas de certificação de laboratórios e de treinamento continuado dos profissionais envolvidos,

entre outras.

No Brasil, o Ministério da Saúde através da Portaria nº 1469 de 29 de dezembro de 2000, estabeleceu os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2000). Em complementação, recomenda a inclusão da pesquisa de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas liberadas para o consumo.

HACHICH *et al.* (2000) e FRANCO *et al.* (2001) realizaram alguns estudos sobre a ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas águas captadas para consumo no Estado de São Paulo e verificaram que ambos estão presentes. Esses resultados ressaltam a importância da inclusão de técnicas padronizadas para a detecção desses parasitas na rotina dos serviços de análise de água.

Conforme demonstrado, devido à facilidade de contaminação dos recursos hídricos por estes parasitas, é necessário que a água liberada para o consumo e/ou recreação humana seja rigorosamente avaliada através de técnicas padronizadas que não ofereçam dúvidas quanto à fidedignidade dos resultados obtidos.

III.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Cryptosporidium*

III.2.1 Histórico

O gênero *Cryptosporidium* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, subordem Eimeriina, família Cryptosporidiidae (REY, 2001).

Este protozoário foi descrito, pela primeira vez, por Tyzzer, em 1907, para designar um pequeno coccídio, encontrado nas glândulas gástricas de camundongos (TZIPORI, 1988). O seu papel como patógeno foi reconhecido nos anos 70, como causador de enterites em perus, bovinos, várias espécies de peixes e répteis, e no homem (FERREIRA & NISSHIOKA, 1999).

Os primeiros casos humanos foram descritos, em 1976, em indivíduos em contato com animais domésticos, mas a criptosporidiose só adquiriu relevância após o reconhecimento

da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Além do comportamento oportunista em pacientes portadores do vírus HIV, verificou-se também que o *Cryptosporidium* é um importante agente causador de gastroenterites agudas, mesmo em indivíduos imunocompetentes (GARCIA & BRUKNER, 1997).

Segundo O'DONOGHUE (1995) a espécie *Cryptosporidium parvum* é responsável pela infecção humana e da maioria dos mamíferos.

O estudo de dados moleculares demonstra a complexidade da espécie *C. parvum*, a qual pode ser dividida, em diferentes espécies (*C. felis*, *C. wrairi*, *C. meleagridis*) e como diferentes genótipos da espécie *C. parvum* (“humano”, “bovino”, “murino”, “canino”, “porcino” etc.), sendo que as espécies e os genótipos são geneticamente distintos (MORGAN *et al.*, 1999; SULAIMAN *et al.*, 2000). Dentre esses genótipos, apenas os genótipos “humano” e “bovino” aparecem como causadores de infecção em indivíduos imunocompetentes (XIAO *et al.*, 1998). Já em indivíduos imunocomprometidos vem sendo relatadas infecções causadas por *C. felis*, *C. meleagridis* e os genótipos “humano” e “canino” do *C. parvum* (PIENIAZEK *et al.*, 1999; SULAIMAN *et al.*, 2000).

III.2.2 Morfologia e Biologia

O *Cryptosporidium* é um protozoário intracelular obrigatório que se desenvolve preferencialmente nas microvilosidades das células epiteliais do trato gastrintestinal (Figura 1), mas pode se localizar também no parênquima pulmonar, vesícula biliar, ductos pancreáticos, esôfago e laringe (REY, 2001).

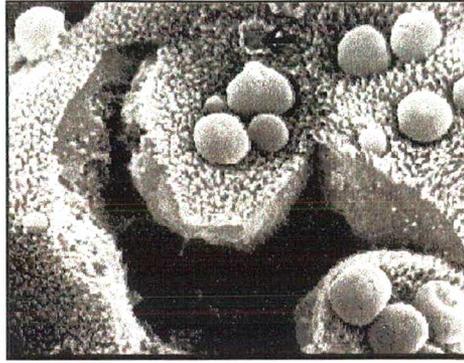


Figura 1. Microscopia eletrônica de *Cryptosporidium* spp.: mucosa do trato intestinal revestida por oocistos. Fonte: <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/cryptosporidium.html>

O ciclo evolutivo do *Cryptosporidium* se processa num único hospedeiro e devido a esse ciclo de auto-infecção, inóculos de apenas 30 oocistos podem produzir infecções persistentes (DU PONT *et al.*, 1995).

A infecção inicia-se com a ingestão de alimentos ou água contaminados por oocistos eliminados pelas fezes de indivíduos ou animais infectados. Os oocistos medem cerca de 5,0 x 4,5 μm para *C. parvum* e 7,4 x 5,6 μm para *C. muris* e possuem no seu interior quatro esporozoítos (LIMA, 2000). Estes são liberados no intestino delgado, onde penetram nas células intestinais, localizando-se num vacúolo parasitóforo superficial extracitoplasmático. Lá amadurecem assexuadamente em merontes do tipo I que, por sua vez, liberam merozoítos que novamente invadem os enterócitos (Ciclo assexuado). Alguns merozoítos de segunda geração, no entanto, amadurecem sexuadamente em merontes do tipo II e liberam merozoítos. Esses diferenciam-se em macro- e microgamontes, que após um período de amadurecimento, se fertilizam formando os zigotos. A partir dos zigotos, são formados os oocistos, que sofrem esporogonia, produzindo os 4 esporozoítos no seu interior. São formados dois tipos de oocistos: um de parede espessa, que é excretado com as fezes para o meio externo, e um de parede delgada, que rompe-se no intestino delgado (TZIPORI, 1988). Os oocistos eliminados pelas fezes podem contaminar o ambiente e permanecer viáveis por muitos meses (REY, 2001). Segundo MARSHALL *et al.* (1997), cerca de 20% dos zigotos formados originam os oocistos de parede delgada, sendo estes responsáveis pela manutenção do ciclo de vida interno e a manutenção do parasita no hospedeiro. A duração do ciclo biológico é curta (Figura 2) e, segundo estudos realizados em várias espécies de animais ele varia, em média, de 2 a 7 dias (LIMA, 2000).

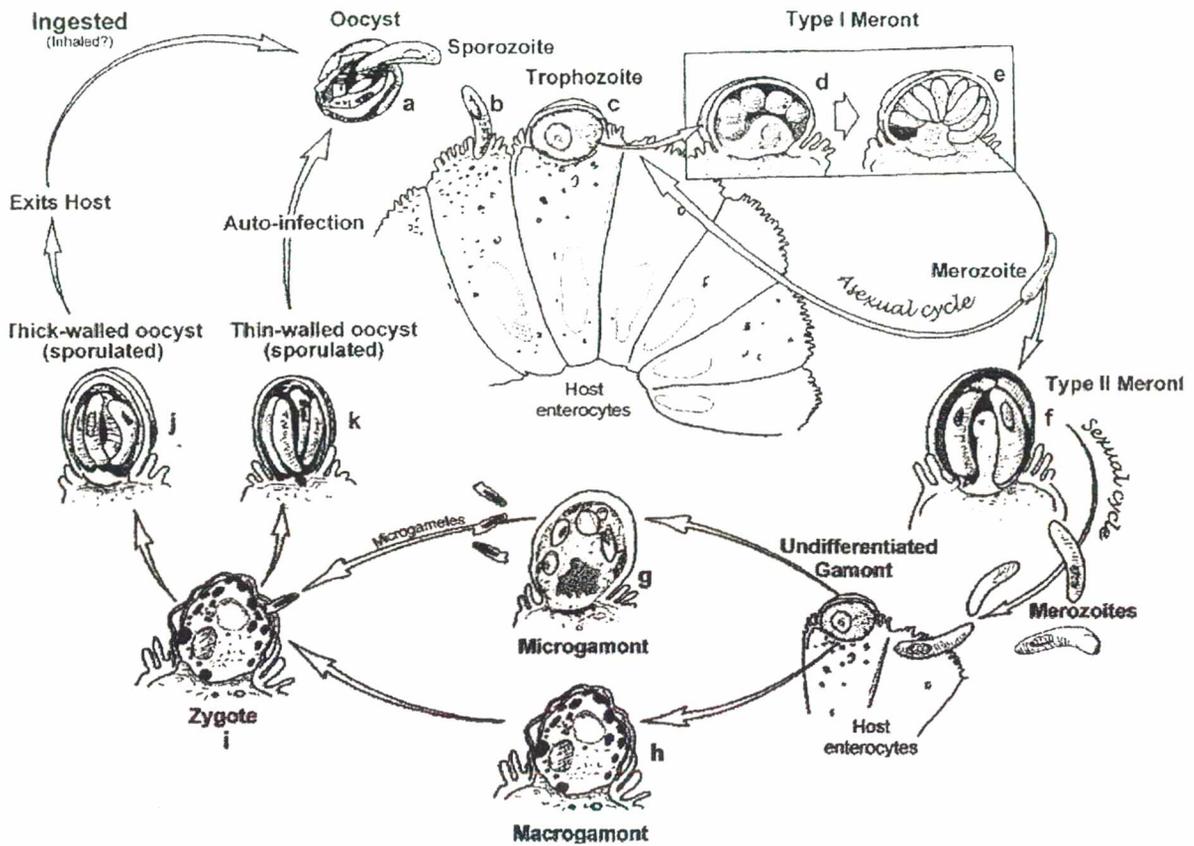


Figura 2 - Ciclo biológico do *Cryptosporidium*. Fonte: HEYWORT, 1992.

III.2.3 Patogenia

As alterações provocadas pelo parasitismo do *Cryptosporidium* nas células epiteliais da mucosa gastrointestinal interferem nos processos digestivos, resultando na síndrome da má absorção (LIMA, 2000). GOSTIN *et al.* (2000) observaram uma atrofia significativa das vilosidades nos pacientes em que a excreção de oocistos era superior a 10^8 por 24h.

A integridade do sistema imune é fundamental na defesa contra esta infecção (ROSSI *et al.*, 1998). Indivíduos imunocompetentes, em geral, desenvolvem infecções autolimitadas. Nestes casos, os sintomas são diarreia aquosa, anorexia, dor abdominal, flatulência, febre e cefaléia, que duram em média 10 dias. Em crianças pode ser acompanhado de vômitos e desidratação (MARSHALL *et al.*, 1997).

Nos indivíduos imunodeprimidos, os sintomas são crônicos, caracterizando-se por vários meses de diarreia aquosa, resistente a qualquer medicação e recidivante, provocando perda acentuada de peso, podendo levar a óbito (CURRENT, 1994). Tais quadros têm sido documentados em pacientes com AIDS, com neoplasias hematológicas, portadores de hipogamaglobulinemia e em indivíduos que fazem uso crônico de corticosteróides ou outros imunossupressores (FERREIRA & NISSHIOKA, 1999).

III.2.4 Epidemiologia

A criptosporidiose, em todas as partes do mundo, é considerada a zoonose emergente mais importante da atualidade. É uma doença cosmopolita, sendo que oocistos de *C. parvum* já foram encontrados em fezes de indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes de todas as regiões estudadas. Estes oocistos se dispersam no meio ambiente através do ar, de insetos, do vestuário e das fezes do homem e de animais, contaminando a água e os alimentos, permanecendo viáveis e infectantes por várias semanas, e resistindo à ação da maioria dos desinfetantes usuais nas concentrações geralmente empregadas (LIMA, 2000). Segundo GRACZYK *et al.* (1999), a mosca *Musca domestica* tem grande importância na disseminação de oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente. Estes autores demonstraram a presença de oocistos na superfície e no trato intestinal de moscas submetidas ao contato com fezes contendo diversas concentrações de oocistos.

No Brasil, muitos estudos demonstram a ampla distribuição do *C. parvum* em todas as regiões do país. Observa-se, entretanto, prevalência bastante elevada em crianças com diarreia e em indivíduos portadores do vírus HIV (LIMA, 2000). Precauções indispensáveis, tais como lavagem das mãos e saneamento são importantes na profilaxia da criptosporidiose (FERREIRA & NISSHIOKA, 1999).

III.2.5 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose baseia-se na detecção dos oocistos do parasita quando do exame microscópico das fezes e/ou, eventualmente, de outros líquidos orgânicos (MARSHALL *et al.*, 1997).

Em indivíduos imunocompetentes os parasitas são identificados nas fezes três dias após a contaminação e o tempo de emissão é curto (2 ou 3 semanas). Já em pacientes imunodeprimidos, a permanência dos oocistos é indefinida e a eliminação dos parasitas é descontínua. A diarreia aquosa dilui os parasitas e a presença de muco e de numerosos restos alimentares podem mascarar a pesquisa. Sendo assim, é necessário realizar várias coletas a cada três dias (DE CARLI, 2001).

Várias técnicas têm sido utilizadas para sua visualização, tais como os métodos de coloração de Ziehl-Nielsen, de Heine, de Kinyoun modificado, da safranina-azul-de-metileno a quente e da prata metenamida (DE CARLI, 2001; FERREIRA & NISSHIOKA, 1999; LIMA, 2000). Os métodos de coloração por fluorocromos incluem: auramina O, auramina-rodamina, auramina fucsina-fenicada, alaranjado de acridina, mepacrina, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e o iodeto de propídeo. Os métodos de coloração por fluorocromos exibem um potencial de alta sensibilidade; no entanto, devido à inespecificidade química de todos os métodos de coloração, os resultados falso-positivos são freqüentes (DE CARLI, 2001).

Alguns investigadores utilizam como procedimento de triagem a microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC ou Normaski) para a observação direta de espécimes fecais ou concentrados (GARCIA & SHIMIZU, 1993). Já em amostras ambientais, as técnicas imunoenzimáticas utilizando anticorpos monoclonais têm revelado alto grau de sensibilidade e especificidade, e detectam a presença de oocistos não só em fezes como também em alimentos e águas contaminadas (GARCIA & BRUKNER, 1997, USEPA, 1999a, 1999b).

III.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Giardia*

III.3.1 Histórico

O gênero *Giardia* pertence à família Hexamitidae, ordem Diplomanadida, classe Zoomastigophorea, filo Sarcocystidophorea. Este protozoário foi observado pela primeira vez, em 1681, por Antony von Leewenhoek, e descrito, em 1859, por Lambl com o nome de *Cercomonas intestinalis*, até que, em 1915, em homenagem ao Professor Giard e ao

Doutor Lambl, criou-se a denominação *Giardia lamblia* (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

Segundo SOGAYAR & GUIMARÃES (2000), o gênero *Giardia* pode ser dividido nas seguintes espécies: *G. agilis*, parasita de anfíbios; *G. muris* parasita de roedores, pássaros e répteis; *G. lamblia*, parasita de vários mamíferos incluindo o homem. Atualmente, tem se observado diversos genótipos que podem infectar tanto animais como o homem; no entanto, o seu potencial zoonótico ainda é discutido (THOMPSON *et al.*, 1999; THOMPSON, 2000). As denominações *Giardia lamblia*, *G. intestinalis* e *G. duodenalis*, vêm sendo empregadas como sinônimos, particularmente para isolados de origem humana (SCHMIDT, ROBERTS, JANOVY, 1996).

III.3.2 Morfologia e Biologia

A *Giardia* é um protozoário entérico, flagelado, que se localiza preferencialmente no duodeno e no jejuno proximal, sendo algumas vezes encontrado na vesícula e nos ductos biliares (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

Durante o ciclo evolutivo apresenta duas formas: trofozoíto (Figura 3A) e cisto (Figura 3B). O trofozoíto tem formato de pêra com simetria bilateral e mede de 10 a 20 μ m de comprimento (com uma variação usual de 12 a 15 μ m) por 5 a 15 μ m de largura (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999; DE CARLI, 2001). Em cada lado da superfície ventral, encontram-se os discos succionais, com função de fixação do parasita às células epiteliais (SCHMIDT *et al.*, 1996).

O cisto mede de 8 a 12 μ m de comprimento por 7 a 9 μ m de largura, com formato ovalado ou elipsóide, parede cística incolor e no seu interior observa-se a presença de dois ou quatro núcleos, flagelos, axonemas e corpos parabasais (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

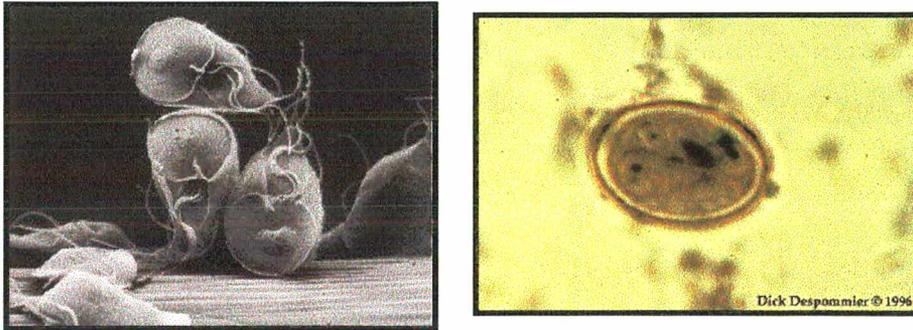


Figura 3. 3A: Trofozoíto de *Giardia lamblia* (microscopia eletrônica). Fonte: http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/giardia_sem.html Figura 3B: Cisto de *Giardia lamblia* corado com iodo. Fonte: http://www.medstat/AllSmallJpg/Giardia_cyst2_Despommier.jpg

Os cistos são a forma infectante, sendo portanto, responsáveis pela disseminação da moléstia. São muito resistentes, permanecendo viáveis durante dois meses no meio ambiente. A cloração da água, bem como seu aquecimento a 60°C, não são suficientes para sua destruição. A água fervida (100°C) por 5 min é efetiva na inativação dos cistos, porém o congelamento não os destrói (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999). Em voluntários humanos, verificou-se que um pequeno número de cistos (10 a 100) já é suficiente para produzir infecção (SOGAYAR & GUIMARÃES, 2000).

Ao serem ingeridos, os cistos chegam ao duodeno onde perdem a membrana cística, transformando-se em trofozoítos, que podem ficar livres na luz intestinal ou fixarem-se na parede duodenal através dos seus discos succionais (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999). Os trofozoítos multiplicam-se ativamente por um processo de divisão binária longitudinal, surgindo grande número de novos elementos em pouco tempo. Em determinado momento, por fatores desconhecidos, os trofozoítos se retraem, condensam e secretam uma membrana, transformando-se em cistos (Figura 4).

A eliminação dos cistos não é contínua, ocorrendo às vezes períodos de 7 a 10 dias, durante os quais eles estão presentes em pequena quantidade ou mesmo ausentes; em tais situações, os exames parasitológicos das fezes poderão ser falso-negativos. Admite-se hoje que, em infecções de média intensidade, o número de cistos eliminados por dia varia de

300 milhões a 14 bilhões (SCHMIDT *et al.*, 1996).

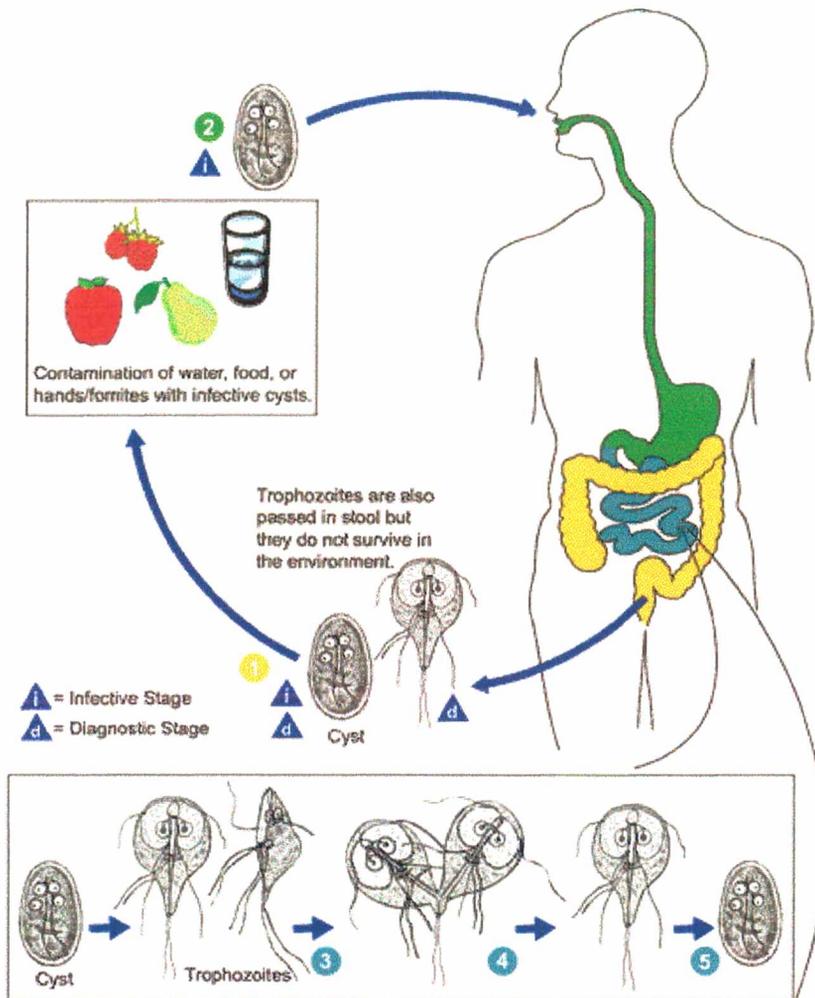


Figura 4. Ciclo biológico e mecanismos de transmissão e reprodução da *Giardia lamblia*. 1. Cisto e trofozoíto eliminados nas fezes; 2. Ingestão do cisto (forma infectante); 3. Desencistamento do cisto liberando trofozoítos no intestino delgado. 4. Trofozoítos se multiplicando por divisão binária; 5. Encistamento do trofozoíto. i. estágio infectivo. d. estágio diagnóstico.

