



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Padronização e avaliação de técnicas para detecção e
quantificação de *Cryptosporidium* spp. em amostras de
lodo da Estação de Tratamento de Esgoto – Sistema
Insular, de Florianópolis, SC.**

Roniele Balvedi Iacovski

Florianópolis, 2003.

Roniele Balvedi Iacovski

**Padronização e avaliação de técnicas para detecção e
quantificação de *Cryptosporidium* spp. em amostras de
lodo da Estação de Tratamento de Esgoto – Sistema
Insular, de Florianópolis, SC.**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

Prof^a. Dra. Célia Regina Monte Barardi

Florianópolis

2003.

IACOVSKI, Roniele

Padronização e avaliação de técnicas para detecção e quantificação de *Cryptosporidium* spp. em amostras de lodo da Estação de Tratamento de Esgoto – Sistema Insular, de Florianópolis, SC.

Roniele Balvedi Iacovski. Florianópolis, 2003, ____p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1. Parasitas – 2. *Cryptosporidium* spp. – 3. Lodo de esgoto.
– 4. Separação imunomagnética – 5. Imunofluorescência

TERMO DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Cláudia Maria Oliveira Simões, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação e pela grande confiança nestes dois anos de trabalho.

À Prof^a. Célia Regina Monte Barardi, pelas sugestões e apoio.

Ao Prof. Mário Steindel, pela amizade, pelo exemplo de profissionalismo e pelas dicas valiosas no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Maurício Sedrez dos Reis, Depto. de Fitotecnia, CCA, pela disposição em atender-me, ensinar-me e orientar-me pelos caminhos da estatística.

À Doris, companheira de trabalho pelo grande apoio, sugestões e contribuições científicas a este trabalho.

Às grandes amigas que fiz durante a realização deste trabalho, Caroline, Carla, Thaís, Luciane, Aline, Ingrid e Cristiane.

Ao meu irmão, Vinicius, por existir.

Ao meu eterno namorado e marido Ângelo, pelo companheirismo, amor, e, principalmente, paciência nesses dois últimos anos de nossa história.

Agradeço com muito amor aos meus pais, Elias e Nilza, pelas oportunidades, apoio, incentivo e ajuda em todos os momentos de minha vida e de minha carreira profissional.

À todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

Roniele

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 (USFC), Florianópolis, SC.

Este trabalho recebeu o apoio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e, também, da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), através da concessão de uma bolsa de Mestrado.

Sumário

Lista de Abreviaturas	iv
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	ix
Resumo	xi
Abstract	xii
I. Introdução	1
I.1. Estações de tratamento de esgoto	5
I.2. Processos de tratamento de esgoto	5
I.3. Considerações gerais sobre lodo	10
I.3.1. Definição	10
I.3.2. Tipos de lodo	10
I.3.3. Produção do lodo	11
I.3.4. Composição do lodo	12
I.3.5. Higienização do lodo	13
I.4. Lodo de esgoto: disposição final e utilidades	16
I.5. Considerações sobre o lodo como disseminador de parasitoses ...	20
I.6. Considerações sobre o gênero <i>Cryptosporidium</i>	27
I.6.1. Histórico	27
I.6.2. Habitat	28
I.6.3. Morfologia	28
I.6.4. Reprodução	29
I.6.5. Transmissão	29
I.6.6. Ciclo biológico	30
I.6.7. Patogenia	32
I.6.8. Sintomatologia	33
I.6.9. Epidemiologia	34
I.6.10. Diagnóstico laboratorial	35
I.6.11. Profilaxia e tratamento	38
I.7. Técnicas empregadas para detecção e quantificação de Cryptosporidium spp. em amostras ambientais	39
II. Objetivos	47
II.1. Objetivo geral	48
II.2. Objetivos específicos	48
III. Materiais e métodos	49
III.1. Materias	50
III.1.1. Material de estudo	50
III. 1.1.1. Amostra inicial para a padronização das metodologias	50

III.1.1.2. Amostra de campo	50
III.1.2. Controles positivos internos	50
III.1.2.1. Padrão LVA	50
III.1.2.2. Padrão ColorSeed®	51
III.1.3. Reagentes, materiais de consumo e equipamentos	51
III.1.3.1. Reagentes	51
III.1.3.2. Materiais de consumo	52
III.1.3.3. Equipamentos	52
III.2. Métodos	53
III.2.1. Detecção de coccídios na amostra inicial	53
III.2.2. Sensibilização das Pérolas Magnéticas Biomag® com anticorpos monoclonais CRY 104	53
III.2.3. Marcação dos oocistos por imunofluorescência indireta	54
III.2.4. Padronização das metodologias de quantificação e detecção de oocistos de lodo	55
III.2.4.1. Seleção do volume adequado a ser usado no processo inicial de sedimentação do lodo no tampão das pérolas magnéticas	56
III.2.4.2. Determinação da quantidade de lodo a ser processada	57
III.2.4.3. Inclusão da pré-lavagem do sobrenadante	58
III.2.4.4. Adequação de parâmetros relativos à amostra	58
III.2.4.5. Seleção do processo para quebra do floco de lodo	58
III.2.4.6. Escolha do processo de semeadura do Padrão LVA	59
III.2.4.7. Determinação do volume de sobrenadante	60
III.2.4.8. Definição do tempo de sedimentação do lodo	62
III.2.4.9. Inclusão da etapa de centrifugação do sobrenadante	62
III.2.4.10. Ressuspensão do sedimento formado no processo inicial de sedimentação	64
III.2.4.11. Redução do volume de sobrenadante a ser processado	65
III.2.4.12. Protocolo Final – Lodo	65
III.2.5. Análise estatística	69
III.2.6. Processamento e análise das amostras de campo de lodo	70
III.2.6.1. Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	70
III.2.6.2. Pesquisa de cistos de <i>Giardia</i> spp.	70
III.2.6.3. Pesquisa de helmintos	71
IV. Resultados e discussão	72
IV.1. Padronização das metodologias de detecção e quantificação de oocistos em lodo	73
IV.1.1 Seleção do volume adequado a ser usado no processo inicial de sedimentação do lodo no tampão das pérolas magnéticas	73
IV.1.2. Determinação da quantidade de lodo a ser processada	76
IV.1.3. Inclusão da pré-lavagem do sobrenadante	80
IV.1.4. Adequação de parâmetros relativos à amostra	81
IV.1.5. Seleção do processo de quebra do floco de lodo	81
IV.1.6. Escolha do processo de semeadura do padrão LVA e determinação do volume de sobrenadante	83
IV.1.7. Definição do tempo de sedimentação do lodo	84
IV.1.8. Inclusão da etapa de centrifugação do sobrenadante	86