Fonte: Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>

III.3.3 Patogenia

A maioria das infecções por *Giardia* é assintomática. Quando sintomática, os sintomas iniciais da giardíase são cólicas intestinais, seguidas de náuseas e anorexia. Posteriormente, a doença evolui para uma diarreia explosiva, distensão e cólicas abdominais intensas causadas pelo acúmulo de gases, que tem duração aproximada de 3 a 4 dias (MARSHALL *et al.*, 1997).

A infecção por *Giardia* interfere na absorção de vitaminas (A, D, E, K, B₁₂, ácidos graxos e ácido fólico) pela superfície duodenal. O mecanismo pelo qual ocorre essa má absorção ainda não é bem conhecido, mas alguns autores sugerem que isso acontece devido a uma barreira mecânica formada pela alta concentração de trofozoítos aderidos à parede (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999; REY, 2001) e, também, pela irritação e atrofia das vilosidades (SOGAYAR & GUIMARÃES, 2000).

III.3.4 Epidemiologia

A *Giardia lamblia* é um parasita intestinal cosmopolita que atinge ambos os sexos, sendo prevalente em crianças com menos de 10 anos (REY, 2001). A alta prevalência em crianças tem sido observada devido à falta de hábitos higiênicos ou à dificuldade de manutenção desses hábitos. Quanto ao adulto, tem se observado que uma infecção primária com esse parasita pode conferir certo grau de resistência às infecções subseqüentes (SOGAYAR & GUIMARÃES, 2000).

Segundo os mesmos autores, alguns aspectos devem ser considerados na epidemiologia desta parasitose:

- ela é freqüentemente adquirida pela ingestão dos cistos em águas provenientes da rede pública insuficientemente tratadas (apenas com cloração);
- este parasita é reconhecido como um dos agentes etiológicos da “diarréia dos viajantes”, que viajam para zonas endêmicas;
- a atividade homossexual entre homens facilita sua transmissão;
- este parasita sobrevive durante muito tempo embaixo das unhas;
- a giardiase é bastante comum em ambientes coletivos (enfermarias, creches, internatos), onde o contato direto de pessoa a pessoa é freqüente e as medidas de higiene são difíceis de serem controladas;
- a prevalência da infecção em creches é muito alta e mesmo quando algumas das crianças são assintomáticas, elas são fontes de infecção para outras crianças e funcionários;
- em artrópodes, os cistos permanecem viáveis por 7 dias em baratas e durante 24h no intestino de moscas (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

III.3.5 Diagnóstico laboratorial

Para se confirmar uma suspeita clínica, deve-se fazer o exame das fezes dos pacientes para identificar cistos ou trofozoítos. (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

Os cistos são encontrados com maior frequência em fezes formadas, podendo ser detectados pelo método direto (com salina ou lugol), pelo método de Faust (centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco) e/ou pela técnica de Richie (centrífugo-flutuação pelo sistema formalina-éter). Os trofozoítos aparecem nas fezes diarréicas e no meio externo e desaparecem em 15 a 20 minutos. Recomenda-se examinar as fezes imediatamente após a coleta pelo método direto (com salina ou lugol). Pode-se usar conservantes como SAF (fixador acetato de sódio, ácido acético e formaldeído) ou Shaudinn quando a pesquisa dos trofozoítos ultrapassa 20 minutos. Para coloração permanente, utiliza-se técnicas para coloração de protozoários, tais como a hematoxilina férrica e a tricrômia (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999; DE CARLI, 2001).

Como a eliminação dos cistos não é contínua, devido a períodos de 7 a 10 dias em que os cistos estão ausentes ou em pequena quantidade nas fezes, os resultados falso-negativos são comuns. A realização de três exames, preferencialmente a cada 7 dias, se faz necessária para excluir esta possibilidade (SOGAYAR & GUIMARÃES, 2000; DE CARLI, 2001). Com o objetivo de simplificar e aumentar a sensibilidade do diagnóstico da infecção por *Giardia*, vários métodos imunológicos, como o teste de ELISA (ALDEEN *et al.*, 1998) e a imunofluorescência têm sido propostos, não só para diagnóstico em fezes como também para análise de águas contaminadas (GARCIA & BRUKNER, 1997).

III.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE A PISCINA OLÍMPICA DA UFSC

A piscina olímpica da UFSC (Figura 5) foi inaugurada em 1999 para atender a comunidade universitária e a comunidade local de uma maneira geral, além de propiciar um campo para inúmeras atividades de extensão e pesquisa na área esportiva. Ela possui aproximadamente 2 milhões e 450 mil litros de água, aquecida a 27°C.

O tratamento da água, segundo o funcionário responsável, consiste na adição diária de 3Kg de cloro, 30 a 40 Kg de carbonato de cálcio uma vez por semana e 6Kg de sulfato de alumínio a cada dois meses. O teor de cloro em ppm e o pH são aferidos semanalmente através de um medidor com compartimentos para adição da amostra de água da piscina que podem ser comparados com padrões de cloro (0,5 – 5 ppm) e pH (6,8 – 8,2). Para análise do cloro é realizada uma reação com solução de orto-toluidina a 0,05% em meio ácido, o que confere à amostra uma coloração característica que é comparada com os padrões. O nível ideal de cloro estabelecido é de 2 ppm. Para análise do pH, utiliza-se solução de vermelho de fenol estabilizado a 0,02% e a faixa de pH ideal está entre 7,2 e 8,2. As quantidades dos agentes químicos adicionados são balanceadas para que estes níveis sejam alcançados.

A água é constantemente filtrada e aquecida; o sistema de filtração utilizado é constituído por dois filtros com várias camadas de areia fina (0,125 – 0,250 mm), areia média (0,25 – 0,50 mm), areia grossa (0,5 – 1,0 mm) e camadas de pedra (64 – 256 mm), que também variam de tamanho em ordem crescente.

Segundo informações fornecidas pelo Prof. Nelson da Silva Aguiar, então diretor do Centro de Desportos da UFSC, nesta piscina são ministradas aulas para crianças a partir de 6 anos, alunos, funcionários e docentes da UFSC, idosos e portadores de deficiências físicas, perfazendo um total de aproximadamente 1.100 pessoas, que freqüentam a piscina diariamente, no período das 7 às 21 h.

O critério utilizado para avaliação da saúde dos freqüentadores é um atestado médico exigido no momento da inscrição.

No momento, não são realizados testes para avaliar a qualidade microbiológica e parasitológica da água da piscina olímpica da UFSC.



Figura 5. Piscina Olímpica da UFSC Fonte: Centro de Desportos da UFSC.

III.5 TÉCNICAS EMPREGADAS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Giardia* spp. E *Cryptosporidium* spp. EM ÁGUA.

Os parasitas *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. ocorrem em baixa densidade no ambiente aquático. Em vista da dose infecciosa mínima do *Cryptosporidium parvum* (30 oocistos) (DU PONT *et al.*, 1995) e da *Giardia lamblia* (10 cistos) (SOGAYAR & GUIMARÃES, 2000) ser baixa para humanos, as técnicas empregadas para detecção e quantificação destes parasitas devem apresentar alta sensibilidade e especificidade (CALL *et al.*, 2001).

A pesquisa de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. é realizada, pela maioria das pesquisas relatadas na literatura, através da associação de métodos para concentração da água, purificação, detecção e quantificação dos cistos e oocistos (HSU *et al.*, 2001a; CALL *et al.*, 2001). Nos Estados Unidos, foi proposto um método padrão para o monitoramento destes protozoários em água (método ICR) baseado em processos de filtração em cápsulas, purificação em gradiente de Percoll-sacarose e

imunofluorescência (USEPA, 1995). No entanto, esse método foi investigado minuciosamente por muitos pesquisadores, como CLANCY *et al.* (1994) e LECHEVALLIER *et al.* (1995), que observaram, respectivamente, baixa recuperação e reprodutibilidade da técnica proposta. A avaliação da recuperação do método ICR foi realizada envolvendo 12 laboratórios, e os resultados médios de recuperação obtidos a partir de amostras semeadas foram de 9% para cistos de *Giardia* spp. e 3% para oocistos de *Cryptosporidium* spp. As investigações demonstraram que as maiores perdas ocorriam durante os processos de concentração e purificação (CLANCY, GOLLNITZ, TABIB, 1994).

A partir destes achados, foram propostos os métodos 1622 (USEPA, 1999a) e 1623 (USEPA, 1999b). Assim, foi incluído um novo sistema de filtração e o processo de separação imunomagnética como forma de melhorar os resultados de recuperação. No entanto, muitas companhias de saneamento nos EUA continuaram utilizando o método ICR. Isto ocorreu devido às limitações dos métodos 1622 e 1623 em utilizar amostras com grande quantidade de partículas em suspensão e ao alto custo dos reagentes e equipamentos que devem ser empregados (CLANCY & HANSEN, 1999).

As técnicas usadas nos métodos 1622 e 1623 (USEPA, 1999a, 1999b) permitem apenas acessar a presença dos parasitas na amostra de água. A viabilidade dos mesmos é afetada durante o processamento da amostra. Muitos investigadores vêm testando técnicas para acessar a viabilidade e a infectividade, dentre elas, a cultura celular seguida por PCR (DI GIOVANNI *et al.*, 1999), o desencistamento *in vitro* (McCUIN *et al.*, 2000) e a amplificação do RNAm dos parasitas por RT-PCR (GOBET & TOZE, 2001).

Várias alternativas metodológicas têm sido investigadas para oferecer maior efetividade na detecção destes parasitas no ambiente aquático. Para concentrar os oocistos de *Cryptosporidium* spp. e os cistos de *Giardia* spp. de amostras de água, os processos mais citados são a filtração em cartucho de polipropileno (filtro em forma de cilindro) com 1µm de porosidade (KARANIS, SCHOENEN, SEITZ, 1996; USEPA, 1999a; USEPA, 1999b; HSU *et al.*, 2001b), filtração em membrana de acetado de celulose com 1µm de porosidade (GRACZYK, CRANFIELD, FAYER, 1999; McCUIN, BUKHARI, CLANCY, 2000; CARRENO *et al.*, 2001; FRANCO *et al.*, 2001), membrana de

policarbonato (HSU *et al.*, 2001b), centrifugação em fluxo contínuo (KARANIS *et al.*, 1996; ZUCKERMAN *et al.*, 1999) e floculação (precipitação) com carbonato de cálcio (VESEY *et al.*, 1993a; SHEPHERD & WYN-JONES, 1996; ZUCKERMAN *et al.*, 1999).

Em relação à filtração, a técnica que emprega membrana de policarbonato, seguida de raspagem, tem demonstrado os melhores resultados quando comparada ao emprego de membrana de acetato de celulose seguido de dissolução (McCUIN *et al.*, 2000; FRANCO *et al.*, 2001). Além disso, CARRENO *et al.* (2001) demonstraram que, durante o processo de dissolução da membrana de acetato de celulose, os cistos e oocistos perdem a infectividade quando testados em camundongos. Em complementação, HSU *et al.* (2001b) demonstraram que o emprego do sistema de filtração com membrana de policarbonato (Envirochek Capsule®, Pall Gelman Laboratory®), conforme sugerido pelos métodos 1622 e 1623, oferece melhores resultados de recuperação em relação ao uso dos cartuchos filtrantes. No entanto, o custo do sistema de filtração Envirochek Capsule® é elevado, e por não ser reutilizável torna as análises bastante caras.

Com o propósito de desenvolver uma técnica de concentração de cistos e oocistos a partir de amostras de água, que pudesse substituir a filtração em cartucho, como sugerido pelo método ICR (USEPA, 1995), ZUCKERMAN *et al.* (1999) aplicaram a centrifugação em fluxo contínuo, usualmente empregada para separação de células sanguíneas. Os resultados de recuperação foram superiores aos encontrados quando empregou-se a filtração em cartucho. Os mesmos autores também compararam as recuperações obtidas através da concentração com carbonato de cálcio (CaCO_3), como proposto por VESEY *et al.* (1993a) com aqueles obtidos por filtração em cartucho. Os resultados obtidos para concentração com CaCO_3 foram superiores aos valores obtidos para a filtração em cartucho; além disso, eles mostraram-se semelhantes aos obtidos por centrifugação em fluxo contínuo.

SHEPHERD & WYN-JONES (1996) também avaliaram, através dos resultados de recuperação, a eficiência das técnicas de concentração por filtração em cartucho, filtração em membrana e concentração com CaCO_3 . Os resultados foram semelhantes aos observados posteriormente por ZUCKERMAN *et al.* (1999). Assim, a filtração em

membrana e a concentração com carbonato de cálcio apresentaram resultados de recuperação superiores aos obtidos por filtração em cartucho.

A concentração por precipitação com carbonato de cálcio, segundo VESEY *et al.* (1993a), é realizada através da adição de soluções aquosas de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e cloreto de cálcio (CaCl₂) em pH10, ajustado com adição de NaOH. Flocos de carbonato de cálcio (CaCO₃) se formam na amostra, tornando as partículas presentes mais densas devido ao revestimento com esse sal. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. e os cistos de *Giardia* spp. precipitam após algumas horas. Os flocos formados decantam totalmente, o sobrenadante pode ser descartado, e o precipitado dissolvido com ácido sulfâmico e, então, analisado através de uma das técnicas de purificação, detecção e quantificação.

A purificação de cistos e oocistos é realizada através de várias técnicas, dentre elas, as mais empregadas são a flutuação em gradiente de sacarose (KARANIS *et al.*, 1996), citometria de fluxo com sorteio das células - FCCS (VESEY *et al.*, 1993b; VESEY *et al.*, 1995; DELAUNAY *et al.*, 2000; FERRARI *et al.*, 2000) e a separação imunomagnética (BUKHARI *et al.*, 1998; DI GIOVANNI *et al.*, 1999; PEREIRA, ATWILL, JONES, 1999; ROCHELLE *et al.*, 1999; USEPA, 1999a; USEPA, 1999b; DENG, LAM, CLIVER, 2000; McCUIN *et al.*, 2001; QUINTERO-BITANCOURT & LEDESMA, 2000; YARUB & STADTERMAN-KNAUER, 2000; CALL., 2001; HSU *et al.*, 2001a; SIMMONS *et al.*, 2001).

As técnicas de flutuação fundamentam-se no princípio da diferença de densidade específica entre os ovos de helmintos, cistos e oocistos de protozoários e o material a ser analisado, a fim de que esses organismos flutuem na superfície dos reagentes com densidade específica. As principais vantagens apresentadas pela flutuação são a formação de uma membrana clara com poucos detritos na superfície do reagente empregado, e a remoção e concentração dos parasitas presentes na amostra nesta membrana. No entanto, a alta densidade dos reagentes empregados torna a parede dos parasitas distorcidas, o que dificulta na identificação ao microscópio. Por esta razão, as membranas devem ser colhidas e analisadas num período de 10 a 20 minutos (DE CARLI, 2001).

Os métodos de purificação, que utilizam anticorpos monoclonais, são específicos e de alta sensibilidade, sendo que essas características são parâmetros importantes quando se quer detectar um pequeno número de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., em amostras concentradas de água (ROSE *et al.*, 1989). As técnicas de citometria de fluxo e de separação imunomagnética empregam anticorpos policlonais ou monoclonais, marcados com uma substância fluorescente.

A citometria de fluxo é realizada através da preparação da amostra através da adição de anticorpos específicos marcados com fluorescência e posterior análise da amostra em um citômetro de fluxo. Esse é caracterizado por possuir detectores de dispersão de luz e detectores de fluorescência, que podem ser usados simultaneamente. O detector do ângulo de luz incidente mede a luz que se dispersa em direção a um feixe de *laser* e fornece a indicação do tamanho da partícula que está sendo analisada. O segundo detector de luz mede o feixe de luz que incide perpendicularmente à interseção da partícula da amostra e o feixe de *laser*; desta forma, são obtidas informações das características das superfícies externa e interna da partícula analisada (morfologia e granulação). Através dos detectores de fluorescência é quantificado o número de partículas que apresentam a marcação específica. As medidas de cada detector são analisadas em sinais de picos, lineares ou logarítmicos. Além disso, o instrumento também separa as partículas, podendo estas serem coletadas individualmente. Assim, os cistos e oocistos podem ser purificados da amostra e ao mesmo tempo identificados através dos diversos detectores (VESEY *et al.*, 1994a, 1994b).

Entretanto, a citometria de fluxo apresenta limitações quando são analisadas amostras ambientais, pois essas amostras freqüentemente contêm algas autofluorescentes, organismos que se ligam inespecificamente aos anticorpos monoclonais empregados e partículas minerais que são indistinguíveis dos cistos e oocistos pelos detectores do citômetro de fluxo (VESEY *et al.*, 1993b).

Assim, FERRARI *et al.* (2000) incluíram anticorpos monoclonais marcados com duas diferentes substâncias fluorescentes e, desta forma, os parâmetros de seleção dos

cistos e oocistos foram aumentados e conseguiu-se uma maior especificidade para a técnica.

A separação imunomagnética (Figura 6) baseia-se na utilização de pequenas pérolas magnéticas (1 – 5 µm de diâmetro) sensibilizadas com anticorpos monoclonais ou policlonais dirigidos contra o microorganismo de interesse. A sensibilização pode ser realizada de diversas formas: revestimento das pérolas com estreptavidina, que se liga aos anticorpos previamente marcados com biotina; revestimento das pérolas com proteína G ou A, que se ligam na porção Fc dos anticorpos; ou revestimento da pérolas com anticorpo anti-IgG ou IgM, que faz ligação do tipo antígeno-anticorpo com o anticorpo monoclonal ou policlonal a ser utilizado. As pérolas sensibilizadas são colocadas na amostra e os microrganismos, ligados aos anticorpos monoclonais presentes na superfície das pérolas magnéticas, são atraídos com auxílio de um ímã acoplado à parede do tubo. Enquanto permanecem imóveis, o sobrenadante pode ser removido após várias lavagens com um tampão específico (SAFARIK & SAFARIKOVA, 1999). Essa técnica facilita a remoção de partículas, tanto de amostras ambientais quanto fecais, tornando a amostra mais limpa para a pesquisa de muitos microrganismos (ROCHELLE *et al.*, 1999).

Muitos estudos já foram realizados utilizando esta técnica para pesquisa de vários microrganismos, dentre eles vírus entéricos e *Helicobacter pylori* em águas doces (ENROTH & ENGSTRAND, 1995; SCHWAB, DE LEON, SOBSEY, 1996); vírus da hepatite A em mariscos (DENG, DAY, CLIVER, 1994); *Pseudomonas stutzeri* em águas marinhas (BARD & WARD, 1997) e *Salmonella* spp., *Mycobacterium avium* e *Escherichia coli* enterohemorrágica em amostras fecais (KONGMUANG, LUK, LINDBERG, 1994; ZHONGMING *et al.*, 1996; CHAPMAN *et al.*, 1997). A separação imunomagnética também vem sendo utilizada para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais de águas, geralmente em conjunto com *Giardia* spp. (VESEY, 1996; DENG, CLIVER, MARIAM, 1997; ROCHELLE *et al.*, 1999; USEPA, 1999a, USEPA, 1999b; McCUIN *et al.*, 2001). Na tabela 1 encontram-se alguns exemplos do emprego da separação imunomagnética para purificação de parasitas.

Tabela 1. Exemplos do emprego da separação imunomagnética para purificação de parasitas.

| Parasita | Partículas magnéticas | Anticorpo primário | Amostra analisada | Referência |
|---|--|---|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>Cryptosporidium parvum</i> (oocistos) | Dynabeads® recobertas com anticorpo policlonal anti-IgG de camundongos. | Anticorpo monoclonal, IgG de camundongo, anti-oocistos | Água | MACCUIN <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Cryptosporidium parvum</i> (oocistos) | Dynabeads M-280® recobertas com estreptavidina ligada através de biotilação à anticorpo monoclonal anti-FITC | Anticorpo monoclonal anti-FITC | Fezes | WEBSTER <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Cryptosporidium parvum</i> (oocistos) | Miltenyi beads® recobertas com estreptavidina | Anticorpo monoclonal, IgG de coelho, anti-oocistos | Água | DENG, LAM, CLIVER, 1997 |
| <i>Giardia lamblia</i> (cistos) | Pérolas recobertas com proteína A | Anticorpo policlonal, IgG de camundongo, anti-cistos | Água | BIFULCO & SCHAEFER, 1993 |
| <i>Plasmodium falciparum</i> (merozoíto) | Dynabeads M-280® recobertas com anticorpo anti-IgG de camundongo | Três anticorpos monoclonais anti-proteínas da superfícis de merozoítos (MSP1) | Sangue | SEESOD <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Toxoplasma gondii</i> (bradizoítos) | Miltenyi beads® recobertas com anticorpo anti-IgG de camundongo | Anticorpo monoclonal, IgG de camundongo, anti-bradizoítos | Mistura de bradizoítos e taquizoítos | BOHNE <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Trypanosoma brucei</i> (células transgênicas expressando proteínas ricas em alanina e ácido glutâmico -GARP) | Dynabeads® recobertas com anticorpo anti IgG de rato | Anticorpo policlonal, anti-GARP | Suspensão modelo | HEHL <i>et al.</i> , 1995 |

Fonte: Adaptada de SAFARIK & SAFARIKOVA (1999).

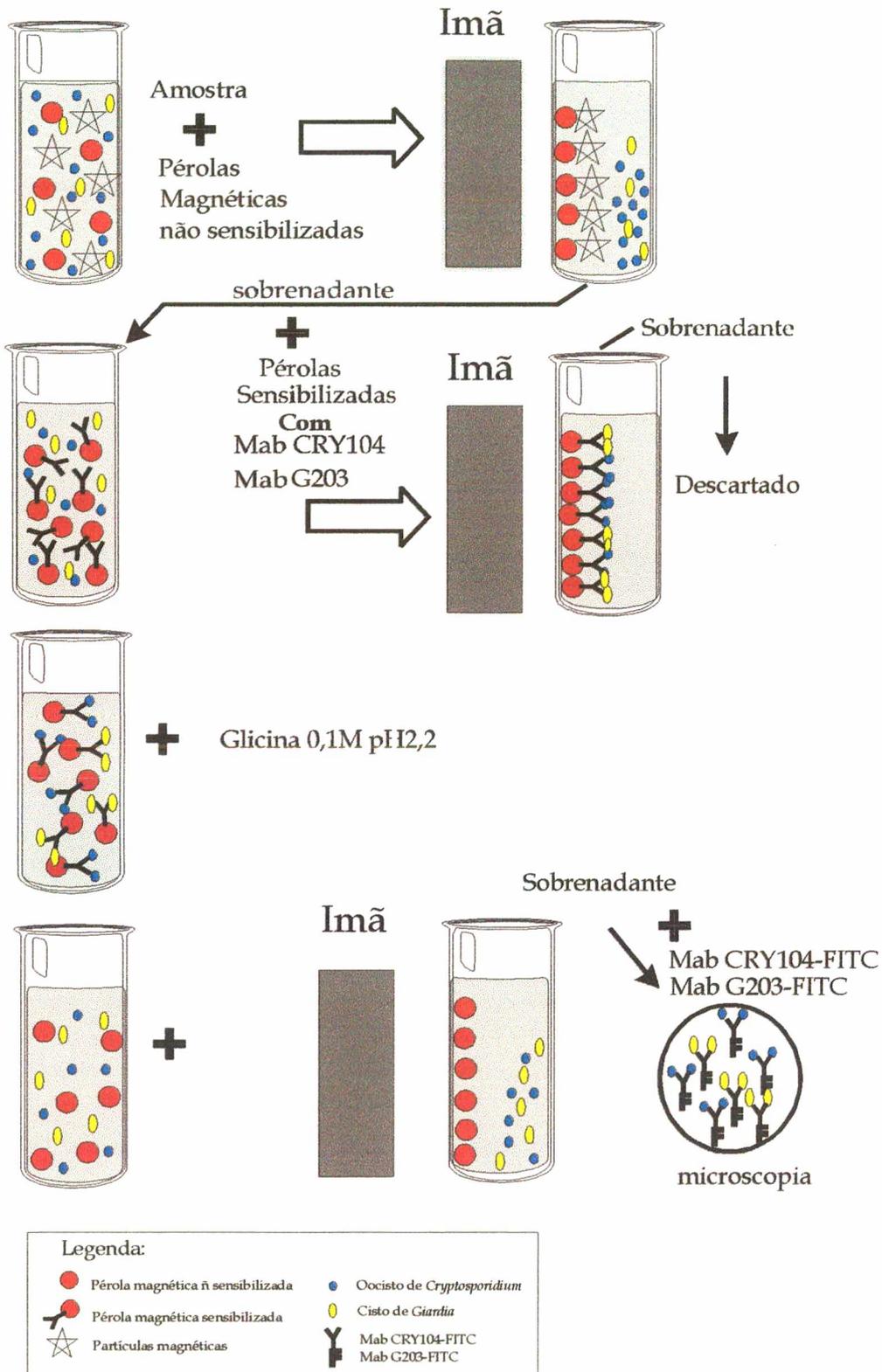


Figura 6. Esquema geral da separação imunomagnética. Fonte: Autora

Na fase de detecção e quantificação, as metodologias utilizadas são a citometria de fluxo (VESEY *et al.*, 1993b; FERRARI *et al.*, 2000), a eletroquimioluminescência (LEE *et al.*, 2001), a reação da polimerase em cadeia – PCR (ROCHELLE *et al.*, 1997; DI GIOVANI *et al.*, 1999; MONIS & SAINT, 2001), os ensaios de hibridização *dot blot* (ABBASZADEGAN, GERBA, ROSE, 1991), hibridização *in situ* (VESEY *et al.*, 1995), o teste de ELISA (ALDEEN *et al.*, 1998), e a imunofluorescência direta e indireta (ROSE *et al.*, 1989; USEPA, 1999a,b).

A imunofluorescência direta, que utiliza anticorpos monoclonais marcados com substâncias fluorescentes, é atualmente a técnica mais utilizada para detecção e quantificação de cistos e oocistos em águas. O microorganismo de interesse é observado ao microscópio de epifluorescência e, através de suas características morfológicas, é detectado e quantificado. A Figura 7 mostra cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. marcados com anticorpo monoclonal ligado ao isotiocianato de fluoresceína. No entanto, algas, diatomáceas e outros contaminantes são comuns em águas e interferem na detecção de microrganismos (ROSE *et al.*, 1989). Como forma de minimizar estas interferências, processos de purificação, como citometria de fluxo e separação imunomagnética, são empregados antes da observação ao microscópio (USEPA, 1999a,b; FERRARI *et al.*, 2000).

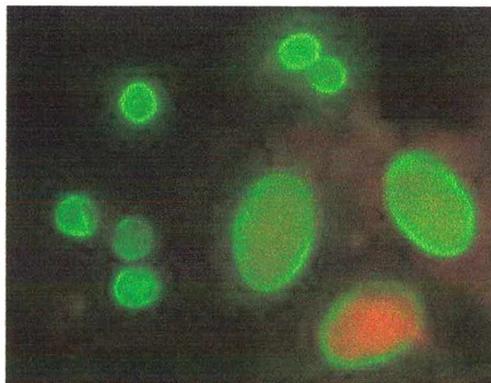


Figura 7. Cistos de *Giardia* spp. (forma oval) e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (forma arredondada) marcados em verde com isotiocianato de fluoresceína (FITC), observados no microscópio de epifluorescência. Fonte: [http:// www. dpd. cdc. gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm)

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 MATERIAL DE ESTUDO

IV.1.1 Amostras de água provenientes da piscina olímpica da UFSC

Amostras de água da retrolavagem do filtro da piscina olímpica da UFSC foram coletadas, em triplicata, durante os meses de dezembro de 2000 a agosto de 2001, nos dias em que o funcionário responsável pela manutenção da mesma realizou a retrolavagem dos filtros.

A coleta foi realizada em garrafas de 1L, autoclavadas, preenchidas no momento em que os primeiros jatos de água da retrolavagem dos filtros eram liberados da tubulação.

A análise das amostras até o mês de dezembro de 2001, conforme previsto, não foi possível em decorrência do movimento de greve nas IFES, incluindo a UFSC. A piscina permaneceu desligada e sem usuários durante o período de setembro a dezembro de 2001, o que impossibilitou a coleta das amostras.

IV.1.2 Água destilada

A água destilada utilizada na padronização foi obtida no Departamento de Microbiologia e Parasitologia-MIP da UFSC.

IV.2 METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM ÁGUAS

A metodologia inicialmente utilizada para as primeiras análises (protocolo 1) foi aquela preconizada pela *Biotechnology Frontiers Inc.* (Austrália). A partir dos primeiros resultados, algumas alterações foram introduzidas com a finalidade de adaptar a técnica às condições do laboratório onde foi realizado este trabalho, originando a metodologia posteriormente utilizada para análise das amostras de água da piscina (protocolo 2).

Para testar o desempenho das técnicas, foram semeados oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em determinados estágios do processo (P1= antes da

precipitação com carbonato de cálcio; P2= antes da centrifugação; P3= após a centrifugação) como demonstrado nas Figuras 8 e 10.

IV.2.1 Protocolo 1

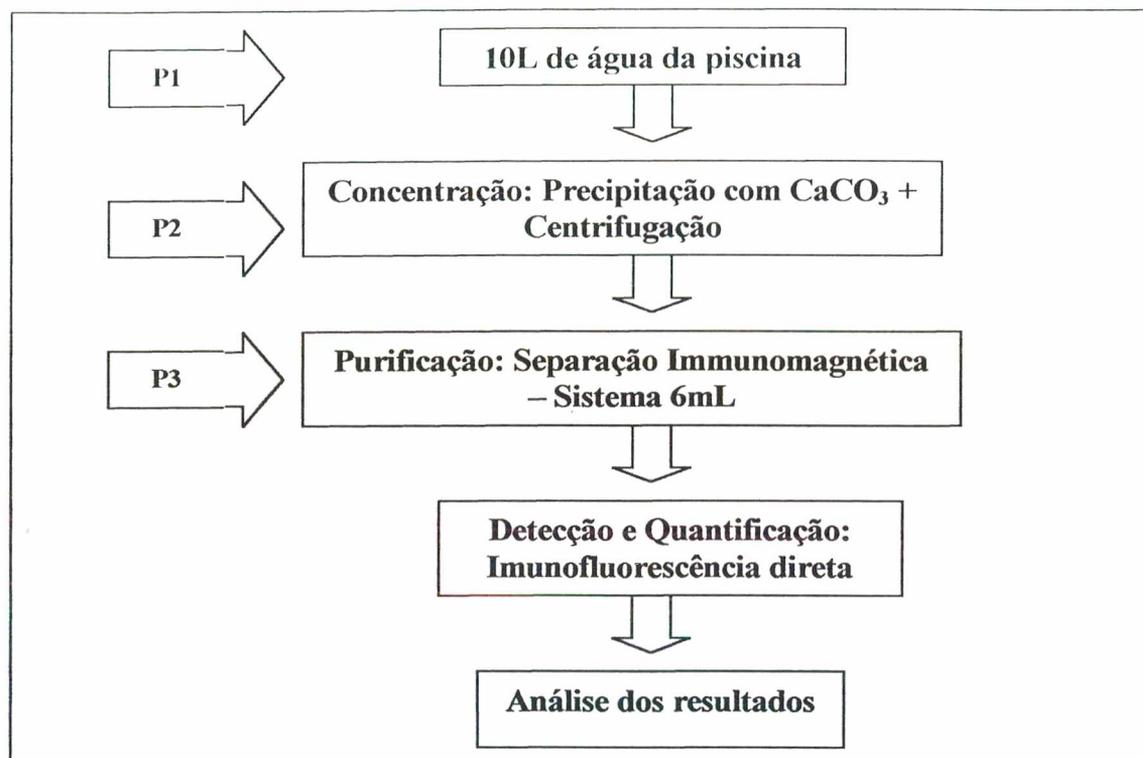


Figura 8. Fluxograma representando o esquema geral do protocolo 1

IV.2.1.1 Procedimento para concentração das amostras de água destilada

A concentração das amostras de água foi realizada através da precipitação com carbonato de cálcio (CaCO_3), conforme proposto por VESEY *et al.* (1993a).

Inicialmente, em 10L de água destilada, foram semeados $10\mu\text{L}$ de oocistos de *Cryptosporidium* spp., na concentração aproximada de 35 oocistos/ μL , contados em hemocítmetro. Em seguida, 100 ml das soluções aquosas de NaHCO_3 1M e de CaCl_2 1M foram adicionadas, misturadas com auxílio de um bastão de vidro e acrescentou-se 100 ml de uma solução aquosa de NaOH 1N para atingir pH 10. Após incubação durante uma noite, para precipitação dos flocos de CaCO_3 formados, o sobrenadante foi removido com

o auxílio de uma trompa de vácuo, deixando um volume mínimo do mesmo sobre o precipitado. Esse foi dissolvido adicionando-se qsp de uma solução aquosa de ácido sulfâmico a 10%(p/v). A suspensão formada foi centrifugada (centrífuga de mesa, rotor de ângulo variável, ALC®, PK121R) durante 20min, 5.000 Xg, a temperatura ambiente, e o sobrenadante foi retirado. O precipitado foi ressuspensionado em água destilada e uma nova centrifugação foi realizada para obtenção do menor volume possível no fundo do tubo.

IV.2.1.2 Separação imunomagnética

O precipitado final obtido da concentração da água destilada foi ressuspensionado no tampão das pérolas paramagnéticas (tampão TPP)¹ e transferido para um tubo tipo Falcon de 6ml rotulado como tubo 1A. A este tubo, adicionou-se pérolas Pre-Clear Beads®², previamente agitadas (com agitador tipo Vortex) e o mesmo foi colocado em um agitador orbital (Glas-Col®) por 5min. Após este período, o tubo foi colocado em uma estante magnética (Figura 9A), onde permaneceu por 30min.

Com auxílio de uma pipeta de vidro do tipo Pasteur pré-umidificada no tampão TPP, o sobrenadante foi retirado e colocado em um tubo rotulado de 1B. Ao tubo 1A, foi acrescentado o tampão TPP e, após agitação vigorosa, este foi colocado em contato com o ímã na estante magnética sob agitação orbital (Figura 9B), por 5min e, posteriormente, permaneceu em repouso na bancada. Ao tubo 1B foram adicionadas as pérolas magnéticas ligadas aos anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* spp. (CRY104) e anti-*Giardia* spp. (G203) (IMS Beads®)³, previamente agitadas (com agitador tipo Vortex). O tubo foi colocado em agitação orbital por 30min e, em seguida, colocado na estante magnética, juntamente com o tubo 1A, onde permaneceram por 5min.

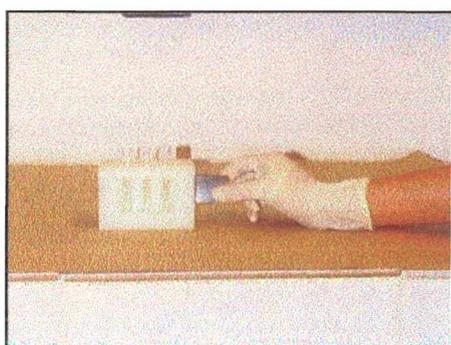
Posteriormente, o sobrenadante do tubo 1B foi descartado e o sobrenadante do tubo

¹ Tampão TPP = tampão das pérolas paramagnéticas [= 4% BSA(p/v) + 0,1% Tween®20 (v/v) + 0,05% azida (p/v); pH 7,4 ± 0,2; qsp PBS].

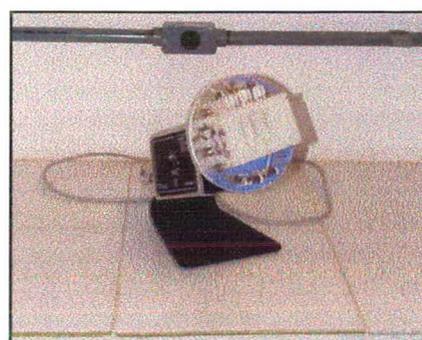
² Pérolas magnéticas Biomag® são partículas magnetizadas recobertas com anticorpo anti-IgG, utilizadas para limpeza prévia das amostras; *Biotechnology Frontiers Inc. (BTF Inc.)*; Sydney, Austrália.

³ Pérolas magnéticas Biomag® são partículas magnetizadas, recobertas com anticorpo anti-IgG e sensibilizadas com anticorpo monoclonal (Mab) CRY104, dirigido contra *Cryptosporidium parvum* ou anticorpo monoclonal (Mab) G203, dirigido contra *Giardia lamblia*; *Biotechnology Frontiers Inc. (BTF Inc.)*; Sydney, Austrália.

1A foi colocado no tubo 1B, que permaneceu acoplado ao ímã por mais 5min. O sobrenadante do tubo 1B foi novamente descartado. Neste momento, as pérolas magnéticas que ficaram aderidas às paredes do tubo 1B foram ressuspensas com uma solução aquosa de glicina 0,1M, pH 2,5 e, após agitação vigorosa, o tubo foi novamente acoplado ao ímã por 5min. O sobrenadante obtido foi transferido para um outro tubo de 6 ml, que permaneceu em repouso na estante magnética durante 5min, sendo então filtrado com o auxílio da trompa de vácuo através de membrana filtrante (Nucleopore® Track-Etch Corning; 13mm de diâmetro; 0,8 μm).



9A



9B

Figura 9. 9A: Estante magnética. Fonte: Autora; 9B: Estante magnética sob agitação orbital. Fonte: Autora

IV.2.1.3 Preparação das amostras para detecção e quantificação por imunofluorescência direta

Após proceder a filtração dos sobrenadantes, sobre os filtros foram colocados 80 μl dos anticorpos monoclonais CRY104 e G203 conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) na diluição 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em TPP (C&G FITC® - *BTF Inc.*) e estes permaneceram em repouso na bancada por 5 min.

Em seguida, o vácuo foi ligado e o filtro lavado com algumas gotas do tampão TPP, sendo, em seguida, retirado cuidadosamente e colocado sobre uma lâmina de microscópio. Esta recebeu uma lamínula contendo tampão de montagem⁴.

⁴ Tampão de montagem = tampão PBS 40% + glicerol 50% + formalina 15% + solução de NaCl 5M 5%, adicionado de 2,5g de DABCO (1,4-diazilbicyclo-2,2,2-octano-Sigma D2522) para cada 100ml.

A lâmina foi observada no microscópio de epifluorescência (Olimpus® BX – FLA 40), 400X, filtro de 450 - 480 nm, filtro de barreira de 515nm. A contagem dos cistos e oocistos foi realizada, levando-se em consideração suas características morfológicas.

IV.3.2 Protocolo 2

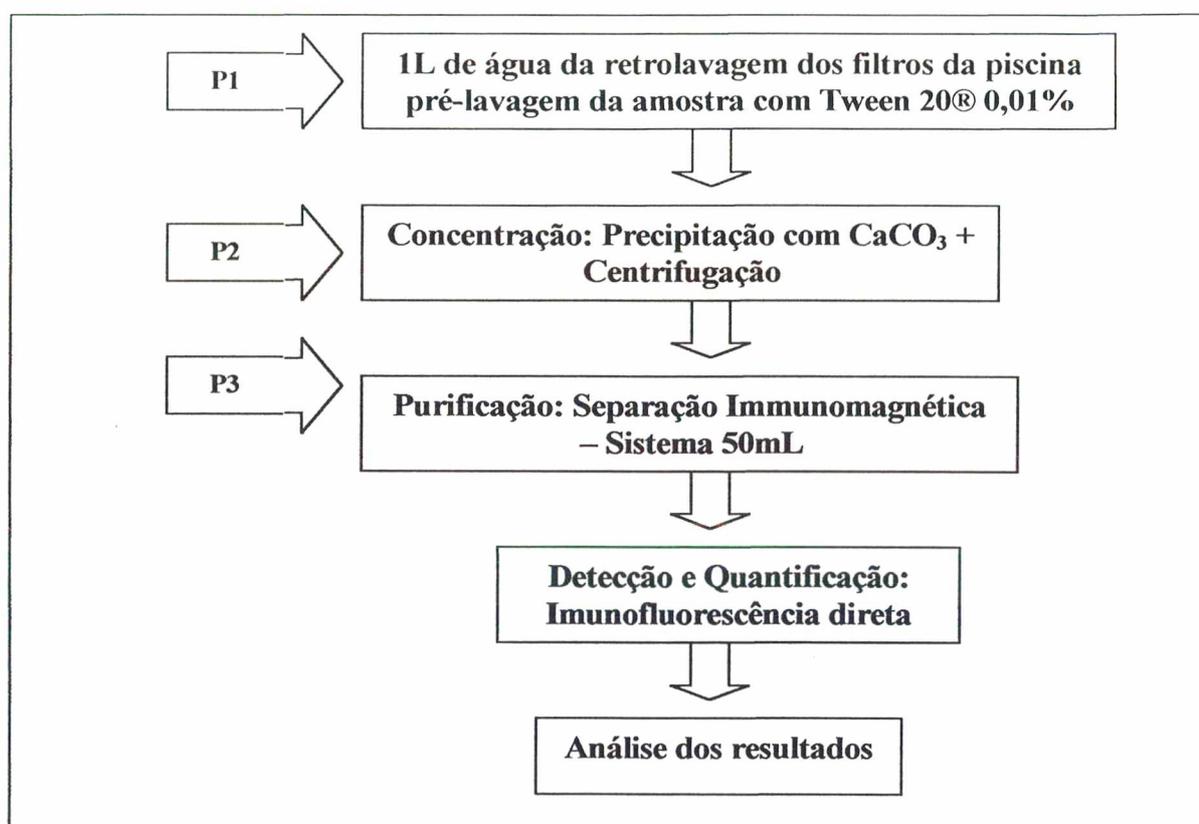


Figura 10. Fluxograma representando o esquema geral do protocolo 2.