IV.1.9. Ressuspensão do sedimento formado no processo de sedimentação	87
IV.1.10. Redução da quantidade de sobrenadante a ser processado e validação do Protocolo Final – Lodo	88
IV.2. Aplicação da metodologia padronizada para a detecção e quantificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de campo de lodo da ETE – Sistema Insular da CASAN, Florianópolis, SC	90
IV.2.1. Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	91
IV.2.2. Pesquisa de cistos de <i>Giardia</i> spp.	96
IV.2.3. Pesquisa de helmintos	98
V. Conclusões	105
VI. Referências Bibliográficas	108

Lista de Abreviaturas

mL : mililitros

μL: microlitros

g: grama

mg: miligrama

min: minutos

seg: segundos

LVA: Laboratório de Virologia Aplicada

°C: graus Celsius

FITC: isotiocianato de fluoresceína

SAF: fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído

IgG: Imunoglobulina G

IgA: Imunoglobulina A

Mab: anticorpo monoclonal

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

n: número de amostras

PBS: tampão salino fosfato

BSA: “Bovine Albumin Fraction”

SDS: Duodecil Sulfato de Sódio

DABCO: “1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane”

TA: Temperatura Ambiente

ETE: Estação de Tratamento de Esgoto

ETE's: Estações de Tratamento de Esgotos

CASAN: Companhia Catarinense de Águas e Saneamento

ETA's: Estações de Tratamento de Águas

ANOVA: Análise Variância

m³: metros cúbicos

Kg: quilo grama

L: litro

μm: micrômetros ou micras

DI₅₀: Dose Infectante média

DAPI: “4,6-diamidino-2-feilindol”

IP: Iodeto de Propídio

SIM: Separação Imunomagnética

IMF: Imunofluorescência Indireta

S: Desvio Padrão

GL: Graus de Liberdade

QM: Quadrado Médio

CV_e: Coeficiente de Variação do erro ou do resíduo

Mab CRY104: anticorpo monoclonal direcionado contra *Cryptosporidium* spp.

Mab CRY104-FTIC: anticorpo monoclonal direcionado contra *Cryptosporidium* spp. acoplado isotiocianato de fluoresceína

SC: Santa Catarina

SIM-IMF: Separação Imunomagnética acoplada a Imunofluorescência Indireta

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

TPM: Tampão das Pérolas Magnéticas

mm: milímetros

M: Molar/Molaridade

nm: nanômetros

LMSL: Laboratório Médico Santa Luzia

PMS: Pérolas Magnéticas Sensibilizadas

Padrão LVA: Controle interno positivo desenvolvido no Laboratório de Virologia Aplicada

Xg: força gravitacional

m: metros

Lista de Figuras

- Figura 1:** Estação de Tratamento de Lodo Ativado – Sistema Insular, Município de Florianópolis. Pré-tratamento: A - Gradeamento; B - Desarenação. Fonte: Autora8
- Figura 2:** Estação de Tratamento de Lodo Ativado - Sistema Insular, município de Florianópolis. Tratamento secundário: A - Tanque de aeração; B - Decantador secundário; C - Adensamento; D - Prensa desaguadora. Fonte: Autora9
- Figura 3:** Lodo coletado diretamente da prensa desaguadora, na Estação de Tratamento de Esgoto – Sistema Insular, do Município de Florianópolis. Fonte: Autora11
- Figura 4:** Riscos de exposição a patógenos presentes no lodo: Exposição direta. Fonte: adaptado de SOCCOL et al. (1998) e MEDEIROS et al. (1999)21
- Figura 5:** Riscos de exposição a patógenos presentes no lodo: Exposição indireta. Fonte: adaptado de SOCCOL et al. (1998) e MEDEIROS et al. (1999)21
- Figura 6:** Microscopia eletrônica de *Cryptosporidium* spp. no trato intestinal. Fonte: <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/cryptosporidium.html>28
- Figura 7:** Microscopia eletrônica de um meronte rompido de *Cryptosporidium* spp. mostrando os merozoítos em seu interior. Fonte <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/cryptosporidium.html>29
- Figura 8:** Ciclo biológico do *Cryptosporidium*. Fonte: adaptado de HEYWORT (1992)31
- Figura 9:** A e B: Oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de lodo, método Kinyoun modificado. C – Oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes humanas, método de Kinyoun modificado. Fonte: Autora36
- Figura 10:** Esquema geral de separação imunomagnética. Fonte: Autora44
- Figura 11:** Pérola Magnética sensibilizada. Fonte: Autora45
- Figura 12:** O oocisto de *Cryptosporidium* spp. marcado com isotiocianato de fluoresceína. Fonte: Autora45

- Figura 13:** Esquema da marcação indireta pela imunofluorescência. Fonte: Autora54
- Figura 14:** Fluxograma da origem do protocolo da SIM-IMF para amostras de lodo. Fonte: Autora56
- Figura 15:** Esquema de aproveitamento de todo o volume de sobrenadante formado para a realização da separação imunomagnética acoplada à imunofluorescência indireta. Fonte: Autora61
- Figura 16:** Tratamento inicial da amostra por sedimentação do lodo, seguida de centrifugação do sobrenadante. Fonte: Autora63
- Figura 17:** Estante Magnética com quatro tubos de 6mL contendo, sobrenadantes de amostra de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis, usados para processamento da separação imunomagnética76
- Figura 18:** A - Diferentes volumes de sobrenadantes após a sedimentação espontânea de diferentes quantidades de lodo; B - Comparação entre as quantidades de sedimento e os volumes de sobrenadantes formados, após a sedimentação de amostras de lodo75
- Figura 19:** Sobrenadantes formados após, a sedimentação de amostras de 1,0g, 2,0g e 3,0g de lodo. A - antes da pré-lavagem com pérolas magnéticas; B – depois da pré-lavagem com pérolas magnéticas79
- Figura 20:** Membrana Nucleopore® após filtração do sobrenadante. A – amostra de 1,0g de lodo; B – amostra de 2,0g de lodo; C – amostra de 3,0g de lodo79
- Figura 21:** A – Comparação entre o volume de sobrenadante e a quantidade de sedimento formado após a sedimentação espontânea de amostras com 1,0g, 2,0g e 3,0g de lodo; B – Quantidade de sedimento formado após a sedimentação espontânea de amostras com 1,0g, 2,0g, e 3,0g de lodo80
- Figura 22:** O oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis: A – marcado com FITC visualizado no aumento de 40x; B – marcado com Texas Red®, visualizado no aumento de 40x; C – marcados com FITC, visualizados no aumento de 10x93
- Figura 23:** Cistos de *Giardia* spp. em amostra de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis, SC: A – marcados com FITC, visualizados no aumento de 40x; B – marcado com Texas Red®, visualizado no aumento de 40x97

Figura 24: Cistos de protozoários detectados nas amostras de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis, pelo método Ritchie: A – cisto de *Entamoeba coli*; B – cisto com característica de ameba ..99

Figura 25: Ovos de helmintos detectados nas amostras de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis, pelo método Ritchie: A e B – ovos com características de *Ascaris* spp./*Toxocara* sp.; C – ovo de *Meloidogyne*; D – ovo de *Hymenolepis nana*; E e F – ovos com características de ancilostomídeos; G – larva de vida livre101

Figura 26: Freqüência de parasitas amostras de lodo ativado analisadas102

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Dados sobre a coleta e numeração dada às amostras de lodo70
- Tabela 2:** Porcentagem de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., através da combinação das técnicas da SIM-IMF, após sedimentação espontânea do lodo em dois tubos de volumes diferentes, com diversas quantidades de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis, SC74
- Tabela 3:** Porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., pela combinação das técnicas da SIM-IMF, após a sedimentação espontânea de lodo, usando-se três diferentes quantidades de lodo77
- Tabela 4:** Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em lodo, analisando as quantidades de 1,0g, 2,0g e 3,0g na etapa de sedimentação espontânea77
- Tabela 5:** Porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., através da combinação das técnicas da SIM-IMF, após dois diferentes processos de quebra do floco de lodo ...82
- Tabela 6:** Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. após a quebra do floco de lodo por peneiração ou por esmagamento em cadinho de porcelana82
- Tabela 7:** Porcentagens médias de recuperação de oocistos em lodo, pela combinação das técnicas da SIM-IMF, após diferentes processos de semeadura de 10 μ L do Padrão LVA como interno83
- Tabela 8:** Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em todo volume de sobrenadante formado, após sedimentação do lodo, por diferentes processos de semeadura de 10 μ L do Padrão LVA84
- Tabela 9:** Porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., após a sedimentação espontânea de lodo, em quatro diferentes tempos85
- Tabela 10:** Análise de Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., após a sedimentação do lodo, nos tempos de 10, 20, 30 e 40 min85
- Tabela 11:** Porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., através da combinação das técnicas da SIM-IMF, após a centrifugação de todo o volume de sobrenadante formado pela sedimentação espontânea86

- Tabela 12:** Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., após a centrifugação de todo o sobrenadante pela sedimentação do lodo no tempo de 20min86
- Tabela 13:** Porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp, através da combinação das técnicas da SIM-IMF, após a ressuspensão do sedimento formado a partir do processo de sedimentação espontâneo do lodo87
- Tabela 14:** Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. após duas sedimentações do lodo88
- Tabela 15:** Comparação das porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., utilizando quatro diferentes protocolos de processamento de amostras de lodo89
- Tabela 16:** Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., através da utilização dos Protocolos I, II, III e Final – Lodo90
- Tabela 17:** Porcentagens de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, contidos no controle interno comercial ColorSeed[®], e resultados da detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de campo de lodo, coletadas da esteira da prensa desaguadora da ETE – Sistema Insular da CASAN, Florianópolis, utilizando o Protocolo Final – Lodo92
- Tabela 18:** Porcentagens de recuperação de cistos de *Giardia lamblia*, contidos no controle interno comercial ColorSeed[®] e resultados da detecção de cistos de *Giardia* spp., em algumas das amostras de campo de lodo coletadas da esteira da prensa desaguadora da ETE – Sistema Insular da CASAN, Florianópolis, utilizando o Protocolo Final - Lodo98
- Tabela 19:** Detecção de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários pelo Método Ritchie 100