IV.3.2.1 Procedimento para concentração das amostras de água da piscina olímpica da UFSC

Para padronização da técnica de concentração da água da piscina olímpica da UFSC, coletou-se 1L de água da retrolavagem dos filtros, que foi submetido a uma pré-lavagem com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%, em agitação constante, e incubado levemente inclinado para precipitação das sujidades, durante 60min. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e transferido para outra garrafa de 1L, onde foi semeado um tubo de ColorSeed CG® (BTF Inc.) (Anexo 1), que contém uma concentração conhecida de cistos e oocistos (diferem dos cistos e oocistos presentes na amostra, pois são corados

em vermelho com Texas Red[®]). Em seguida, 10 ml das soluções aquosas de NaHCO₃ 1M e de CaCl₂ 1M foram adicionadas e acrescentou-se, adicionalmente, 10 ml de uma solução aquosa de NaOH 1N até que o pH 10 fosse atingido. Após incubação, durante uma noite, para precipitação dos flocos de CaCO₃ formados, o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma trompa de vácuo, deixando um volume mínimo do mesmo sobre o precipitado. Esse foi dissolvido adicionando-se qsp de uma solução aquosa de ácido sulfâmico a 10%. A suspensão formada foi centrifugada durante 10min, 5.000 Xg, a temperatura ambiente, e o sobrenadante foi retirado. O precipitado foi ressuspensionado numa solução aquosa de Tween 20[®] a 0,01%. Uma nova centrifugação foi realizada para obtenção do menor volume possível no fundo do tubo.

IV.3.2.2 Separação imunomagnética

O precipitado final obtido foi ressuspensionado no tampão das pérolas paramagnéticas (tampão TPP) e transferido para um tubo tipo Falcon de 50ml, rotulado como tubo 1A. A esse tubo, adicionou-se pérolas Pre-Clear Beads[®], previamente agitadas (com agitador tipo Vortex) e o mesmo foi colocado em um agitador orbital por 5min. Após este período, o tubo foi acoplado ao ímã (Figura 11A), onde permaneceu por 30min.

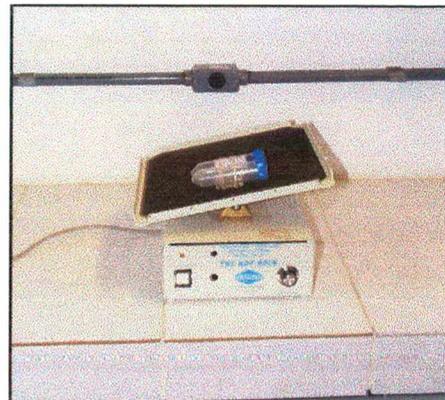
Com auxílio de uma pipeta de vidro do tipo Pasteur pré-molhada no tampão TPP, o sobrenadante foi retirado e colocado em um tubo rotulado de 1B. Ao tubo 1A, foi acrescentado o tampão TPP e, após agitação vigorosa, este permaneceu em repouso na bancada por 5 min, e posteriormente, foi acoplado ao ímã, sobre a mesa de agitação, por 5min (Figura 11B). Ao tubo 1B foram adicionados as pérolas magnéticas ligadas aos anticorpos CRY104 e G203 (IMS Beads[®]), previamente agitadas (com agitador tipo Vortex). O tubo foi colocado em agitação orbital por 5min. Em seguida, o sobrenadante do tubo 1A foi transferido para o tubo 1B e o tubo 1A descartado. O tubo 1B foi agitado, colocado em agitação orbital por 15 min e acoplado ao ímã, sobre a mesa de agitação, por 5min.

Posteriormente, o sobrenadante do tubo 1B foi colocado em um tubo denominado 1C, que foi acoplado ao ímã por mais 5min. Ao tubo 1B foi adicionado tampão TPP para ressuspender as pérolas. O sobrenadante do tubo 1C foi descartado e as pérolas colocadas no tubo 1B. O tubo 1B foi acoplado novamente ao ímã, onde permaneceu por 15 min. O sobrenadante do tubo 1B foi, então, descartado. Neste momento, as pérolas magnéticas que

ficaram aderidas às paredes do tubo 1B foram ressuspensas com uma solução aquosa de glicina 0,1M, pH 2,2 e, após agitação vigorosa, o tubo foi acoplado ao ímã por 5min. O sobrenadante obtido foi transferido para um tubo de 6ml que permaneceu em repouso na estante magnética durante 5min, sendo então filtrado com o auxílio da trompa de vácuo através de membrana filtrante (Nucleopore® Track-Etch Corning; 13mm de diâmetro; 0,8 μm).



11A



11B

Figura 11. 11A: Tubos de 50ml, acoplados ao ímã, para separação imunomagnética. Fonte: Autora; 11B: Tubos de 50ml, acoplados ao ímã, para separação imunomagnética, sobre a mesa de agitação. Fonte: Autora.

IV.3.2.3 Preparação da amostra para detecção e quantificação por imunofluorescência

Sobre os filtros foram colocados 80 μl dos anticorpos monoclonais CRY104 e G203 FITC na diluição de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão para anticorpo (tampão TPP + soro de camundongo - 3:1), e estes permaneceram em repouso na bancada por 5 min.

Em seguida, o vácuo foi ligado e o filtro lavado com algumas gotas do tampão TPP, sendo, então, retirado cuidadosamente e colocado sobre uma lâmina de microscópio. Esta recebeu uma lamínula contendo tampão de montagem e foi observada ao microscópio de epifluorescência, Olympus® BX –FLA 40, 400X, filtro de 450-480nm, filtro de barreira de 515nm para leitura da marcação com FITC (verde) e filtro 545-580 nm, filtro de barreira de 619nm para leitura da marcação com Texas Red® (vermelho). A contagem dos cistos

(Figura 12a) e oocistos (Figura 12b) foi realizada, levando-se em consideração suas características morfológicas e a coloração fluorescente em cada um dos filtros.

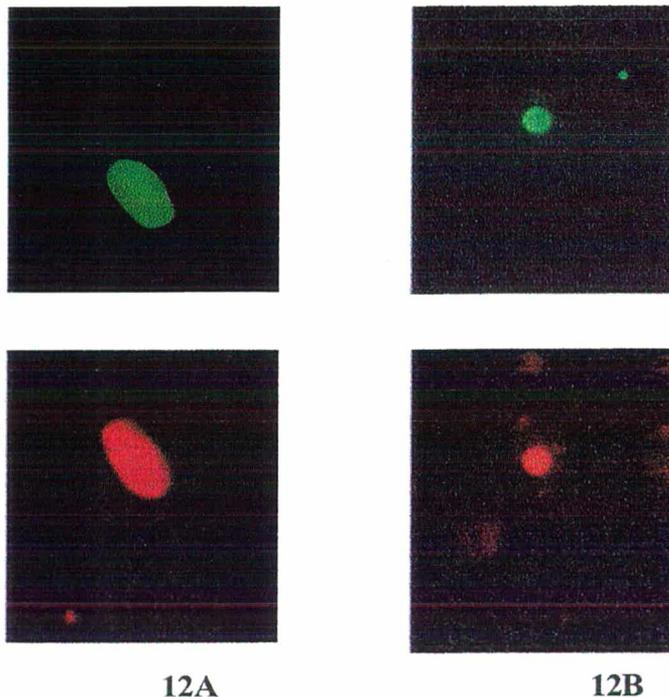


Figura 12. 10A. Cistos de *Giardia* spp. marcados em verde com FITC e em vermelho com Texas Red® (Color Seed CG®). 10B. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. marcados em verde com FITC e em vermelho com Texas Red® (ColorSeed CG®). Fonte: Autora.

IV.3 METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM ÁGUAS

A determinação de coliformes totais e fecais foi realizada através da técnica de fermentação em tubos múltiplos, a qual é dividida em duas etapas: ensaio presuntivo, que indica a presença de coliformes, e um ensaio confirmativo, que evidencia a presença de coliformes fecais e totais (APHA, 1992).

IV.3.1 Ensaio presuntivo

Inicialmente, foram preparados os tubos de caldo lauril sulfato triptose (LST – Merck 1.20266) conforme as especificações do fabricante, acrescido de púrpura de

bromocresol (0,01g/L e 0,02g/L) e tubos de Duhan invertidos, os quais foram posteriormente autoclavados

A amostra foi homogeneizada 25 X, através da inversão da garrafa onde foi coletada. Três séries de tubos foram realizadas inoculando-se 10; 1 e 0,1mL da amostra. Para a primeira série de tubos volumes de 10ml de amostra foram inoculados, com pipeta esterelizada de 10mL, em uma série de 5 tubos contendo 10mL de LST 2X. Para a segunda série de tubos volumes de 1ml de amostra foram inoculados, com auxílio de uma pipeta de 5ml esterilizada, em uma série de 5 tubos contendo 10mL de LST 1X. Para a terceira série de tubos a amostra foi diluída a 10^{-1} com água peptonada 0,1% e, dessa diluição, volumes de 1mL foram inoculados, com auxílio de uma pipeta de 5ml esterilizada, em 5 tubos contendo LST 1X.

Os tubos foram incubados a $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 h, em incubadora bacteriológica Fanem®. Após este período, os tubos foram considerados positivos quando ocorreu a produção de ácido, evidenciada pela alteração da cor do meio de roxo para amarelo, e/ou pela produção de gás, demonstrada pela presença de gás nos tubos de Duhan. Os tubos negativos foram novamente incubados por um período adicional de 24 ± 1 h.

IV.3.2 Ensaio confirmativo

Para a realização do ensaio confirmativo, todos os tubos com resultado positivo, em LST com púrpura de bromocresol, nas leituras de 24 ± 2 h e 48 ± 3 h, foram submetidos à confirmação imediatamente após as respectivas leituras.

O ensaio confirmativo foi efetuado utilizando-se caldo verde brilhante bile (VB – Merck 1.05454) para determinação de coliformes totais, e caldo E. coli (ECM – Merck 1.10765) para determinação de coliformes fecais.

IV.3.2.1 Confirmação para coliformes totais

Cada tubo de LST, com resultado presuntivo positivo, foi agitado e, com o auxílio de uma alça de platina estéril, o material foi inoculado no tubo VB correspondente e incubados durante 24 a 48 h a $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A leitura foi realizada, considerando como teste confirmativo positivo para coliformes totais todos os tubos que apresentaram formação de gás no tubo de Durhan invertido. Os resultados foram anotados e o número mais provável

(NMP/100mL) foi calculado com auxílio de uma tabela de NMP (Anexo 2) apropriada às diluições inoculadas (10; 1 e 0,1 mL).

IV.3.2.2 Confirmação para coliformes fecais

Cada tubo LST, com resultado presuntivo positivo, foi agitado e, com auxílio de uma alça de platina estéril, o material foi inoculado nos tubos ECM correspondente e incubados, em banho-maria, a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$, durante 24 ± 2 h. A leitura foi realizada, considerando como teste confirmativo positivo para coliformes fecais todos os tubos que apresentaram formação de gás no tubo de Duhan invertido. Os resultados foram anotados e o número mais provável (NMP/100mL) foi calculado com auxílio de uma tabela de NMP (Anexo 2) apropriada às diluições inoculadas (10; 1 e 0,1 mL).

IV.4 CONTROLE DO PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para testar o desempenho das técnicas, foram semeados oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em determinados estágios do processo (P1=antes da precipitação com CaCO_3 ; P2=antes da centrifugação; P3=após a centrifugação).

Para o processamento das amostras, adicionou-se um tubo de Color Seed[®]. Esse procedimento serviu como controle interno para verificar o desempenho da metodologia e obtenção, através de um padrão de correção interno, a quantidade exata de cistos e oocistos presentes na amostra.

Todas as informações de cada amostra foram registradas em fichas de controle que facilitam o acompanhamento das modificações da técnica no decorrer da padronização, bem como a análise dos resultados (Anexo 3).

IV.5 PRECAUÇÕES

Durante a realização dos experimentos algumas precauções foram tomadas para impedir a contaminação do manipulador e otimizar as metodologias empregadas, dentre elas:

- uso de luvas descartáveis e máscara durante todo o processo;
- descontaminação dos materiais utilizados através da autoclavagem;

- descarte do material biológico utilizado como lixo hospitalar, em recipiente adequado;
- filtração do tampão TPP antes do uso;
- autoclavação de todos os materiais e reagentes utilizados na pesquisa de coliformes;
- uso de capela de fluxo laminar para inoculação das amostras nos meios de cultura.

IV.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As interpretações dos dados de percentagem de recuperação dos cistos e oocistos, nas diferentes condições nas quais os experimentos foram conduzidos, foram avaliadas estatisticamente. Anteriormente a estas análises, os dados foram submetidos ao teste de F-máximo para verificar a heterogeneidade das variâncias (S^2). Desta forma, os dados de percentagem de recuperação dos cistos e oocistos que apresentaram valores significativos para o F-máximo ($F_{m\acute{a}x.} = S^2_{>} / S^2_{<}$) foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $(Y+0,5)$. Posteriormente, estes dados foram submetidos à análise de variância e, quando necessário, ao teste de separação de médias (Teste de Tukey a 5%), segundo as recomendações de SOKAL & ROHFL (1995) e CENTENO (1999). As análises e gráficos foram feitas com auxílio do programa Microsoft Excel®.

V. RESULTADOS

V.1 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM ÁGUA

Para a padronização das metodologias de precipitação com carbonato de cálcio, centrifugação, separação imunomagnética e imunofluorescência direta foram analisados os principais fatores que poderiam interferir na recuperação dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. As técnicas foram inicialmente realizadas com água destilada e depois aplicadas na análise das amostras de água provenientes da retrolavagem dos filtros da piscina olímpica da UFSC.

V.1.1 Avaliação da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. por precipitação com CaCO_3 .

Para a determinação da eficácia da precipitação com CaCO_3 , no que diz respeito à recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em água destilada, foram avaliados os parâmetros: volume da amostra e concentração de CaCO_3 , através da inclusão de padrão interno em três diferentes pontos do processo.

Inicialmente, o volume utilizado (protocolo 1) era de 10L de água destilada, e o processamento da amostra resultava em baixas recuperações. Devido às grandes perdas ocorridas, três pontos do processo foram escolhidos para serem avaliados. Os pontos foram denominados de P1= início do processo antes da precipitação; P2= antes da centrifugação; P3= antes da separação imunomagnética. Os resultados são demonstrados na Figura 13 e na Tabela 2.

Posteriormente, passou-se a analisar o volume da amostra de 1L (protocolo 2) com o objetivo de comparar os percentuais de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em relação aos valores obtidos utilizando-se 10L. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 3 e 4.

A precipitação com CaCO_3 também foi avaliada modificando-se as concentrações de CaCl_2 0,1M e NaHCO_3 0,1M requeridas para sua formação. Para este experimento foi utilizado um padrão de 35 oocistos/L e volume de amostra de 1L. Concentrações de 1%,

2% e 3% de soluções aquosas de CaCl_2 0,1M e NaHCO_3 0,1M foram comparadas através da análise da variância e aplicação do Teste de Tukey (5%). Os resultados podem ser observados na Figura 14 e na Tabela 5.

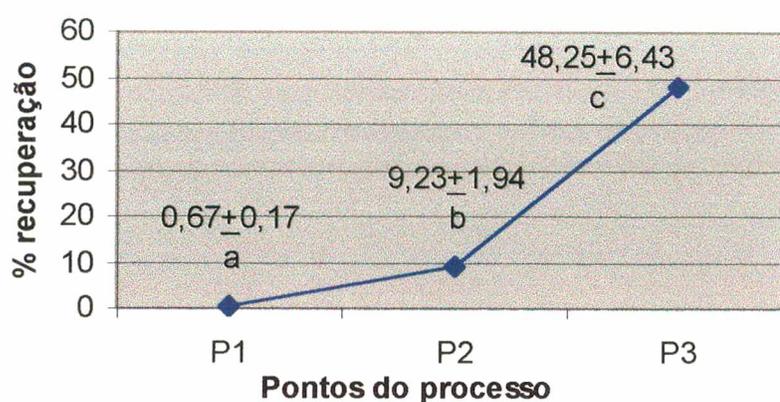


Figura 13. Porcentagem média de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em água destilada, em três diferentes pontos do processo (P1= antes da precipitação; P2= antes da centrifugação; P3= antes da separação imunomagnética). Médias de três repetições; as letras minúsculas indicam valores, que diferem estatisticamente entre si, para o Teste de Tukey (5%).

Tabela 2. Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em diferentes pontos do processo, utilizando volume de 10 L de água destilada.

| causas de variação | GL | SQ | QM | Fcalc. |
|--------------------|----------|----------------|----------|---------------|
| entre os pontos | 2 | 2319,55 | 1159,775 | 202,04 |
| dentro dos pontos | 6 | 34,44 | 5,740 | |
| TOTAL | 8 | 2353,99 | | |

Valor de F tabelado: $F_{0,05(14)} = 7,71$

GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio

Tabela 3. Avaliação da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em água destilada, a partir de diferentes volumes de amostra.

| Volumes (L) | Porcentagem média de recuperação \pm S (n=3) |
|-------------|--|
| 1 | 21,33 \pm 6,03 |
| 10 | 0,67 \pm 0,17 |

S= desvio padrão

Tabela 4. Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em água destilada, a partir de diferentes volumes de amostra.

| Causas de variação | GL | QM | Fcalculado |
|--------------------|----|----------|---------------|
| Entre os volumes | 1 | 1341,035 | 125,02 |
| Dentro dos volumes | 4 | 10,72653 | |
| TOTAL | 5 | | |

Valor de F tabelado: $F_{0,05(1,4)} = 7,71$

GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio

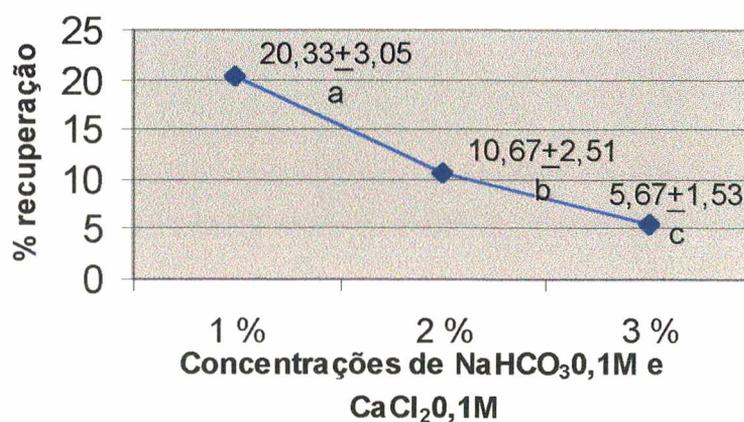


Figura 14. Porcentagem média de recuperações dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em água destilada, variando as concentrações de NaHCO_3 0,1M e CaCl_2 0,1M utilizados para a precipitação com CaCO_3 . Médias de três repetições; as letras minúsculas indicam valores, que diferem estatisticamente entre si, para o Teste de Tukey (5%).

Tabela 5. Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em água destilada, em função das concentrações utilizadas de CaCl_2 0,1M e NaHCO_3 0,1M (1%, 2% e 3%).

| Causas de variação | GL | QM | Fcalc. |
|---------------------------|-----------|-----------|---------------|
| Entre as concentrações | 2 | 124,1518 | 26,94 |
| Dentro das concentrações | 6 | 4,609011 | |
| TOTAL | 8 | | |

Valor de F tabelado: $F_{0,05(2,6)} = 5,14$

GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio

V.1.2 Avaliação dos controles de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.

Os primeiros experimentos foram realizados utilizando-se como controle um concentrado de oocistos de *Cryptosporidium* spp. com aproximadamente 35 oocistos/L, quantificados em hemocitômetro, denominado de Padrão LVA. Posteriormente, foram adquiridos concentrados de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., com concentrações conhecidas, denominado de padrão ColorSeed®. Estes dois controles foram avaliados e comparados através da análise da variância (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Avaliação da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em água destilada, utilizando diferentes controles internos.

| Controles internos | Porcentagem média de recuperação \pm S (n=3) | |
|---------------------------|--|----------------------------|
| | <i>Cryptosporidium</i> spp. | <i>Giardia</i> spp. |
| Padrão LVA* | 21,33 \pm 6,03 | - |
| Padrão ColorSeed® | 20,67 \pm 0,57 | 21,67 \pm 2,52 |

* O padrão LVA (Laboratório de Virologia Aplicada) continha apenas oocistos de *Cryptosporidium* spp. S= desvio padrão

Tabela 7. Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em água destilada, utilizando diferentes controles.

| Causas de variação | GL | QM | Fcalc. |
|---------------------------|-----------|-----------|---------------|
| Entre os controles | 1 | 0,1536 | 0,0168 |
| Dentro dos controles | 4 | 9,126233 | |
| TOTAL | 5 | | |

Valor de F tabelado: $F_{0,05(1,4)} = 7,71$
 GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio

V.1.3 Avaliação da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes fases do processamento das amostras.

Para observação das possíveis perdas durante o processo foi incluído o padrão ColorSeed CG®, em três diferentes pontos das metodologias de precipitação, centrifugação, separação imunomagnética e imunofluorescência direta. Neste experimento foi utilizado um volume de amostra de 1L e concentração de NaHCO_3 0,1M e CaCl_2 0,1M de 1% para precipitação com CaCO_3 . As porcentagens de recuperação podem ser observadas na Figura 15 e a comparação dos resultados foi realizada através da análise da variância e pode ser observada na Tabela 8.