Resumo

O esgoto não tratado e lançado no meio ambiente é um problema que atinge toda a sociedade. O termo esgoto é usado para caracterizar os dejetos provenientes dos diversos usos das águas. As estações de tratamento de esgoto (ETE) têm a finalidade de concentrar as impurezas em um subproduto denominado de lodo de esgoto. No Brasil, a disposição dos lodos gerados pelas ETE's visa, quase que exclusivamente, a sua retirada da ETE sem uma definição para seu destino final. A ETE da CASAN, Sistema Insular, localizada no município de Florianópolis, SC produz, aproximadamente, 30m³ de lodo/dia, que são transportados até um aterro sanitário, sem que tenham sido devidamente higienizados. O *Cryptosporidium* spp. é o agente causador de gastroenterite e de diarreia, após sua ingestão através de água ou de alimentos contaminados. Este trabalho teve como objetivo padronizar e avaliar a metodologia da separação imunomagnética (SIM) acoplada à imunofluorescência indireta (IMF) para a detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em amostras de lodo, provenientes da ETE acima citada. Para tal, foram testados, pela combinação das técnicas de SIM-IMF, os sobrenadantes gerados pela sedimentação de 1, 2 e 3g de lodo, resultando nas respectivas porcentagens de recuperação: 48,85±8,06, 10,47±7,79 e 3,04±2,89. As porcentagens de recuperação de oocistos nas amostras de lodo sedimentadas nos tempos de 10, 20, 30 e 40 minutos foram de 38,85±1,71, 43,04±8,28, 38,66±4,21 e 36,18±2,00, respectivamente. As amostras que tiveram seu sobrenadante centrifugado apresentaram um percentual de recuperação de 47,61±8,74. Incluindo-se um segundo processo de sedimentação espontânea, o percentual de recuperação aumentou para 52,18±8,08. Após a padronização das técnicas de detecção e quantificação de oocistos, o percentual de recuperação foi de 54,46±4,30. A metodologia padronizada foi aplicada para analisar 27 amostras de lodo, coletadas de 11 a 31 de julho de 2002, quando observou-se um percentual de recuperação de oocistos de 39,96±11,2 de *Cryptosporidium parvum* do controle interno positivo ColorSeed[®], havendo recuperação em 100% dos casos. Das amostras processadas 20 (74%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp., e o número de oocistos, por amostra, variou de 1 a 4. Das oito amostras processadas com o intuito adicional de detectar a presença de cistos de *Giardia* spp., sete (87,5%) foram positivas, e o número de cistos, por amostra, variou de 4 a 20. A porcentagem média de recuperação de cistos do controle comercial ColorSeed[®] foi de apenas 0,87%, havendo recuperação em cinco (62,5%) das amostras analisadas. As análises das 27 amostras de lodo, pela técnica de Ritchie, para pesquisa de ovos e larvas de helmintos, 23 (85,18%) foram positivas. As metodologias padronizadas mostraram-se eficientes para detectar a presença de *Cryptosporidium* spp. no lodo analisado, e a presença de microorganismos patogênicos (protozoários e helmintos) nas amostras, inviabiliza a sua reciclagem agrícola, sem prévia higienização.

Palavras-chave: Parasitas; *Cryptosporidium* spp.; Lodo de esgoto; Separação imunomagnética; Imunofluorescência

Abstract

The Sewage, when is not treated and is directly released in the environment becomes a problem which affects society as a whole. The term sewage is used to characterize the waste resulted from a varied use of water. Sewage Treatment Stations (STS) has the aim of concentrating all the waste into a byproduct named Sewage Sludge. In Brazil, disposal of sludge generated by STS's is based on removal from the treatment station, with no definition for its final destination. The STS, located in the city of Florianópolis, Brazil, produces approximately 30m³ of sludge per day, which is carried to a landfill site with no proper hygienic processing. *Cryptosporidium* spp. is the causing agent of diarrhea and gastroenteritis, after its ingestion through contaminated water or food. This work had the aims to standarde immuno magnetic separation technique (IMS), coupled to indirect immunofluorescence (IFA), for detection and quantification of *Cryptosporidium* spp. oocysts, in samples of active sludge present in the station mentioned above. To do so, IMS and IFA tests were conducted on 1, 2 and 3g sludge samples resulting from the sedimentation of sludge, resulting, respectively, in the following rates of recovery: 48.85±8.06, 10.47±7.79, and 3.04±2.89. The percentage of oocysts recoveries of in the sludge samples after 10, 20, 30 and 40 minutes of sedimentation were 38.85±1.71, 43.04±8.28, 38.66±4.21 and 36.18±2.00, respectively. The samples which underwent centrifugation presented a percentage of recovery of 47.61±8.74. After a second process of spontaneous sedimentation, the percentage of recovery rose to 52.18±4.30. The standardized methodology was applied to analyze 27 samples of active sludge, collected between July 11 and 31, 2002, when a *Cryptosporidium parvum* oocyst percentage of recovery of 39.96±11.2 was observed, in the internal positive ColorSeed[®] control, with recovery in 100% of the cases. Of all processed samples, 20 (74%) were positive for *Cryptosporidium* spp., and the number of oocysts per sample varied from 1 to 4. Of all 8 samples processed to detect *Giardia* spp., seven (87.5%) were positive, and the number of cysts varied from 4 to 20. The average percentage of cyst recovery in the ColorSeed[®] commercial control was only 0.87%, with recovery in five (62.5%) samples. In the analysis of 27 samples of active sludge, by means of the Ritchie Technique, for searching eggs and larvae of helminthes, 23 (85.18%) were positive. The standardized methodology proved to be efficient in detecting the presence of *Cryptosporidium* spp. in active sludge, and the presence of pathogenic microorganisms (protozoa and helminthes) in the samples makes the agricultural recycling of this sludge unfeasible without previous hygienic processing.

I. INTRODUÇÃO

A situação brasileira com relação à cobertura dos serviços de saneamento básico ainda é bastante deficiente, e está distante de atingir um índice satisfatório. Dados disponíveis, no censo de 2000, realizado no Brasil, revelam que ocorreu o crescimento do serviço de abastecimento de água em todas as regiões do país, porém de forma desigual. Em 1991, apenas 70,7% dos domicílios estavam ligados à rede geral de água, sendo que esse número aumentou para 77,8% em 2000. Nas regiões Sul e Sudeste, 90% das áreas urbanas têm acesso à água potável. Na região Sul, o percentual de domicílios rurais com rede de água cresceu de 7,5% em 1991 para 18,2% em 2000. O esgotamento sanitário ainda é o serviço que apresenta menor taxa de crescimento, passando de 47% de municípios brasileiros atendidos por rede, de esgoto em 1991 para 52,2% em 2000 (IBGE, 2000). Desse percentual de municípios brasileiros, atendidos por rede de esgoto, 32% têm somente serviço de coleta e os restantes 20,2% coletam e tratam seus esgotos. No país são produzidos e coletados diariamente 14,5 milhões m³ de esgoto, sendo que apenas 5,1 milhões m³ são tratados, os restantes 9,4 milhões m³ são lançados diariamente no meio ambiente. Assim, apenas 35,5% do esgoto gerado pelo país é tratado por estações de tratamento (ANDREOLI, 1998; LARA, 1999; ANDREOLI & FERNANDES, 1999; IBGE, 2000). A maior parte é despejada sem nenhum tratamento nos solos e rios, o que provoca a contaminação dos rios, lagos e lençóis freáticos, acarretando a proliferação de várias doenças (SANTOS & KRESPKY, 1998).

Este panorama insere o Brasil no grupo de países pouco desenvolvidos, nos quais quatro entre cinco casos de doenças têm como causa a contaminação da água e a falta de tratamento adequado dos esgotos. É sabido que a oferta de água potável seria o serviço de saneamento de maior impacto na queda da morbidade infantil, podendo reduzir os casos em até 2,5%, sendo que o declínio esperado de óbitos infantis associados ao tratamento de esgoto seria de até 2,1% (LARA, 1999). Esses índices isolados e/ou associados poderiam em muito contribuir para a resolução deste problema, ainda tão dramático no cenário nacional.

As doenças decorrentes da falta de saneamento são responsáveis por cerca de 65% do total de internações nos hospitais públicos e conveniados do país. Estima-se que cada R\$ 4,00 investidos em saneamento significam uma economia de R\$ 10,00 em internações hospitalares (IBGE, 2000).

A falta de soluções para os problemas de saneamento básico esbarra em cinco dificuldades: a falta de uma política adequada para o setor; a limitação de recursos financeiros; os arranjos institucionais inadequados; a ausência de um sistema adequado de recuperação de custos e a obsoleta legislação vigente (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2000).

Estima-se que para atender a população excluída dos sistemas públicos de coleta e tratamento de esgoto seriam necessários investimentos na ordem de US\$ 15,3 bilhões (ANDREOLI & FERNANDES, 1999).

Em resposta a esta triste realidade, na Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento (UNCED – 92), realizada em junho de 1992 no Rio de Janeiro, conservar e proteger a saúde ambiental tornaram-se o centro das preocupações de um novo modelo de desenvolvimento planejado (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1994).

Em paralelo, na Agenda 21 – principal instrumento aprovado pela Conferência Mundial do Meio Ambiente/Rio 92 – ficou reconhecida a importância de promover o “manejo ambiental saudável dos resíduos sólidos e questões relacionadas com o esgoto”. Os programas estabelecidos incluem a minimização de resíduos, a maximização do reuso e da reciclagem, a disposição e o tratamento ambiental adequados para resíduos e a ampliação da cobertura dos serviços que se ocupam do tratamento adequado dos resíduos (LARA, 1999).

Para alcançar estes objetivos, conta-se com o contínuo avanço da biotecnologia, que vem contribuindo para a melhoria da qualidade de vida de várias formas e, dentre elas, pode-se destacar o aumento da produção e da segurança do consumo de alimentos; o uso de práticas de agricultura biológica e de maiores conhecimentos ecogenéticos; a obtenção de novas matérias-primas; o uso de métodos sustentáveis de manejo florestal; o aperfeiçoamento de técnicas de tratamento de água para o abastecimento público e,

principalmente, o tratamento adequado dos dejetos perigosos (humanos, industriais ou agropecuários) (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1994).

Esgoto é o termo usado para caracterizar os dejetos provenientes dos diversos usos das águas, como por exemplo, usos doméstico (efluentes de vasos sanitários, cozinhas, chuveiros, etc.), industrial (oriundos dos processos específicos de cada segmento da produção industrial), comercial (restaurantes, hotéis, aeroportos, etc.), agrícola, de estabelecimentos públicos (serviços de saúde, escolas, e repartições públicas), infiltração de água na rede de esgotos, etc. (UEHARA & VIDAL, 1989; SANTOS & KRESPKY, 1998).