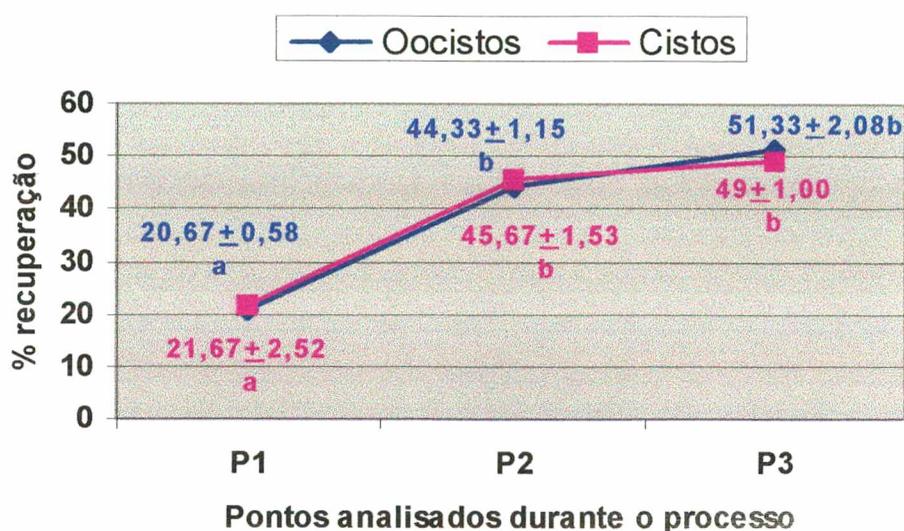


Figura 15. Porcentagem média de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em água destilada, em três diferentes pontos do processo (P1= antes da precipitação; P2= antes da centrifugação; P3= antes da separação imunomagnética), com volume de 1L. de água destilada. Média de três repetições; as letras minúsculas indicam valores, que diferem estatisticamente entre si, para o Teste de Tukey (5%).

Tabela 8. Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em água destilada, em três diferentes pontos do processo.

| Causas de variação | GL | <i>Cryptosporidium</i> spp. | | <i>Giardia</i> spp. | |
|--------------------|----|-----------------------------|---------------|---------------------|---------------|
| | | QM | Fcalc. | QM | Fcalc. |
| Entre os pontos | 2 | 289,303 | 425,51 | 248,922 | 180,08 |
| Dentro dos pontos | 6 | 0,67988 | | 1,383 | |
| TOTAL | 8 | | | | |

Valor de F tabelado: $F_{0,05(2,6)} = 5,14$

GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio

V.1.4 Avaliação da metodologia para análise das amostras de água da retrolavagem dos filtros da piscina olímpica da UFSC.

Para a padronização da metodologia foram utilizadas amostras de água da retrolavagem dos filtros da piscina olímpica da UFSC. As primeiras amostras foram processadas conforme os resultados da padronização feita com água destilada, ou seja, utilizando volume de amostra de 1L, ColorSeed® como padrão interno, 1% de solução aquosa de NaHCO_3 0,1M e CaCl_2 0,1M para precipitação do CaCO_3 .

Os baixos resultados preliminares de recuperação obtidos nesta etapa exigiram outras modificações metodológicas, a saber:

- antes de acrescentar o padrão interno e iniciar o processo de concentração da água (volume de 1L), foi realizado um tratamento prévio da amostra com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%;
- na etapa da separação imunomagnética, o volume avaliado passou de 6mL para 50mL (tubo 1A).

Os resultados obtidos após estas modificações e a comparação desses com aqueles obtidos anteriormente, assim como os resultados da análise da variância dos mesmos, podem ser visualizados nas Tabelas 9 a 13.

Tabela 9. Avaliação da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em amostras de água da piscina, sem e com tratamento prévio com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%, analisando diferentes volumes na etapa da separação imunomagnética.

| Volume utilizado na separação imunomagnética | Precipitado médio obtido (ml) | Porcentagem média de recuperação \pm S (n=3) | |
|--|-------------------------------|--|---------------------|
| | | <i>Cryptosporidium</i> spp. | <i>Giardia</i> spp. |
| 6ml* | 3 | 0 | 0 |
| 50ml* | 3,3 | 2,67 \pm 1,15 | 3,33 \pm 1,53 |
| 6ml** | 0,5 | 6,00 \pm 3,61 | 7,33 \pm 0,58 |
| 50ml** | 0,6 | 23,00 \pm 4,36 | 18,67 \pm 2,08 |

* sem pré-lavagem com Tween 20 ® (0,01%), ** com pré-lavagem com Tween 20 ® (0,01%)

S=desvio padrão

Tabela 10. Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., em amostras de água da piscina, sem tratamento prévio com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%, analisando volumes de 6 e 50 ml na etapa da separação imunomagnética.

| Causas de variação | GL | <i>Cryptosporidium</i> spp. | | <i>Giardia</i> spp. | |
|--------------------|----|-----------------------------|--------------|---------------------|--------------|
| | | QM | Fcalc. | QM | Fcalc. |
| Entre os volumes | 1 | 329,709 | 30,91 | 71,346 | 28,12 |
| Dentro dos volumes | 4 | 10,667 | | 2,537 | |
| TOTAL | 5 | | | | |

Valor de F tabelado: $F_{0,05(1,4)} = 7,71$

GL= grau de liberdade; QM= quadrado médio

Tabela 11. Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em amostras de água destilada e da piscina, sem tratamento prévio com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%, analisando o volume de 50ml na etapa da separação imunomagnética.

| Causas de variação | GL | <i>Cryptosporidium</i> spp. | | <i>Giardia</i> spp. | |
|---------------------|----|-----------------------------|--------------|---------------------|---------------|
| | | QM | Fcalc. | QM | Fcalc. |
| Entre as amostras | 1 | 330,784 | 25,48 | 429,430 | 105,84 |
| Dentro das amostras | 4 | 12,985 | | 4,0574 | |
| TOTAL | 5 | | | | |

Valor de F tabelado: $F_{0,05(1,4)} = 7,71$

GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio

Tabela 12. Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em amostras de água da piscina, sem e com tratamento prévio com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%, analisando o volume de 50ml na etapa da separação imunomagnética.

| Causas de variação | GL | <i>Cryptosporidium</i> spp. | | <i>Giardia</i> spp. | |
|------------------------|----|-----------------------------|--------------|---------------------|--------------|
| | | QM | Fcalc. | QM | Fcalc. |
| Entre os tratamentos | 1 | 529,596 | 90,14 | 328,56 | 89,53 |
| Dentro dos tratamentos | 4 | 5,875 | | 3,670 | |
| TOTAL | 5 | | | | |

Valor de F tabelado: $F_{0,05(1,4)} = 7,71$

GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio

Tabela 13. Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em amostras de água destilada e da piscina, com tratamento prévio com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%, analisando o volume de 50ml na etapa da separação imunomagnética.

| Causas de variação | GL | <i>Cryptosporidium</i> spp. | | <i>Giardia</i> spp. | |
|---------------------|----|-----------------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | | QM | Fcalc. | QM | Fcalc. |
| entre as amostras | 1 | 30,465 | 4,66 | 6,742 | 2,54 |
| dentro das amostras | 4 | 6,540 | | 2,653 | |
| TOTAL | 5 | | | | |

Valor de F tabelado: $F_{0,05(14)} = 7,71$

GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio

V.2 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PADRONIZADA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. E CISTOS DE *Giardia* spp. EM AMOSTRAS DE ÁGUA DA RETROLAVAGEM DOS FILTROS DA PISCINA OLÍMPICA DA UFSC

Após a padronização da metodologia usando amostras de água destilada e da introdução de algumas modificações técnicas usando amostras da própria piscina, foi elaborado o protocolo 2, que foi utilizado para analisar as amostras de água da piscina olímpica da UFSC coletadas nos meses de dezembro de 2000 a agosto de 2001, com exceção do mês de março de 2001, quando o filtro da piscina foi reformado.

Amostras mensais foram processadas em triplicata, o padrão interno ColorSeed C&G® foi incluído em todas as análises e as informações referentes a cada amostra foram registradas nas Fichas do Processamento de Amostra (Anexo 3).

Os resultados da avaliação da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., contidos no padrão interno ColorSeed CG®, relacionando-a com o volume dos precipitados obtidos após a centrifugação, estão na Tabela 14, que mostra também os resultados das análises das amostras coletadas de água da piscina olímpica da UFSC. Os primeiros também podem ser melhor visualizados graficamente na Figura 16.

Tabela 14. Avaliação da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. contidos no padrão interno ColorSeed C&G®, relacionando-a com o volume dos precipitados obtidos e resultados das análises das amostras de água coletadas da piscina olímpica da UFSC.

| Meses | %rec. Oocistos | %rec. Cistos | Resultados das análises | | Volume do precipitado (ml) |
|-------------------|-------------------|------------------|--|------------------------------------|----------------------------|
| | ColorSeed® * | ColorSeed® ** | <i>Cryptosporidium</i> spp. Oocistos/L*** | <i>Giardia</i> spp. Cistos/L*** | |
| dezembro 2000 | 21 | 17 | - | 6 | 0,5 |
| | 20 | 18 | 2 | - | 1 |
| | 28 | 21 | 4 | 3 | 0,5 |
| janeiro 2001 | 5 | 4 | - | - | - [◇] |
| | 0 | 1 | - | - | - [◇] |
| | 3 | 2 | - | - | - [◇] |
| fevereiro 2001 | 18 | 13 | 5 | 15 | 0,3 |
| | 9 | 12 | 2 | 8 | 0,25 |
| | 7 | 18 | 7 | 10 | 0,5 |
| março 2001 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| abril 2001 | 25 | 27 | - | - | 0,3 |
| | 25 | 23 | - | - | 0,5 |
| | 22 | 25 | - | - | 0,5 |
| maio 2001 | 18 | 21 | - | - | 1 |
| | 23 | 19 | - | - | 0,5 |
| | 19 | 27 | - | - | 0,5 |
| junho 2001 | 29 | 21 | - | - | 0,5 |
| | 23 | 19 | - | - | 0,5 |
| | 30 | 27 | - | - | 0,5 |
| julho 2001 | 23 | 21 | - | - | 0,5 |
| | 21 | 19 | - | - | 0,5 |
| | 27 | 27 | - | - | 0,5 |
| agosto 2001 | 21 | 21 | - | - | 0,5 |
| | 27 | 23 | - | - | 0,5 |
| | 19 | 29 | - | - | 1 |

[◇] Não foi possível medir o precipitado obtido.

(-) No mês de março não foram realizadas as análises porquê houve troca do filtro da piscina.

*Média da % de recuperação dos oocistos \pm desvio padrão: 21,67 \pm 5,06; CV = 23%

**Media da % de recuperação dos cistos \pm desvio padrão: 21,00 \pm 3,54; CV = 17%

*** O número de cistos e oocistos, presentes na amostra analisada, foi calculado a partir da equação

(BENNETTE *et al.*, 1999; REYNOLDS *et al.*, 1999; Anexo 1):

$$n^{\circ} \text{ de cistos ou oocistos na amostra} = \frac{\text{cistos ou oocistos detectados} \times 100^{\ddagger}}{\% \text{ de recuperação do ColorSeed C\&G}^{\circledast}}$$

[‡] cistos e oocistos detectados = marcados apenas com FITC

A % de recuperação do ColorSeed C&G® foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de recuperação} = \frac{n^{\circ} \text{ de cistos e oocistos marcados com Texas Red}^{\circledast}(\text{vermelho})}{n^{\circ} \text{ de ColorSeed C\&G}^{\circledast} \text{ semeado (indicado no tubo)}}$$

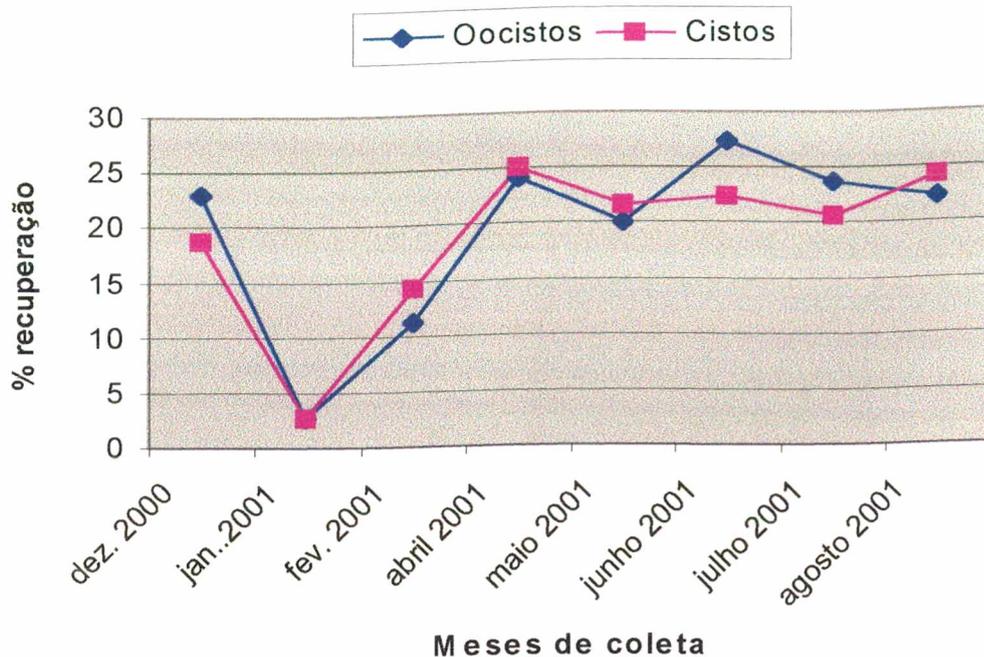


Figura 16. Porcentagem média de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., em amostras de água da piscina olímpica da UFSC, contidos no padrão interno ColorSeed C&G®. (No mês de março não foram realizadas as análises porque houve a troca do filtro da piscina).

V.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DA PISCINA OLÍMPICA DA UFSC

A determinação do número mais provável (NMP) de coliformes nas amostras de água da piscina foi realizada através da aplicação da técnica de tubos múltiplos. O processamento das amostras de água para realização dessa técnica ocorreu em paralelo ao processamento das amostras de água para detecção e quantificação dos parasitas em estudo.

Os resultados obtidos, em todos os meses, mostraram ausência de coliformes totais e fecais por 100 ml de água (dados não mostrados).

VI. DISCUSSÃO

Os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. são freqüentemente encontrados em águas superficiais (ROSE *et al.*, 1986; ONGERTH & STIBBS, 1987; LE CHEVALLIER *et al.*, 1991), sendo responsáveis por várias epidemias ocorridas após a utilização de água para consumo humano e águas recreacionais contaminadas (BELL *et al.*, 1993; McANULTY, FLEMING, GONZALEZ, 1994; MACKENZIE *et al.*, 1995; KUCZYNSKA & SHELTON, 1999).

A capacidade desses parasitas de causar gastroenterites em pessoas imunocompetentes (MACKENZIE *et al.*, 1994) e imunocomprometidas (COOK, 1987; PETERSEN, 1992; BERKELMAN, 1994) já é bem conhecida. Em indivíduos saudáveis, os sintomas mais freqüentes são cólicas abdominais, febre, vômito e diarreia persistindo por 3 a 12 dias (MACKENZIE *et al.*, 1994). Em indivíduos imunocomprometidos, a criptosporidiose adquire grande importância, pois a infecção pode tornar-se crônica ou causar diarreia persistente, devido ao seu ciclo de auto-infecção interna, o que pode colocar a vida dos pacientes em risco (CALL *et al.*, 2001).

Como resultado de toda esta problemática, tornou-se necessário pesquisar a eventual presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada para uso humano. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) vem desenvolvendo metodologias para detecção de *Cryptosporidium* spp. em água desde 1995 (USEPA, 1995, 1999a, 1999b). No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou, em 29 de dezembro de 2000, a Portaria nº1469 (BRASIL, 2000), onde é recomendada a inclusão da pesquisa de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água. Existem poucos estudos sobre a ocorrência desses parasitas em água no Brasil. Algumas pesquisas foram realizadas por HACHICH *et al.* (2000) e FRANCO *et al.* (2001), que verificaram a presença de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas águas captadas para consumo no Estado de São Paulo. Esses resultados ressaltam a importância da inclusão de técnicas padronizadas para a detecção desses parasitas, na rotina dos serviços de análise de água.

Muitas metodologias vêm sendo empregadas para otimizar a detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água, entre elas a citometria de fluxo (VESEY *et al.*, 1994; FERRARI *et al.*, 2000), a cultura celular (DI GIOVANI *et al.*, 1999), a

eletroquimioluminescência (LEE *et al.*, 2001), a reação em cadeia da polimerase (PCR) (CHAMPLIAUD *et al.*, 1998; KAUCNER e STINEAR 1998) e a separação imunomagnética (CAMPBELL e SMITH, 1997; BUKHARI *et al.*, 1998; McCUIN *et al.*, 2001; CALL *et al.*, 2001).

Tendo em vista que a dose infecciosa 50% (DI₅₀) relatada para *C. parvum* é de 132 oocistos, calculada a partir de infecções provocadas em voluntários quando um dos indivíduos se infectou com apenas 30 oocistos (DUPONT *et al.*, 1995), baixos níveis de contaminação ambiental com oocistos viáveis já é bastante significativa. A necessidade de detectar esses baixos níveis de contaminação e o pequeno volume usado nos ensaios de detecção requer, portanto, um procedimento eficiente para concentrar as amostras. No entanto, a concentração de água do ambiente apenas por retenção em membranas ou por centrifugação pode interferir em muitos ensaios por aumentar, proporcionalmente, a turbidez da amostra (CALL *et al.*, 2001). Os métodos atualmente aceitos envolvem uma etapa de concentração da água, outra de purificação dos cistos e oocistos e uma fase final de detecção e quantificação dos mesmos.

Este trabalho teve como objetivo detectar e quantificar oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em água de piscina. Para isso, foi escolhida e padronizada, para as condições do Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, a metodologia que combina as técnicas de precipitação com carbonato de cálcio, centrifugação, separação imunomagnética e imunofluorescência direta.

LE CHEVALLIER *et al.* (1995) demonstraram que a concentração da água utilizando apenas a técnica de centrifugação isoladamente, seguida de lavagens da amostra, resulta em perdas de aproximadamente 30% dos cistos e oocistos presentes na amostra a cada centrifugação. Para VESEY & SLADE (1990), as perdas durante a centrifugação ocorrem devido à destruição dos cistos e oocistos, durante a remoção do sobrenadante e agregação das partículas juntamente com os parasitas. Quando processos de filtração em membrana são utilizados, também se observa uma forte agregação das partículas, sendo esta, a principal causa da dificuldade de observação ao microscópio. Os mesmos autores também observaram que a desagregação dessas partículas por métodos físicos, como por exemplo, a sonicação, pode causar a destruição dos parasitas. Portanto, devido às perdas ocorridas, faz-se necessário a aplicação de uma técnica realmente efetiva para a concentração da água, de modo que a etapa de centrifugação seja minimizada.

Segundo os autores VESEY (1993), SHEPHERD & WIN-JONES (1996) e ZUCKERMAN *et al.* (1999), a técnica de precipitação com CaCO_3 associada à centrifugação pode ser uma técnica alternativa mais econômica para a concentração dos oocistos a partir de grandes volumes de água.

A técnica de separação imunomagnética acoplada à precipitação com carbonato de cálcio e à centrifugação, segundo McCUIN *et al.* (2001) é capaz de purificar cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.*, viáveis ou não, a partir de amostras de água com alta concentração de sujidades. CLANCY (1997), avaliou a separação imunomagnética acoplada à concentração por filtração, conforme o método 1622, e obteve resultados de recuperação entre 28% e 47%, posteriormente, considerados aceitáveis pelos critérios de controle de qualidade obtidos após a validação deste método (USEPA, 1999c). DI GIOVANNI *et al.* (1999) também demonstraram que a separação imunomagnética é capaz de remover uma quantidade maior de detritos quando comparada com a flutuação em gradiente de Percoll®-sacarose.

A técnica de imunofluorescência direta, utilizando anticorpos monoclonais, altamente específicos, torna-se uma ferramenta importante para a detecção e quantificação desses parasitas ao final do processo. No entanto, a imunofluorescência detecta todos os tipos de oocistos, ou seja, inviáveis, viáveis ou infectivos. Do ponto de vista epidemiológico, é importante detectar parasitas viáveis e também inviáveis, para se conhecer os níveis de tais parasitas no ambiente.

Porém, para que esses achados tenham validade para avaliação do risco da saúde pública, é necessário também atestar a viabilidade e a infectividade dos cistos e oocistos.

Conforme CLANCY (2000), independente do método que está sendo utilizado para o monitoramento, a avaliação do risco para a saúde pública deve ser realizada em conjunto com outros dados, que incluem as condições meteorológicas, falhas no tratamento da água e a presença da doença na comunidade.