De maneira geral, a produção de esgotos está intimamente ligada ao consumo de água, e aproximadamente 60% a 80% do consumo de água é convertido em esgoto (SANTOS & KRESPKY, 1998).

Como resultado do uso da água pelo homem, em função de seus hábitos de higiene e de suas necessidades fisiológicas, é formado o esgoto doméstico que, por sua vez, é composto pelas águas de banho, urina, fezes, restos de comida, detergentes e águas de lavagens. De modo geral, pode-se dizer que, sem contar com a significativa contribuição de despejos industriais, os esgotos sanitários são constituídos de aproximadamente 99,9% de água e 0,1% de sólidos (peso seco). Deve-se lembrar que os esgotos sanitários contêm ainda inúmeros organismos vivos, tais como: vírus, bactérias, helmintos e protozoários que, na sua maioria, são liberados com os dejetos humanos (UEHARA & VIDAL, 1989; SANTOS & KRESPKY, 1998). Alguns desses organismos desempenham um papel importante no tratamento das águas residuárias; outros, porém, são denominados de organismos patogênicos, causadores de doenças (UEHARA & VIDAL, 1989).

Há necessidade de se tratar os esgotos sanitários antes que esses sejam lançados em qualquer corpo hídrico. Este tratamento tem por objetivos a prevenção e a redução da disseminação de doenças transmissíveis causadas pelos microrganismos patogênicos; a conservação das fontes de abastecimento de água para usos doméstico, industrial ou agrícola; a manutenção das características da água para piscicultura; a manutenção da

qualidade das águas para banho e para propósitos recreativos; e, obviamente, a preservação da fauna e flora (SILVA & MARA, 1979; UEHARA & VIDAL, 1989).

I.1. Estações de tratamento de esgotos

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE's) são as únicas responsáveis pelo tratamento do esgoto sanitário e podem adotar diversos processos de tratamento das águas residuárias. No Estado de Santa Catarina, as ETEs da CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Saneamento) utilizam, entre outros processos, filtro biológico, lagoas de estabilização e lodos ativados (CASAN, 2001).

I.2. Processos de tratamento de esgoto

Os filtros biológicos, também denominados de leitos percoladores, são unidades de tratamento de esgoto destinadas a oxidar biologicamente a matéria orgânica remanescente dos decantadores, ocorrendo uma predominância, principalmente, de bactérias aeróbias heterotróficas. Este sistema de tratamento de esgoto tem papel ecológico. A CASAN adotou este sistema no município de Catanduvas – SC (CASAN, 2001).

As lagoas de estabilização constituem um processo biológico de tratamento de águas residuárias, em que a estabilização da matéria orgânica é realizada pela oxidação bacteriológica (oxidação aeróbia ou fermentação anaeróbia) e/ou pela redução fotossintética das algas, e se caracterizam pela simplicidade, eficiência e baixo custo (KELLNER & PIRES, 1998; CASAN, 2001). As lagoas de estabilização se caracterizam por ocuparem grandes áreas com grandes tanques de pequena profundidade. Neles, o esgoto sanitário flui, sendo tratado por processos naturais, pois há uma série de seres vivos habitando-os: plantas (algas) e animais microscópicos (bactérias) (SANTOS & KRESPKY, 1998). Esses processos naturais, sob condições parcialmente controladas, são os responsáveis pela transformação de compostos orgânicos putrescíveis em compostos minerais ou orgânicos mais estáveis (UEHARA & VIDAL, 1989). As lagoas de estabilização procuram reproduzir os fenômenos

observados na natureza sem que seja utilizado qualquer tipo de equipamento mecânico com consumo de energia (KELLNER & PIRES, 1998). Este sistema de tratamento é indicado para as condições brasileiras devido ao clima favorável, por possuir espaço físico suficiente e disponível e pela simples operacionalidade (CASAN, 2001). Quanto à atividade biológica predominante, as lagoas de estabilização podem ser classificadas em anaeróbias, facultativas e de maturação (UEHARA & VIDAL, 1989; KELLNER & PIRES, 1998; GONÇALVES, 1999a).

As lagoas anaeróbias são as responsáveis pelo tratamento primário dos esgotos e nelas ocorrem os processos de fermentação ácida e metanogênica, na camada de lodo e no líquido sobrenadante (UEHARA & VIDAL, 1989; KELLNER & PIRES, 1998; CASAN, 2001). O tratamento secundário do esgoto se processa nas lagoas denominadas de facultativas e nelas ocorrem mecanismos de degradação da matéria orgânica, tanto pela via anaeróbia quanto pela via aeróbia. Nessas lagoas há um predomínio das bactérias heterotróficas facultativas (SILVA & MARA, 1979; UEHARA & VIDAL, 1989; KELLNER & PIRES, 1998; GONÇALVES, 1999b). Os compartimentos denominados de lagoas de maturação são responsáveis pelo pós-tratamento dos esgotos e têm como função promover a remoção do nitrogênio e fósforo do afluente. Essas lagoas podem garantir, ainda, taxas significativas de remoção de organismos patogênicos, pois possuem características, tais como altos valores de pH, grande zona fótica (o que permite a penetração dos raios ultravioleta em camadas profundas) e elevada concentração de oxigênio dissolvido (SILVA & MARA, 1979; UEHARA & VIDAL, 1989; KELLNER & PIRES, 1998). No Brasil, a primeira lagoa de estabilização foi construída no município de São José dos Campos, interior de São Paulo (SANTOS & KRESPKY, 1998).

O processo denominado de lodos ativados foi o processo escolhido pela CASAN para o tratamento do esgoto sanitário da Ilha de Santa Catarina, município de Florianópolis. Consiste em um processo biológico onde o efluente, na presença de grande quantidade de oxigênio dissolvido, por agitação mecânica, pelo crescimento e pela atuação de microrganismos específicos, forma flocos denominados de lodo ativado ou lodo biológico (CASAN, 2001).

Esse sistema é muito utilizado, mundialmente, para o tratamento de despejos domésticos e industriais, em situações onde é necessária uma elevada qualidade do efluente (SPERLING, 1997), sendo indicado para locais onde se dispõe de pouca área para a implantação de sistemas de tratamento.

A adoção deste processo favorece a redução de maus odores, insetos e vermes; por outro lado, o alto custo operacional, a exigência de um controle laboratorial diário, o alto consumo de energia e a possibilidade de surgirem problemas ambientais com ruídos e formação de aerossóis (que podem carrear microorganismos patogênicos ou não) são algumas das desvantagens deste sistema (CASAN, 2001). O sistema de tratamento, lodo ativado do tipo aeração prolongada, tem duas fases distintas: a fase de pré-tratamento (composta do gradeamento e da desarenação) (Figura 1) e a fase denominada de tratamento secundário (Figura 2), que é composta das unidades denominadas de seletor biológico, câmara de desnitrificação, tanques de aeração, decantador secundário, adensadores de lodo, sistema de desidratação e, por último, a prensa desidratadora (SPERLING, 1997; CASAN, 2001).

As etapas biológicas deste sistema de tratamento de esgoto ocorrem nas unidades: seletor biológico, câmara de desnitrificação e tanque aeração (reator). É no reator que ocorrem as reações bioquímicas para a remoção da matéria orgânica e, em condições especiais, da matéria nitrogenada. As bactérias (biomassa ativa) utilizam o substrato presente no esgoto bruto para se desenvolverem, e o fornecimento de oxigênio é feito por aeradores mecânicos. As bactérias envolvidas neste processo formam uma matriz gelatinosa, o que lhes confere a propriedade de flocular, ou seja, aglutinam-se entre elas e com outros microrganismos. O floco formado possui dimensões maiores, facilitando o processo de sedimentação e, conseqüentemente, auxiliando no processo de remoção de patógenos (SPERLING, 1997). Já no decantador secundário se processa a sedimentação dos sólidos (biomassa). Parte da biomassa sedimentada no fundo do decantador é devolvida ao reator (recirculação), com a finalidade de aumentar a concentração de bactérias garantindo, assim, a elevada eficiência deste tipo de processo de tratamento de esgoto. A outra parte, excesso de lodo é retirada do sistema, encaminhada

para o adensador e, posteriormente, às prensas desaguadoras.