VL1 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium spp.* E *Giardia spp.* EM ÁGUA

Nos primeiros experimentos foi utilizado o volume inicial de 10L, conforme sugerido por VESEY (1993a). Os resultados obtidos após a execução de toda a metodologia (precipitação com CaCO_3 / centrifugação / separação imunomagnética /

imunofluorescência direta), em água destilada, resultou em recuperações muito baixas com média de recuperação de $0,67 \pm 0,17$ em P1 (=amostra semeada antes da concentração com CaCO_3). A análise da recuperação obtida nos pontos P2 (=amostra semeada antes da centrifugação - $9,23 \pm 1,94$) e P3 (=amostra semeada antes da separação imunomagnética - $48,25 \pm 6,43$) indicou que as maiores perdas ocorriam durante os processos de precipitação e centrifugação (Figura 13 e Tabela 2).

Conforme o protocolo 1, a precipitação com CaCO_3 é composta de 4 fases: coleta de 10L de água, adição dos agentes precipitantes para formação de CaCO_3 , retirada do sobrenadante e dissolução do precipitado com ácido sulfâmico. Durante a execução deste protocolo foram observados fatores que poderiam estar contribuindo para as perdas, dentre eles, o grande volume que dificultava a homogeneização da amostra com os agentes precipitantes. Após a retirada do sobrenadante, devido ao grande volume do recipiente exigido para o experimento, um volume de aproximadamente 2L permanecia junto com o precipitado, o que dificultava sua dissolução. Para a dissolução do precipitado era necessário aproximadamente 0,5L de ácido sulfâmico, resultando, ao final do processo, aproximadamente 3L para serem centrifugados, durante 20 min., em tubos de 50ml x 4 (capacidade máxima da centrífuga disponível). Sendo assim, para centrifugar todo o volume proveniente da precipitação com CaCO_3 era necessário um período mínimo 20h e subdividir a amostra em 60 tubos de 50mL, o que, provavelmente, foi a causa das perdas durante a centrifugação. Para análise de uma amostra, após a realização de toda as técnicas (precipitação / centrifugação / separação imunomagnética / imunofluorescência), foram necessários 3 dias. Devido a estas dificuldades, algumas alterações foram necessárias para o aperfeiçoamento da metodologia.

KARANIS *et al.* (1996 e 1998) e DI GIOVANI *et al.* (1999) demonstraram a presença de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água final da retrolavagem dos filtros de estações de tratamento de água. Os grupos de pesquisadores citados utilizaram todos a filtração como método de concentração. A porcentagem da recuperação dos oocistos obtida pelos últimos autores foi de 9,1%, tendo sido pesquisada apenas a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de água da retrolavagem dos filtros. Os outros autores não citaram as recuperações obtidas.

KARANIS *et al.* (1998) demonstraram que, após a retrolavagem dos filtros de diferentes estações de tratamento de água para consumo na Alemanha, a água contaminada era eliminada para o ambiente, onde mais tarde poderia ser novamente captada pelo

sistema. Os mesmos autores sugeriram um processo adicional de desinfecção para esta água residual, evitando, desta forma, a manutenção da contaminação no ambiente.

No caso de piscinas, a análise da água da retrolavagem dos filtros pode ser útil para indicar a possível presença de pessoas infectadas utilizando a piscina. MACKENZIE *et al.* (1995) utilizaram a água de retrolavagem do filtro da piscina, como um dos parâmetros para avaliar uma epidemia de criptosporidiose ocorrida na cidade de Oshkosh (Wisconsin/EUA) em abril de 1993, possivelmente, associada ao uso da piscina de um hotel. Os outros parâmetros foram os resultados de um questionário padrão, que incluía perguntas sobre os dias de estadia no hotel, uso da piscina, da máquina de sorvete, os restaurantes onde se alimentaram, uso do vídeo-game (avaliado como possível fômite), as características clínicas da doença e o exame laboratorial das fezes das pessoas entrevistadas. Ao final da investigação, a piscina foi considerada a fonte responsável da contaminação das pessoas que estavam no hotel.

Visto que a água da retrolavagem dos filtros da piscina pode ser utilizada para avaliação da contaminação, foram utilizadas amostras de 1L de água da retrolavagem dos filtros da piscina olímpica da UFSC para execução das análises.

Inicialmente, volumes de 1L de água destilada foram usados para testar a recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. para serem, posteriormente, testadas as amostras provenientes da piscina.

Assim, os resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium*, utilizando 1L de água destilada, foram estatisticamente superiores aos obtidos quando se utilizou o volume inicial de 10L (Tabela 4). A média \pm desvio padrão de recuperação aumentou de $0,67 \pm 0,17$ para $21,33 \pm 6,03$ ($n=3$) (Tabela 3), indicando que o volume era uma das principais fontes de perdas durante o processo de precipitação com CaCO_3 . Esse resultado possibilitou o uso, posteriormente, de apenas 1L de água proveniente da retrolavagem dos filtros da piscina olímpica da UFSC.

Outra estratégia empregada para melhorar a recuperação dos oocistos foi o uso de diferentes concentrações de NaHCO_3 0,1M e CaCl_2 0,1M para a precipitação com CaCO_3 .

VESEY *et al.* (1993a) investigaram os efeitos da concentração dos reagentes para precipitação com CaCO_3 . As concentrações ótimas encontradas foram 1% de uma solução aquosa 0,1M de CaCl_2 , juntamente com 1% de uma solução aquosa 0,1M de NaHCO_3 por amostra de 1L de água, perfazendo ao final da reação 1% de CaCO_3 . Estas concentrações também foram utilizadas, no protocolo 1, neste trabalho. Estes mesmos autores observaram

que uma pequena diminuição na concentração dos reagentes não influenciou na recuperação. No entanto, o aumento da concentração desses sais resultou na diminuição da recuperação, devido ao grande volume de precipitado formado. As concentrações testadas não foram citadas por este autor.

Assim sendo, com o objetivo de aumentar a recuperação, foram testadas concentrações de 1, 2 e 3% de NaHCO_3 0,1M e CaCl_2 0,1M. As médias de recuperação obtidas para as três concentrações testadas (1%=20,33; 2%=10,67 e 3%= 5,67 – Figura 14) demonstraram que a utilização de 1% conduz a recuperações estatisticamente superiores às demais (Tabela 5). Nas concentrações de 2 e 3%, o volume do precipitado de CaCO_3 exigiu um volume maior da solução aquosa de ácido sulfâmico 10%(p/v) para sua dissolução, resultando em volumes maiores a serem centrifugados. Para a centrifugação, as amostras foram necessariamente aliqüotadas em volumes de 50ml, centrifugadas e os precipitados obtidos foram agrupados. A diminuição na recuperação, provavelmente, pode ter ocorrido devido a este aumento do volume destinado à centrifugação.

Segundo VESEY & SLADE (1990), as perdas durante a centrifugação ocorrem devido à ressuspensão dos oocistos e cistos durante a remoção do líquido sobrenadante.

Inicialmente, foi utilizado como controle dos experimentos um concentrado de 35 oocistos de *Cryptosporidium* spp./L, contados em hemocitômetro. Posteriormente, foram adquiridos os controles internos denominados de ColorSeed C&G® (=100 oocistos de *Cryptosporidium* e 100 cistos de *Giardia* / tubo contados por citometria de fluxo). Foi necessário, então, avaliar ambos os controles com o objetivo de comparar as taxas de recuperação obtidas.

As recuperações obtidas dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., testando os dois controles, não apresentaram diferenças significativas, após a análise da variância e aplicação do Teste F (Tabelas 6 e 7).

O controle interno ColorSeed C&G®, além de possuir baixa variação no número dos cistos e oocistos, é permanentemente marcado em vermelho com Texas Red®, o que facilita a quantificação. Essa característica faz com que ele possa ser utilizado como padrão interno em qualquer tipo de amostra, oportunizando a avaliação da eficiência da técnica. Segundo a USEPA (1999c), um aspecto importante no desenvolvimento de um método sensível, capaz de recuperar baixas doses de cistos e oocistos, é a quantidade de cistos e oocistos que serão semeados para o controle do processo, sugerindo, como ideal, o uso de 100 cistos e oocistos por amostra.

Devido a estas características, o ColorSeed C&G® passou a ser usado como controle da avaliação da qualidade da metodologia aplicada neste trabalho.

Foram realizados experimentos com água destilada, reunindo as alternativas encontradas para o melhoramento do protocolo 1 (volume de amostra de 1L, ColorSeed C&G® como controle interno e concentração de 1% das soluções aquosas de NaHCO₃ 0,1M e CaCl₂) e os resultados obtidos foram analisados com relação às possíveis perdas ocorridas durante o processo.

Após a análise dos resultados, foi constatado que durante todo o processo ocorrem perdas, mas as mais significativas ocorreram durante as etapas de precipitação e centrifugação (Tabela 8).

A média de recuperação obtida em P1, ou seja, analisando o processo completo foi de 20,67±0,58 para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de 21,67±2,52 para cistos de *Giardia* spp.(Figura 15).

Os métodos 1622 e 1623, padronizado pela agência de proteção ambiental dos EUA (USEPA, 1999a,b) para detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., preconizam como metodologias as técnicas de filtração, de separação imunomagnética e imunofluorescência direta, apresentando uma recuperação média de 35,3±13,0, em amostras semeadas com 100 oocistos de *Cryptosporidium* spp. e coeficiente de variação de 34,8 USEPA (1999c).

Conforme os mesmos autores, a validação do método 1622 ocorreu em 1998, a partir das análises realizadas por 13 laboratórios independentes. De acordo com os resultados obtidos da recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., foram estabelecidos critérios para o controle da qualidade das análises de *Cryptosporidium* spp. em água. Dentre eles, os critérios aceitáveis de porcentagem de recuperação, que pode variar de 10% a 100% e apresentar desvio padrão máximo aceitável de 54 (USEPA, 1999c).

Portanto, as recuperações obtidas neste trabalho de 20,67±0,58 para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e 21,67±2,52 para cistos de *Giardia* spp. podem ser considerados perfeitamente aceitáveis. Além disso, apresentam desvios padrões muito inferiores aos estabelecidos pela agência de proteção ambiental dos EUA (USEPA), demonstrando uma pequena variação entre as médias (Tabela 14).

Após a realização dos testes de padronização com água destilada, algumas amostras de água provenientes da retrolavagem dos filtros da piscina foram analisadas para avaliar a

eficácia da metodologia antes de proceder às análises mensais propriamente ditas. Inicialmente, foram aplicadas as condições que resultaram nas melhores recuperações: volume inicial de 1L, ColorSeed C&G® como controle interno e 1% das soluções aquosas de NaHCO_3 0,1M e CaCl_2 0,1M para precipitação com CaCO_3 . As demais condições foram aquelas preconizadas no protocolo 1.

Inesperadamente, não ocorreu recuperação alguma, tanto de cistos como de oocistos. Após a centrifugação, o precipitado médio obtido foi de 3ml (Tabela 9). Esse grande volume de precipitado dificultava o processamento da amostra durante a separação imunomagnética. Devido ao volume reduzido de 6ml dos tubos utilizados, o precipitado não permitia que as pérolas magnéticas fossem atraídas para o imã. Por esta razão, tubos de 50ml foram testados e a recuperação média foi de $2,67 \pm 1,15$ para oocistos e $3,33 \pm 1,53$ para cistos, diferenciando-se estatisticamente da porcentagem média de recuperação obtida quando utilizou-se tubos de 6ml, que foi de zero tanto para cistos e oocistos (Tabela 10). Baixos percentuais de recuperação, em amostras contendo grande precipitado e analisadas por separação imunomagnética, também foram observados por DI GIOVANNI *et al.* (1999), que obtiveram porcentagens de recuperação menor que 2,9%, quando analisaram amostras que continham precipitados maiores que 1,5ml.

Como alternativa de redução do volume de precipitado, foi realizada uma pré-limpeza nas amostras com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%. Segundo SMITH (1998), o uso de detergentes, como o Tween 20®, faz com que os cistos e oocistos sejam liberados de outras partículas presentes na amostra. Essas partículas podem incluir areia, resíduos de terra e até resíduos de pele, no caso de amostras de água de piscina.

Para a determinar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em fezes, esterco, adubos e solo, KUCZYNSKA & SHELTON (1999) testaram o uso ou não de soluções detergentes (TritonX-100®, Tween 80®, Tris + Tween 80®), de diferentes formas de dispersão das partículas (barra magnética, sonicação e agitação manual), combinados com diferentes técnicas de purificação através de flutuação (NaCl , sacarose, ZnSO_4). A combinação da solução detergente Tris + Tween 80®, dispersão das partículas por agitação com barra magnética e o uso de gradiente de NaCl para purificação, resultou nos melhores percentuais de recuperações, que variaram de 6% a 18% para as amostras testadas. No entanto, quando os autores não utilizaram a solução detergente para a dispersão das partículas, obtiveram recuperações menores que 0,1%. Isso indicou que ocorre uma forte

aderência entre as partículas sólidas e os cistos e oocistos, tornando o uso da solução detergente indispensável.

Neste trabalho (Tabela 9), pode-se observar que o precipitado médio obtido diminuiu de 3,3ml (sem pré-limpeza) para 0,6ml (com pré-limpeza). Utilizando tubos de 50ml para a separação imunomagnética, a porcentagem média de recuperação obtida com a inclusão desta pré-limpeza foi de $23,00 \pm 4,36$ para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e $18,67 \pm 2,08$ para cistos de *Giardia* spp., ou seja, estatisticamente superior à obtida quando não se realizou a pré-limpeza ($2,67 \pm 1,15$ para oocistos e $3,33 \pm 1,53$ para cistos) (Tabela 12).

Os resultados de recuperação obtidos com água destilada também foram comparados com os obtidos para água da retrolavagem dos filtros da piscina. As recuperações resultantes das amostras de água da retrolavagem dos filtros, tratadas com Tween 20®, não diferiram estatisticamente das obtidas para água destilada, após a análise da variância e aplicação do teste F (Tabela 13). Ao contrário, isso ocorreu quando os resultados da recuperação dos cistos e oocistos das amostras de água destilada foram comparados com aqueles obtidos para amostras de água da retrolavagem dos filtros da piscina, sem o tratamento prévio com Tween 20® (Tabela 11). Ao final destas análises foi possível concluir que o uso de tubos de 50ml e a pré-limpeza da amostra, em conjunto, melhoraram significativamente as recuperações dos cistos e oocistos nas amostras de água da retrolavagem dos filtros da piscina. Além disso, o tempo necessário para a realização do experimento que foi de 1 amostra/3 dias (Protocolo 1) diminuiu para 1 amostra/dia (Protocolo 2). O tempo foi minimizado, principalmente, pela utilização de um volume menor de amostra de água da retrolavagem dos filtros da piscina.

As modificações realizadas durante a padronização da metodologia, usando água destilada, e as alterações acrescentadas quando dos testes preliminares, realizados com amostras de água da retrolavagem dos filtros da piscina, deram origem ao protocolo 2, que foi utilizado para as análises mensais das amostras de água da piscina olímpica da UFSC.

VI.2 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PADRONIZADA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OOCISTOS E CISTOS EM ÁGUA DA RETROLAVAGEM DOS FILTROS DA PISCINA.

Durante os meses de dezembro de 2000 a agosto de 2001, observou-se uma grande homogeneidade nos resultados de recuperação, usando-se o ColorSeed C&G® como controle interno, conforme demonstrado na Tabela 14 e na Figura 16.

No mês de janeiro de 2001, não foi possível medir o precipitado formado devido ao uso de uma centrífuga com rotor de ângulo fixo (o precipitado permaneceu aderido na parede lateral do tubo). Nos meses subseqüentes, foi utilizada uma centrífuga com rotor de ângulo variável e, assim, o precipitado se depositou no fundo do tubo, podendo ser facilmente medido. A porcentagem de recuperação no mês de janeiro de 2001 também diminuiu bastante em relação aos outros meses, indicando a necessidade de utilizar apenas este tipo de rotor.

Nos meses de dezembro de 2000 e fevereiro de 2001, as amostras foram positivas para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (Tabela 14). No entanto, após a troca do filtro no mês de março de 2001, as amostras foram todas negativas. Isto indicou que a contaminação encontrada era provavelmente antiga, já que após a troca do mesmo não mais foi detectada a presença dos parasitas em estudo.

Conforme McCUIN *et al.* (2001), a separação imunomagnética perde a capacidade de separar cistos de *Giardia* spp. presentes no ambiente por mais de 20 meses. Isto ocorre, segundo os mesmos autores, devido ao declínio na concentração de antígenos na superfície do cisto em decorrência da idade do mesmo. Logo, os cistos e oocistos encontrados na piscina nos referidos meses, provavelmente, estavam presentes no filtro por um período não superior a 20 meses.

A viabilidade e a infectividade desses parasitas poderiam ser estabelecidas através do uso de técnicas de cultura celular seguidas por PCR (DI GIOVANNI *et al.*, 1999), amplificação do RNAm dos parasitas através de RT-PCR (GOBET&TOZE, 2001), estudos de desencistamento *in vitro* (MC CUIN *et al.* 2000) e inoculação em camundongos (FAYER, TROUT, JENKINS, 1998). Entretanto, não foi o objetivo deste trabalho atestar a viabilidade e a infectividade dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., mas identificar a ocorrência destes parasitas em água de piscina.

Assim, a combinação das técnicas de precipitação com CaCO_3 , centrifugação, separação imunomagnética e imunofluorescência direta mostrou ser uma ferramenta eficaz para detecção e quantificação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água de piscina.

VI.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DA PISCINA.

Segundo a Associação Americana de Saúde Pública (EATON *et al.*, 1995), para um indicador ser considerado ideal é importante observar algumas características, tais como, estar presente nas fezes de humanos e outros animais homeotérmicos; ocorrer em maior número que os patógenos usualmente presentes nas fezes; ser mais resistente aos principais agentes desinfetantes; ter o potencial mínimo para crescimento no ambiente aquático; ser detectado por metodologias simples e de baixo custo; e estar presente quando os outros patógenos também estiverem. As bactérias do grupo coliforme constituem o indicador de contaminação fecal mais utilizado, sendo empregadas como parâmetro bacteriológico básico na definição de padrões para o monitoramento da qualidade das águas destinadas ao consumo humano, bem como para a caracterização e avaliação da qualidade das águas em geral.

No entanto, segundo BITTON (1994), esses indicadores tradicionais de contaminação não são capazes de indicar a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., devido a grande resistência destes parasitas no ambiente aquático.

Com o objetivo de estabelecer uma possível relação entre os microorganismos indicadores de contaminação e a presença de protozoários nas amostras, foi também realizada a determinação mensal dos níveis de coliformes totais e fecais.

Nenhuma amostra foi positiva para coliformes fecais e totais, inclusive nos meses de dezembro de 2000 e fevereiro de 2001, onde foi observada positividade para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.. Esses resultados indicam que o tratamento utilizado na piscina da UFSC é eficaz na eliminação dos coliformes totais e fecais.

No entanto, a detecção de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp., deve servir de alerta, já que esses parasitas não são inativados com o cloro usualmente utilizado (BITTON, 1994).

VI.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As contribuições desta dissertação se referem ao estabelecimento de uma técnica eficaz para detecção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de piscina e alertam para a reavaliação dos critérios utilizados na seleção dos banhistas.

Abaixo, são apresentadas algumas sugestões para a realização futura de outras pesquisas correlatas:

- a padronização de técnicas para a determinação da viabilidade e infectividade dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp;
- a inclusão de um novo sistema de centrifugação, com capacidade para volumes maiores, como forma de minimizar as perdas durante esse processo e diminuir o tempo da análise;
- o desenvolvimento de um sistema automatizado para que a separação imunomagnética seja ainda mais eficiente para purificar os cistos e oocistos;
- a busca de outras alternativas para minimização do custo de execução das análises;
- um inquérito de avaliação clínica dos banhistas através da aplicação de questionários e exame físico, se possível, monitoramento da ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e outras parasitoses;
- o desenvolvimento de critérios para a utilização de piscinas, como a apresentação de exames após um determinado período, inclusão de banhos antes da entrada na piscina; lava-pés com teor mais elevado de cloro.

VII. CONCLUSÕES

- O uso da água da retrolavagem dos filtros da piscina permitiu a utilização de um menor volume de amostra para análise e facilitou a detecção dos parasitas em virtude da concentração prévia exercida pelo filtro.
- As concentrações ótimas para precipitação com carbonato de cálcio (CaCO_3), que apresentaram os melhores resultados de recuperação dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., foram de 1% das soluções aquosas 0,1M de CaCl_2 e NaHCO_3 .
- O ColorSeed CG®, utilizado como padrão interno, determina a porcentagem de recuperação para cada amostra e, desta forma, permitiu a correção dos números detectados de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.
- O uso de tubos de 50mL para a separação imunomagnética permitiu o processamento de amostras com partículas em suspensão, pois auxiliou na captura das pérolas magnéticas pelo imã, que ficaram melhor dispersas na amostra, aumentando a recuperação dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.
- Para redução das partículas interferentes no processo de separação imunomagnética foi necessária a inclusão da pré-limpeza da amostra com solução aquosa de Tween 20® a 0,01%.
- O tempo de análise, preconizado no protocolo 2 (1amostra/dia) foi inferior ao do protocolo 1 (1amostra/3dias), sendo esta característica importante para a utilização da técnica na rotina de monitoramento da água.
- A combinação das técnicas de concentração através da precipitação com carbonato de cálcio e centrifugação; de purificação através da separação

imunomagnética e de detecção e quantificação através da imunofluorescência direta, mostrou ser uma ferramenta eficaz para a detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água de piscina.

- No período de realização das análises, duas amostras foram positivas para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., indicando a necessidade de um maior controle sanitário dos usuários da piscina.
- Não foi detectada a presença de coliformes fecais e totais, indicando que é necessário avaliar a presença de outros microrganismos como forma de contribuir para o monitoramento da qualidade da água.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASZADEGAN, M.; GERBA, C. P.; ROSE, J. B. – Detection of *Giardia* cysts with a cDNA probe and applications to water samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57(4)**:927-931, 1991.
- APHA – **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Am. Public. Health. Assoc., Washington, 1992.
- ALDEEN, W. E.; CARROL, K.; ROBINSON, A.; MORRISON, M.; HALE, D. – Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. **J. Clin. Microbiol.**, **36(5)**:1338-1340, 1998.
- ALLEN, M. J. & RICE, E. W.- **Pathogen monitoring – Is this the road to travel?** Proc. Am. Water Works Assoc. WQTC, San Francisco, 1994.
- ANDREOLI, C. V.; LARA, A. I.; FERNADES, F. - **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em solução**. Curitiba: Sanepar, 1999.
- BARD, D. G.; WARD, B. B. - Species-specific bacterial productivity method using immunomagnetic separation and radiotracer experiments. **J. Microbiol. Methods.**, **28**:207-219, 1997.
- BELL, A.; GUASPARINI, R.; MEEDS, D.; MATHIAS, R. G.; FARLEY, J. D. - A swimming pool-associated outbreak of cryptosporidiosis in British Columbia. **Can. Public Health. J.**, **84**:334-337, 1993.
- BENNETT, J. W.; GAUCI, M.R., LE MOENIC, S. SCHAEETER F. W.; LINDQUIST, H. D. A. - A comparison of enumeration techniques for *Cryptosporidium parvum* oocysts. **J. Parasitology**, **85(6)**:1165-1168, 1999.
- BERKELMAN, R. L. – Emerging infectious diseases in the United States. **J. Infect. Dis.**, **170**:272-277, 1994.
- BERN, C.; MARTINEZ, J.; DE ZOYSA, I.- The magnitude of the global problem of diarrhea disease: a term years update. **Bull WHO**, **70**:705-714, 1992.

- BIFULCO, J. M.; SCHAEFFER, F. W. - Antibody-magnetic method for selective concentration of *Giardia lamblia* cysts from water samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**:772-776, 1993.
- BITTON, G. - **Wastewater microbiology**. New York, John Wiley & Sons, 1994. p.478.
- BOHNE, W., GROSS, U.; FERGUSON, D.J.P.; HEESEMANN, J. - Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (HSP30/BAG1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. **Mol. Microbiol.**, **16(6)**:1221-1230, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n 1469, de 29 de dezembro de 2000**. - Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília, 2000.
- BUKHARI, Z.; SMITH, H. V.; SYKES, N.; HUMPHREYS, S. W., PATON, C. A.; GIRDWOOD, R. W. A.; FRICKER, C. R. - Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. **Water Sci. & Technol.**, **35(11-12)**:385-390, 1997.
- BUKHARI, Z.; McCUIN, R. M.; FRICKER, C. R.; CLANCY, J. L. - Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64(11)**: 4495-4499, 1998.
- BUKHARI, Z.; HARGY, T. M.; BOLTON, J.R.; DUSSERT, B.; CLANCY, J. L. - Medium-pressure UV for oocysts inactivation. **J. Am. Water Works Asso.** **91**:86-94, 1999.
- CALL, J. L.; ARROWOOD, M.; XIE, L.; HANCOCK, K.; TSANG, C. W. - Immunoassay for viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in turbid environmental water samples. **J. Parasitology**, **87(1)**: 203-210, 2001.
- CAMPBELL, A. & SMITH, H. - Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from water samples: round robin comparison of techniques. **Water Sci. & Technol.**, **35**:397-401, 1997.

- CARRENO, R. A.; POKORNY, N. J.; WEIR, S. C.; LEE, H.; TREVORS, J. T. – Decrease in *Cryptosporidium* parvum oocyst infectivity in vitro by using the membrane filter dissolution method for recovering oocysts from water samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **67(7)**:3309-3313, 2001.
- CENTENO, A. J. - **Curso de estatística aplicada à biologia**. 2. ed. Goiânia, Ed. da UFG, 1999. 234 p.
- CHAMPLIAUD, D.; GOBET, P.; NACIRI, M.; VAGNER, O.; LOPEZ, J.; BUISSON, J. C.; VARGA, I.; HARLY, G.; MANCASSOLA, R. BONNIN, A.- Failure to differentiate *Cryptosporidium parvum* from *C. meleagridis* based on PCR amplification of eight DNA sequences. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**:1454-1458, 1998.
- CHAPMAN, P. A.; MALO, A. C. T.; SIDDON, C.A.; HARKIN, M. - Use of commercial enzyme immunoassays and immunomagnetic separation systems for detecting *Escherichia coli* O157 in bovine fecal samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**:2549-2553, 1997.
- CLANCY, J. L.; GOLLNITZ, W. D.; TABIB, Z. - Commercial labs: how accurate are they? **J. Am. Water Works Asso.** **86(5)**:89-97, 1994.
- CLANCY, J. L.; HARGY, T. M.; SCHAUB, S. – **Improved sampling methods for the recovery of *Giardia* and *Cryptosporidium* from source and treated water**. In: FRICKER, C. R.; CLANCY, J. L.; ROCHELLE, P. A. (ed.) International symposium on waterborne *Cryptosporidium*, Am. Water Works Asso., Denver, 1997
- CLANCY, J. L. & HANSEN, J. – Uses of protozoan monitoring data. **J. Am. Water Works Asso.** **91(5)**:51-65, 1999.
- CLANCY, J. L. – Sydney's 1998 water quality crisis. **J. Am. Water Works Asso.** **92(3)**:55-66, 2000.
- CIMERMAN, B. & CIMERMAN, S. *Giardiase*. In: _____ - **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo, Atheneu, 1999. p. 28-33.
- COOK, G.C. – Opportunistic parasitic infection associated with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS): Parasitology, clinical presentation, diagnosis, and management. **Quart. J. Med.**, **65**:967-983, 1987.

- CURRENT, W. L. - *Cryptosporidium parvum*: household transmission. **Ann. Intern. Med.**, **120**:518-519, 1994.
- D'ANTONIO, R. G., WINN, R.E.; TAYLOR, J. P. – A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Ann. Intern. Med.** **103**:886-888
- DE CARLI, G. A. - **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas.** São Paulo, Atheneu, 2001. p. 223 – 261.
- DELAUNAY, A.; GARGALA, G.; LI, X.; FAVENNEC, L.; BALLEET, J. J. – Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model. **Appl. Environ. Microbiol.**, **66**(10):4315-4317, 2000.
- DENG, M. Q.; DAY, S. P.; CLIVER, D.O. - Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**:1927-1933, 1994.
- DENG, M. Q.; CLIVER, D.O.; MARIAM, T. W. - Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**:3134-3138, 1997.
- DENG, M. Q.; LAM, K. M.; CLIVER, D. O. – Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using MACS MicroBeads and high gradient separation columns. **J. Microbiol. Methods**, **40**: 11-17, 2000.
- DENNEHY, P. – Transmission of rotavirus and other pathogens in the home. **Pediatric Infect. Dis. J.**, **19**(10) Supplement October: 103-105, 2000.
- DESSELBERGER, U. – Viral gastroenterites. **Current opinion in infectious diseases**, **11**:565-575, 1998.
- DI GIOVANNI, G. D.; HASHEMI, F. H.; SHAW, N. J.; ABRAMS, F. A.; LeCHEVALLIER, M. W.; ABBASZADEGAN, M. – Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** **65**: 3427-3432, 1999.

- DU PONT, H. L.; CHAPPELL, C. L.; STERLING, C.R.; OKHUYSSEN, P. C.; ROSE, J. B.; JAKUBOWSKI, W. – The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. **New England Medicine**, 332:855-859, 1995.
- EATON, A .D.; CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A . E. - **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19.ed. Washington, APHA, 1995. Sections 9-110 and 9-111.
- ELMUND, G. K.; ALLEN, M. J.; RICE, E. W. – Comparison of *Escherichia coli*, total coliform, and fecal coliform populations as indicators of wastewater treatment efficiency. **Water Environ. Res.**, 71(3):332-339, 1999.
- ENROTH, H. & ENGSTRAND, L. - Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 33:2162-2165, 1995.
- EISENBERG, J.N.S.; SETO, E.Y.W.; COLFORD, Jr., J.M.; OLIVIERI, A .; SPEAR, R.C. - An analysis of the Milwaukee cryptosporidiosis outbreak based on a dynamic model of the infection process. **Epidemiology**, 9(3):255-263, 1998.
- FAYER, R.; NERAD, T.; RALL, W.; LINDSAY, D. S.- Studies on cryopreservation of *Cryptosporidium parvum*. **J. Parasitology**, 77:357-361, 1991.
- FAYER, R.; TROUT, J. M.; JENKINS, M. C. – Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. **J. Parasitology**, 84(6):1165-1169, 1998.
- FERRARI, B. C.; VESEY, G.; DAVIS, K. A.; GAUCI, M.; VEAL, D. – A novel two-color cytometric assay for the detection of *Cryptosporidium* in environmental water samples. **Cytometry**, 41: 216-222, 2000.
- FERREIRA, M. S. & NISSHIOKA, S. A. - *Criptosporidiose* In: - CIMERMAN, B. & CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo, Atheneu, 1999. p. 186-189.
- FISK, R. – Giardiasis in British Columbia. **Can. Dis. Weekly Rep.** 1347: 211-213, 1987.

- FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R., CANTUSIO NETO, R. – Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, 43(2):109-111, 2001.
- GARCIA, L. S. & SHIMIZU, R. Y. Diagnostic parasitology: parasitic infections and the compromised host. **Lab Med**, 24:205-215, 1993.
- GARCIA, L. S. & BRUCKNER, D. A. – **Diagn. Med. Parasitology**. 3.ed. Washington, ASM, 1997.
- GOBET, P.; TOZE, S. – Relevance of *Cryptosporidium* parvum hsp70 mRNA amplification as a tool to discriminate between viable and dead oocysts. **J. Parasitology**, 87(1):226-229, 2001.
- GOSTIN, L.O.; LAZZARINI, Z.; NESLUND, V. S.; OSTERHOLM, M. T. - Water quality laws and waterborne diseases: *Cryptosporidium* and other emerging pathogens. **Am. J. Public Health.**, 90:847-853, 2000.
- GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; FAYER, R. – Recovery of waterborne oocysts of *Cryptosporidium* from water samples by the membrane-filter dissolution method. **Parasit. Res.**, 83:121-125, 1999.
- GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; FAYER, R.; BIXLER, H. - House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. **Parasit. Res.**, 61(3):121-125, 1997.
- GÜINTER, F. - **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. São Paulo, E.P.U – Springer –EDUSP, 1980.
- HACHICH, E. M.; GALVANI, A. T.; PADULA, J. A.; MENEGON, N.; SATO, M. I. Z. – Importância do controle dos parasitas patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas captadas para consumo humano. **XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2000.
- HEHL, A.; PEARSON, T. W.; BARRY, J. D.; BRAUN, R.; RODITI, I. - Expression of GARP, a major surface glycoprotein of *Trypanosoma congolense*, on the surface of

Trypanosoma brucei characterization and use as a selectable marker. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **70(1-2):45-58**, 1995.

HEYWORT, M. F. Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **J. Infect. Dis.**, **166:465-472**, 1992.

HSU, B.; HUANG, C.; LAI, Y. Evaluation of immunomagnetic separation method for detection of *Giardia* for different reaction times and reaction volumes. **Parasit. Res.**, **87:472-474**, 2001a.

HSU, B.; HUANG, C.; HSU, Y.; JIANG, G.; HSU, C. – Evaluation of two concentration methods for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. **Wat. Res.**, **35:419-424**, 2001b.

JOHNSON, D. W.; PIENIAZEZ, N. J.; GRIFFIN, D. W., MISENER, L.; ROSE, J. B. – Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in waters. **Wat. Sci. Tech.**, **61(11):3849-3855**, 1995.

JOHNSON, D. W.; ENRIQUEZ, C. E.; PEPPER, I. L.; DAVIS, T. L.; GERBA, C. P.; ROSE, J. B. – Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, Poliovirus and *Salmonella* in marine waters. **Wat. Sci. Tech.**, **35(11-12):261-268**, 1997.

KARANIS, P.; SCHOENEN, D.; SEITZ, H. M. – *Giardia* and *Cryptosporidium* in backwash water from rapid sand filters used for drinking water production. **Zbl. Bakt.**, **284:107-114**, 1996.

KARANIS, P.; SCHOENEN, D.; SEITZ, H. M. – Distribution and removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies in Germany. **Wat. Sci. Tech.**, **37(2):9-18**, 1998.

KAUCNER, C. & STINEAR, T. – Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cists and *Cryptosporidium* oocysts in large volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** **64: 1743-1749**, 1998.

KONGMUANG, U.; LUK, J.M.C.; LINDBERG, A. A. - Comparison of three stool-processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2, and D by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, **32:3072-3074**, 1994.

- KORICH, D. G. – Effects of ozone dioxide, chlorine and monochloroamine on *Cryptosporidium parvum* oocysts viability. **Appl. Environ. Microbiol.**, **56(5)**:1423-1428, 1990.
- KUCZYNSKA, E.; SHELTON, D. R. – Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures and soils. **Can. J. Microbiol.**, **446(7)**:2820-2826, 1999.
- LE CHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.; LEE, R. G. – *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57**:2617-2621, 1991.
- LE CHEVALLIER, 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**:690-697, 1995.
- LEE, Y.; JOHNSON, P. W.; CALL, J. L.; ARROWOOD, M. J.; FURNESS, B. W.; PICHETTE, S. C.; GRADY, K. K.; REEH, P.; MITCHELL, L.; BERGMIRE-SWEAT, D.; MacKENZIE, W. R.; TSANG, V. C. W. – Development and application of a quantitative specific assay for *Cryptosporidium parvum* oocyst detection in high-turbidity environmental water samples. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **65(1)**:1-9, 2001.
- LIMA, J. D. - *Sarcocystis*, *Isospora* e *Cryptosporidium*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; GINARD, P. M. - **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo, Atheneu, 2000. p. 157-163.
- MACÊDO, J. A. B.; - **Águas & Águas**. Juiz de Fora, Ortofarma, 2000.p. 444 – 470.
- MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. P.; DAVIS, J. P. – A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New Engl. J. Med.**, **331**: 161-167, 1994.
- MACKENZIE, W. R.; KAZMIERCZAK, J. J.; DAVIS, J. P. – An outbreak of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool. **Epidemiol. Infect.**, **115**: 545-553, 1995.
- MARSHAL, M. M.; NAUMOVITZ, D.; ORTEGA, Y.; STERLING, C. R. Waterborne protozoan pathogens. **Clin. Microbiol.**, **10**:67-85, 1997.

- McANULTY, J. M.; FLEMING, D. W.; GONZALEZ, A. H. A community-wide outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming at a wave pool. **J. Am. Med. Assoc.**, **272**:1597-1600, 1994.
- McCUIN, R. M.; BUKHARI, Z.; CLANCY, J. L. – Recovery and viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia intestinalis* cysts using the membrane dissolution procedure. **Can. J. Microbiol.**, **46**:700-707, 2000.
- McCUIN, R. M.; BUKHARI, Z.; SOBRINHO, J.; CLANCY, J. L. – Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water concentrates using immunomagnetic separation. **J. Microbiol. Meth.**, **45**: 69-76, 2001.
- MONIS, P. T. & SAINT, C. P. – Development of a nested-PCR assay for the detection of *Cryptosporidium parvum* in finished water. **Water Res.**, **35**(7):1641-1648, 2001.
- MORGAN, U. M.; MONIS, P.T.; FAYER, R.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R. C. A. - Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. **J. Parasitology**, **85**(6):1126-1133, 1999.
- MORRIS, R. D.; NAUMOVA, E. N.; GRIFFITHS, J. K. - Did Milwaukee experience waterborne Cryptosporidiosis before the large documented outbreak in 1993? **Epidemiology**, **9**(3):264-270, 1998.
- MOTA, S. – **Preservação e conservação de recursos hídricos**. 2. ed. Rio de Janeiro, ABES, 1995.
- MURRAY, C. J.& LOPEZ, A. D.; - Global mortality disability and the contribution of risk factors: global burden of disease study. **Lancet**, **349**:1436-1442, 1997.
- O'DONOGHUE, P.J. - *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **Int. J. Parasitol.**, **25**(2):139-195, 1995.
- ONGERTH, J. E. & STIBBS, H. H.- Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **53**:672-676, 1987.
- ONO, K.; TSUJI, H.; RAI, S. K.; YAMAMOTO, A.; MASUDA, K.; ENDO, T.; HOTTA, H.; KAWAMURA, T.; UGA, S. – Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in western Japan. **Appl. Environ. Microbiol.**, **67**(9):3832-3836, 2001.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Las condiciones de la salud en las américas**. Washigton, 1994.

PEETERS, J. E.; MAZAS, E. A.; MASSCHELEIN, W. J.; deMATURANA, I.V.M.; DEBACKER, E. - Efect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.**, **55**:1519-1522, 1989.

PEREIRA, M. G. C.; ATWILL, E. R.; JONES, T. – Comparison of sensitivity of immunofluorescent microscopy to that of a combination of immunofluorescent microscopy and immunomagnetic separation for detection of *Cryptosporidium parvum* in adult bovine feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65**(7): 3236-3239, 1999.

PETERSEN, C. Cryptosporidiosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. **Clinical Infections Diseases**, **15**:903-909, 1992.

PIENIAZEK, N. J.; BORNAY-LLINARES, F. J., SLEMENDA, S. B., DA SILVA, A. J.; MOURA, I. N.; ARROWOOD, M. J.; DITRICH, O.; ADDISS, D. G. – New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. **Emerg. Infect. Dis.**, **5**(3):444-449, 1999.

POULTON, M.; COLBOURNE, J.; DENNIS, P.J. - Thames (England, UK) water's experiences with *Cryptosporidium*. **Water Sci. & Technol.**, **24**(2):21-26, 1991.

QUINTERO-BETANCOURT, W. & LEDESMA, L. Descriptive study on the presence of protozoan cysts and bacterial indicators in a drinking water treatment plant in Macaibo, Venezuela. **Intern. J. of Environ. Health Res.** **10**:51-61, 2000.

RAINHO, J. M.- Planeta água, **Revista Educação**, **26**(221):48-64, set/1999.

REY, L. - **Bases da parasitologia médica**. 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001. p. 268-319.

REYNOLDS, D.T.; SLADE, R. B.; SYKES, N. J.; JONAS, A.; FRICKER, C. R. – Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: techniques for generating precise recovery data. **J. Appl. Microbiol.**, **87**(6): 804-813, 1999

- RICHARDSON, A.J.; FRANKENBERG, R.A. ; BUCK, A .C.; SELKON, J.B.; COLBOURNE, J.S.; PARSOS, J.W.; MAYON-WHITE, R.T. - An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. **Epidemiol. Infect.**, **107**:485-495, 1991.
- ROCHELLE, P. A.; LEON, R.; STEWART, M. H.; WOLFE, R. L. – Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63(1)**:106-114, 1997.
- ROCHELLE, P.A.; LEON, R.; JOHNSON, A.; STEWART, M. H.; WOLFE, R.L. - Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. **Appl. Environ Microbiol.**, **65(2)**:841-845, 1999.
- ROSE, J. B.; CIFRINO, A.; MADORE, M. S.; GERBA, C. P.; STERLING, C. R.; ARROWOOD, M. J. - Detection of *Cryptosporidium* from wastewater and freshwater environments. **Water Science Technology**, **18**:233-239, 1986.
- ROSE, J. B.; LANDEEN, L. K.; RILEY, K. R.; GERBA, C. P. - Evaluation of immunofluorescence techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.** **55(12)**:3189-3196, 1989.
- ROSE, J. B. & SLIKFO, T. R. – *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Cyclospora* and their impact on foods: a review. **J. Food Protect**, **62(9)**:1059-1070, 1999.
- ROSSI, P.; RIVASI, F.; CODELUPPI, M.; CATANIA, A.; TAMBURRINI, A.; RIGHI, E.; POZIO, E. – Gastric involvement in AIDS associated cryptosporidiosis. **Gut**, **43(4)**:476-477, 1998.
- RUFFEL, K. M.; RENNECKER, J. L.; MARIÑAS, B. J. – Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide. **Water Res.**, **34(3)**:868-876, 2000.
- SAFARÍK, I. & SAFARIKOVÁ, M. – Use of magnetic techniques for the isolation of cells. **J. Chromatogr.**, **722**: 33-53, 1999.
- SANTA CATARINA, Secretaria da Saúde, Departamento Autônomo de Saúde Pública. - **Decreto nº 24.981, de 14 de março de 1985.** Regulamenta os artigos 32, 33, 34 e § 1º do artigo 40, da lei nº 6320, de 20 de dezembro de 1983, que dispõe sobre o abastecimento de água. Florianópolis, 1985.