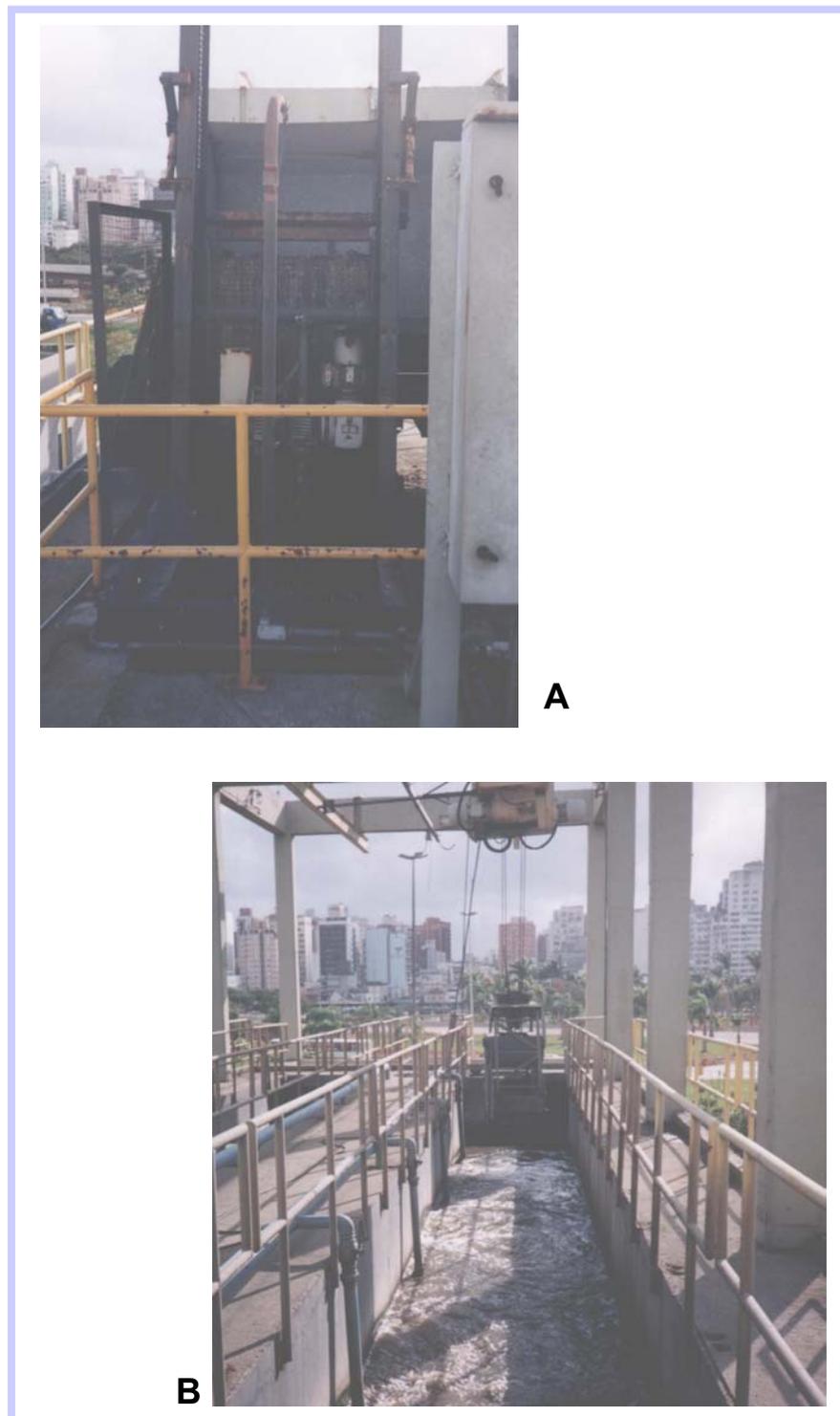


Figura 1: Estação de Tratamento Lodo Ativado - Sistema Insular do Município de Florianópolis. Pré-tratamento: A - Gradeamento; B - Desarenação.

Fonte: Autora.

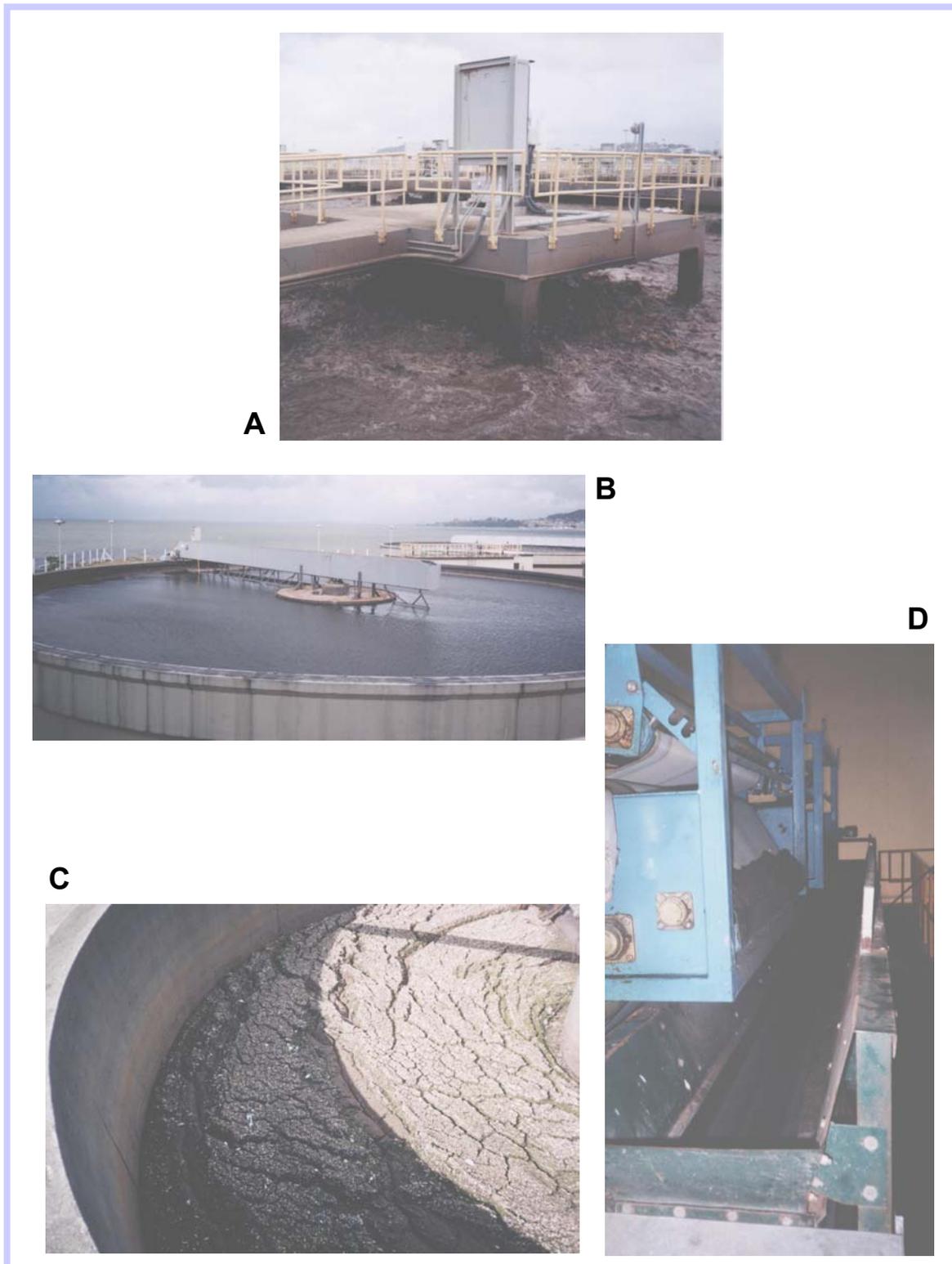


Figura 2: Estação de Tratamento Lodo Ativo - Sistema Insular, do município de Florianópolis. Tratamento secundário: A - Tanque de aeração; B - Decantador secundário; C – Adensamento; D - Prensa desaguadora. **Fonte:** Autora.

I.3. Considerações gerais sobre lodo

I.3.1. Definição

Lodo é todo o resíduo que concentra substâncias orgânicas (40 a 80%) e inorgânicas, bem como microrganismos existentes nos efluentes, originado do tratamento resultante das atividades diárias do homem, quer seja em suas residências, na indústria ou, ainda, em