- SCHIMIDT, G. D.; ROBERTS' L. S.; JANOVY, J. JR. - **Foundations of Parasitology**. 5. ed. Chicago, WCB, 1996.
- SCHWAB, K. J.; DE LEON, R.; SOBSEY, M.D. - Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62:2086-2094, 1996.
- SEESOD, N.; NOPPARAT, P.; HEDRUM, A.; THAITHONG, S.; UHLEN, M.; LUNDEBERG, J. - Na integrated system using immunomagnetic separation, polymerase chain reaction, and colorimetric detection for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. **Amer. Soc. Trop. Med. & Hygiene**, 56(3):322-328, 1997.
- SHEPHERD, K. M. & WYN-JONES, A. P. - An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62(4):1317-1322, 1996.
- SLIFKO, T. R.; SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Emergent parasite zoonoses associated with water and food. **Internat. J. for Parasitol.**, 30(12-13): 1379-1393, 2000.
- SIMMONS, O. D.; SOBSEY, M. D.; HEANEY, C. D.; SCHAEFER, F. W., FRANCY, D. S. - Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67(3): 1123-1127, 2001.
- SMITH, H. V. - Detection of parasites in the environment. **Parasitology**, 117:113-141, 1998.
- SOGAYAR, M. I. T. L.; GUIMARÃES, S. - *Giardia lamblia*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; GINARD, P. M. (eds). - **Parasitologia humana**. 10^o ed. São Paulo, Atheneu, 2000. p. 107-113.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. - **Biometry**. 3. ed. New York, W. H. Freeman, 1995. 850p.
- STEIN, P.L. - The great sydney water crisis of 1998. **Water, Air, and Soil Pollut.** 123:419-436, 2001.

- SULAIMAN, I. M.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R. C. A.; LAL, A. A.; XIAO, L. H. – Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Appl. Environ. Microbiol.** **66(6)**:2385-2391, 2000.
- THURMAN, R.; FAULKNER, B.; VEAL, D.; CRAMER, G.; MEIKLEJOHN, M. - Water quality in rural Australia. **J. Appl. Microbiol.**, **84**:627-632, 1998.
- THOMPSON, R. C. A.; MORGAN, U. M.; MELLOR, K. J.; HOPKINS, R. M. – Genotyping *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Today's Life Science**, **111(3)**:80-86, 1999.
- THOMPSON, R. C. A. – Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol.**, **30**:1259-1267, 2000.
- TZIPORI, S. - Criptosporiosis in perspective. **Adv. Parasitol.**, **27**:63-129, 1988.
- USEPA – **ICR Protozoan Method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by a fluorescent antibody procedure.** EPA/814-B-95/003. US Environ. Prot. Agency Office of Ground Water and Drinking Water, Washington, 1995.
- USEPA –**Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/IFA.** EPA/821-R-99/001. US Environ. Prot. Agency Office of Ground Water and Drinking Water, Washington, 1999a.
- USEPA –**Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/IFA.** EPA/821-R-99/001. US Environ. Prot. Agency Office of Ground Water and Drinking Water, Washington, 1999b.
- USEPA – **Interlaboratory validation study results for *Cryptosporidium* precision and recovery for U.S. EPA Method 1622.** Office of Water, Office of Science and technology, Engineering and Analysis Division. Washington, 1999c.
- VARELA, C. A. S. **Poluição em águas continentais – alternativas de controle de resíduos líquidos industriais.** São Luís, PPG/EDUUFMA, 1987.
- VEAL, D.; ALTAVILLA, N.; GILLINGS, M. R. - Microbia indicators of river health. **Today's Life Science**, **10(6)**:S1-8, 1998.
- VESEY, G. & SLADE, J. S. Isolation and identification of *Cryptosporidium* from water. **Water Sci. & Technol.**, **24**:165-167, 1990.

- VESEY, G.; SLADE, J. S.; BYRBE, M. SHEPHERD, K.; FRICKER, C. R. – A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **J. Appl. Bacteriol.**, 75: 82-86, 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. L.; WARTON, A.; VEAL, D. - Application of flow cytometry methods for the routine detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. **Cytometry**, 16:1-6, 1994a.
- VESEY, G.; NARAI, J.; ASHBOLT, K. W.; VEAL, D. – Detection of specific microorganisms in environmental samples using flow cytometry. In: **Methods in Cell Biology**. San Diego, Academic Press, 1994b. v.42. p. 489-522.
- VESEY, G.; ASHBOLT, N.; WALLNER, G.; ORSH, M.; WILLIAMS, K. L.; VEAL, D. - Assessing *Cryptosporidium parvum* viability with fluorescent *in situ* hybridization using ribosomal RNA probes and flow cytometry. In: BETTS, W. B.; CASEMORE, D.; FRICKER, C.; SMITH, H.; WATKINS, H. - **Protozoan parasites in water**. Cambridge, Royal Society of Chemistry, 1995. p. 133-138.
- VESEY, G. - Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*. In: WATER MICROBIOLOGY FOR THE 21ST CENTURY. Stockolm,1996. **Proccedings**. Swedish Institute for Infections Disease Control, 1996. p. 1-8.
- VESEY, G.; GRIFFITHS, K. R.; GAUCI, M. R.; DEERE, D.; WILLIAMS, K. L.; VEAL, D. - Simple and rapid measurment of *Cryptosporidium* excystation using flow cytometry. **Int. J. Parasitol.**, 27:1353-1359, 1997.
- VIANNA, M. R.- **Hidráulica aplicada às estações de tratamento de água**. 3. Ed. Belo Horizonte, Imprimatur, 1997.
- WALLIS, P. M.; ERLANDSEN, S. L.; ISAAC-RENTON, J. L.; OLSON, M. E.; ROBERTSON, W.J.; KEULEN, H. – Prevalence or *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolated from drinking water in Canada. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62(8):2789-2797, 1996.

-
- WEBSTER, J. P. & MACDONALD, D. W. – Cryptosporidiosis reservoir in wild brown rats (*Rattis norvegicus*) in the UK. **Epidemiol. Infect.**, **115**:207-209, 1996.
- XIAO, L.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; LAL, A. A. Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**(5):687-691,1998.
- YAKUB, G. P.; STADTERMAN-KNAUER, K. L. – Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. **J. Appl. Bacteriol.**, **66**(8): 3628-3631, 2000.
- ZHONGMING, L.; BAI, G.H.; FORDHAM VON REYN, C.; MARINO,P.; BRENNAN, M. J.; GINE, N.; MORRIS, S.L. - Rapid detection of *Mycobacterium avium* in stool samples from AIDS patients by immunomagnetic PCR. **J. Clin. Microbiol.**, **34**:1903-1907, 1996.
- ZUCKERMAN, U.; ARMON, R.; TZIPORI, S.; GOLD, D. – Evaluation of portable differential continuous flow centrifuge for concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. **J. Appl. Microbiol.**, **86**:955-961, 1999

ANEXOS

1. Background

ColorSeed C&G is a revolutionary new patented quality assurance system for testing water for *Cryptosporidium* and *Giardia*. ColorSeed C&G enables accurate water testing and simple interpretation of results.

Substantial variations in the performance of testing have been observed in the detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia*. The accepted detection methods for these organisms, involves a concentration step, a purification step and a final detection step. Losses of oocysts or cysts occur at every step throughout the testing process. The size of the losses vary greatly and can be influenced by small day to day variations in how the sample is manipulated, differences between operators performing the test and sample to sample differences such as turbidity and pH. These variations in losses limit the accuracy of the testing method and contribute to the generation of false-negative results.

ColorSeed C&G enables the losses incurred throughout complex microbiological testing to be accurately measured. ColorSeed C&G is a vial containing exactly 100 *Cryptosporidium* and 100 *Giardia* that have been permanently labelled with a red fluorescent dye. When added to a sample, ColorSeed C&G provides the analyst with an internal quality control parameter against which the performance of every test can be measured.

To use ColorSeed C&G, one simply unscrews the cap of the sealed and sterilised vial, and adds the

contents to the sample to be analysed. With ColorSeed C&G added, the sample is analysed using any of the accepted methodologies (e.g. membrane filtration, flocculation, immuno-magnetic separation, flow cytometry, Chemscan, fluorescence microscopy etc.). During the final microscopic detection stage of the test, the analyst scans the purified sample for FITC-stained (oo)cysts. Upon sighting an (oo)cyst in the sample, the filter block of the microscope is changed, and the organism is viewed under red-fluorescence conditions. If the organism is fluorescent red it is counted as a ColorSeed C&G, if not the organism is counted as intrinsic to the sample. Upon completion of the microscopy the total number of ColorSeed C&G (oo)cyst detected is recorded. This number is the percentage recovery achieved in that test. The number of intrinsic organisms detected is then divided by the recovery and multiplied by 100, to provide an accurate result of how many (oo)cysts were originally in the sample.

2. Product description

ColorSeed C&G is a 5 mL test-tube containing one hundred red fluorescent *Cryptosporidium* oocysts and one hundred red fluorescent *Giardia* cysts in approximately 1mL of saline solution. ColorSeed C&G counts are extremely accurate. A patented automated flow cytometry technology is used to accurately dispense cysts and oocysts. The standard deviation of the number of cysts and oocysts in each tube is less than 2.5.

ColorSeed C&G tubes are sealed and sterilised by exposing each batch to a specified dose of gamma

irradiation. This ensures that ColorSeed C&G is stable for 4 months and that the organisms in the tube are inactivated.

3. Product quality control information

ColorSeed C&G are supplied with a Certificate of Analysis. This document clearly shows the counts of *Cryptosporidium* and *Giardia* made from a number of ColorSeed C&G tubes in the batch. A mean and standard deviation for the batch is displayed for easy reference.

Each batch of ColorSeed C&G is quality controlled by testing 6% of the batch (typical batch size = 500 tubes). Tubes spaced evenly throughout the batch are selected, stained with FITC labelled antibodies and enumerated using flow cytometry as described previously (2). The total number of oocysts and cysts in each tube is recorded as well as the number of full oocysts and cysts, the number of empty oocysts and cysts and the number of partially empty oocysts and cysts.

DAPI staining is performed and the percentage of oocysts and cysts that stain with DAPI is recorded.

Each tube of ColorSeed C&G is individually weighed.

Each batch of ColorSeed C&G must meet the following standards:

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Standard Deviation | < 2.5 |
| % of oocysts/cysts that are full | > 95% |
| Variation in weight | <0.05g |
| % of (oo)cysts that stain with DAPI | > 95% |

4. Microscope requirements

When using ColorSeed C&G it is important that the epifluorescent microscope has the correct optical filters. Otherwise you will not be able to differentiate ColorSeed C&G *Cryptosporidium* and *Giardia* from naturally occurring *Cryptosporidium* and *Giardia*.

Two filter sets are required. One is for examining FITC staining and the other is for examining the red fluorescence of the ColorSeed C&G Red fluorochrome. The FITC filter set will produce a blue light out of the objective. The red filter set will produce a green light out of the objective.

The specifications for the FITC filter set are not critical. The filter set that you routinely use for examining FITC stained samples will work fine.

It is very important that the red filter set does not let through any FITC fluorescence, otherwise naturally occurring (oo)cysts that have been stained with FITC will appear to fluoresce red. A simple check can be performed to ensure that the red filter set does not let through any FITC fluorescence:

Stain a sample of *Cryptosporidium* or *Giardia* (not ColorSeed C&G) with a FITC labelled antibody. Ensure that the (oo)cysts are very brightly stained by using a higher concentration of antibody than routinely

used. A four times more concentrated antibody preparation is ideal. Alternatively, the sample can be stained for a longer incubation period than you would routinely use.

Examine the brightly stained (oo)cysts using the FITC filter set and then switch the filter set to the red filter set. Examine the cysts and oocysts for red fluorescence. If there is no red fluorescence of the (oo)cysts then the filter set is suitable for use with ColorSeed C&G. If red fluorescence is visible then your filter set needs to be changed. Contact your microscope manufacturer or service company for assistance.

The spectral properties of the ColorSeed C&G red fluorochrome are very similar to those of Texas Red. The ideal filter set should provide optimal fluorescence for Texas Red but no fluorescence of FITC.

5. How to perform accurate enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* within ColorSeed C&G

The numbers of *Cryptosporidium* and *Giardia* within a ColorSeed C&G tube can be accurately checked by collecting the cysts and oocysts onto a membrane, staining the membrane and then enumerating the oocysts and cysts using microscopy. A protocol for performing this analysis is available on the Internet at www.biotechfrontiers.com. The protocol must be closely followed to obtain accurate results. Technical assistance is available via e-mail at: contact@biotechfrontiers.com.

6. Assessing *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries using ColorSeed C&G

The recovery of (oo)cysts will vary from sample to sample depending on the type of water sample. For most *Cryptosporidium* and *Giardia* test methods recoveries are lower for more turbid samples. If the laboratory is analysing a range of water types then it is important that recoveries for each water type are assessed.

Seeding the sample

1. Add 2 ml of 0.05% (v/v) Tween 80 to the tube.
2. Replace cap and shake vigorously.
3. Remove cap and pour ColorSeed C&G into sample.
4. Add 3 ml of reagent grade water to the tube.
5. Replace cap and shake vigorously.
6. Remove cap and pour ColorSeed C&G into sample.
7. Repeat steps 4, 5 and 6.

Sample analysis

Analyse the sample as per the laboratory standard operating procedure.

Record the number of red fluorescent *Cryptosporidium* and *Giardia* detected in the sample, and compare to the number of *Cryptosporidium* and *Giardia* contained in the ColorSeed C&G (shown on the accompanying Certificate of Analysis). The recovery achieved by the QC test (expressed as a percentage) is the

number of (oo)cysts detected, divided by the ColorSeed C&G number, multiplied by 100.

In equation form:

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{oocysts/cysts detected} \times 100}{\text{ColorSeed C\&G number for each organism separately}}$$

7. Technical assistance

Technical assistance with the use of ColorSeed C&G or with other *Cryptosporidium* and *Giardia* testing problems is provided by BTF at:

E-mail – contact@biotechfrontiers.com

Fax - (612) 9850 1805

8. References

1. Standard Operating Protocols for the Monitoring of *Cryptosporidium Oocysts* in Treated Water Supplies to Satisfy Water Supply (Water Quality) Amendment Regulations 1999 SI No 1524. UK Drinking Water Inspectorate.
2. Bennett JW, Gauci MR, Le Moenic S, Schaefer FW, Lindquist HDA. A comparison of enumeration techniques for *Cryptosporidium parvum* oocysts. Journal of Parasitology. 85(6):1165-1168, 1999.

3. Reynolds DT, Slade RB, Sykes NJ, Jonas A, Fricker CR. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: techniques for generating precise recovery data. Journal of Applied Microbiology. 87(6):804-813, 1999.

Warranty

The products are warranted to the original purchaser only to conform to the quantity and contents stated on the product labels for the duration of the stated shelf life. BTF's obligation and the purchaser's exclusive remedy under this warranty is limited either to replacement, at BTF's expense, of any products which shall be defective in manufacture, and which shall be returned to BTF, transportation prepaid, or at BTF's option, refund of the purchase price. Claims for merchandise damaged in transit must be submitted to the carrier. This warranty shall not apply to any products which shall have been altered outside BTF, nor shall it apply to any products which have been subjected to misuse or mishandling. ALL OTHER WARRANTIES, EXPRESSED, IMPLIED OR STATUTORY, ARE HEREBY SPECIFICALLY EXCLUDED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. BTF's maximum liability is limited in all events to the price of the products sold by BTF. IN NO EVENT SHALL BTF BE LIABLE FOR ANY SPECIAL, INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES. Some states do not allow limits on warranties, or on remedies for breach in certain transactions. In such states, the limits set forth above may not apply. (c)Copyright 2000 BTF Pty. Limited, Sydney, Australia.



Biotechnolgy Frontiers Pty Ltd
 PO Box 599 North Ryde BC NSW 1670 Australia
 Telephone +61 2 8877 9150 Facsimile +61 2 9889 1805
contact@biotechfrontiers.com <http://www.biotechfrontiers.com>

Anexo 2

9-49

MULTIPLE-TUBE FERMENTATION TECHNIQUE (9221)/Bacterial Density

TABLE 9221.IV. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE RESULTS WHEN FIVE TUBES ARE USED PER DILUTION (10 mL, 1.0 mL, 0.1 mL)

| Combination of Positives | MPN Index/ 100 mL | 95% Confidence Limits | | Combination of Positives | MPN Index/ 100 mL | 95% Confidence Limits | |
|--------------------------|----------------------|-----------------------|-------|--------------------------|----------------------|-----------------------|-------|
| | | Lower | Upper | | | Lower | Upper |
| 0-0-0 | <2 | — | — | 4-2-0 | 22 | 9.0 | 56 |
| 0-0-1 | 2 | 1.0 | 10 | 4-2-1 | 26 | 12 | 65 |
| 0-1-0 | 2 | 1.0 | 10 | 4-3-0 | 27 | 12 | 67 |
| 0-2-0 | 4 | 1.0 | 13 | 4-3-1 | 33 | 15 | 77 |
| | | | | 4-4-0 | 34 | 16 | 80 |
| 1-0-0 | 2 | 1.0 | 11 | 5-0-0 | 23 | 9.0 | 86 |
| 1-0-1 | 4 | 1.0 | 15 | 5-0-1 | 30 | 10 | 110 |
| 1-1-0 | 4 | 1.0 | 15 | 5-0-2 | 40 | 20 | 140 |
| 1-1-1 | 6 | 2.0 | 18 | 5-1-0 | 30 | 10 | 120 |
| 1-2-0 | 6 | 2.0 | 18 | 5-1-1 | 50 | 20 | 150 |
| | | | | 5-1-2 | 60 | 30 | 180 |
| 2-0-0 | 4 | 1.0 | 17 | 5-2-0 | 50 | 20 | 170 |
| 2-0-1 | 7 | 2.0 | 20 | 5-2-1 | 70 | 30 | 210 |
| 2-1-0 | 7 | 2.0 | 21 | 5-2-2 | 90 | 40 | 250 |
| 2-1-1 | 9 | 3.0 | 24 | 5-3-0 | 80 | 30 | 250 |
| 2-2-0 | 9 | 3.0 | 25 | 5-3-1 | 110 | 40 | 300 |
| 2-3-0 | 12 | 5.0 | 29 | 5-3-2 | 140 | 60 | 360 |
| 3-0-0 | 8 | 3.0 | 24 | 5-3-3 | 170 | 80 | 410 |
| 3-0-1 | 11 | 4.0 | 29 | 5-4-0 | 130 | 50 | 390 |
| 3-1-0 | 11 | 4.0 | 29 | 5-4-1 | 170 | 70 | 480 |
| 3-1-1 | 14 | 6.0 | 35 | 5-4-2 | 220 | 100 | 580 |
| 3-2-0 | 14 | 6.0 | 35 | 5-4-3 | 280 | 120 | 690 |
| 3-2-1 | 17 | 7.0 | 40 | 5-4-4 | 350 | 160 | 820 |
| 4-0-0 | 13 | 5.0 | 38 | 5-5-0 | 240 | 100 | 940 |
| 4-0-1 | 17 | 7.0 | 45 | 5-5-1 | 300 | 100 | 1300 |
| 4-1-0 | 17 | 7.0 | 46 | 5-5-2 | 500 | 200 | 2000 |
| 4-1-1 | 21 | 9.0 | 55 | 5-5-3 | 900 | 300 | 2900 |
| 4-1-2 | 26 | 12 | 63 | 5-5-4 | 1600 | 600 | 5300 |
| | | | | 5-5-5 | ≥1600 | — | — |

(Fonte: EATON *et al.*, 1995)

Anexo 3

Ficha para o controle do processamento das amostras de água
Análise de *Cryptosporidium* e *Giardia*

Número da amostra _____ Local da coleta _____

Data da coleta _____ Data da análise _____

Volume (L) de água concentrada _____

Volume (ml) do precipitado inicial _____

Sistema IMS utilizado (Tubo de 50ml ou tubo de 6ml) _____

A amostra foi semeada?.....Sim.....Não Semeado:.....Antes da concentração.....

No precipitado conc.....

Dose semeada: *Giardia* _____ *Cryptosporidium* _____

Tipo de dose semeada (Padrão LVA, ColorSeed CG®) _____

Utilização de Preclear?.....Sim.....Não

Número do lote das pérolas: PC _____ *Giardia* _____ *Crypto* _____Volume da pérolas: PC _____ *Giardia* _____ *Crypto* _____

Tipo de anticorpo para IFA _____ Volume _____

Número de filtros: _____

Resultados

| Cistos/ocistos | Filtro 1 | Filtro 2 | Filtro 3 | Filtro 4 | Total | % CS+ |
|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|
| <i>Giardia</i> FITC | | | | | | ----- |
| <i>Crypto</i> FITC | | | | | | ----- |
| ColorSeed (+) <i>Giardia</i> | | | | | | |
| ColorSeed (+) <i>Crypto</i> | | | | | | |

Padrão interno de correção:

Exemplo: 50CS (+) *Crypto*, Dose semeada 100 oocistos, Detectado -27 CS (-)Cálculos: $27/(50/100) = 54$ oocistos presentes na amostra / volume analisadoResultado final corrigido *Giardia* _____Resultado final corrigido *Cryptosporidium* _____

Analista:

OBS: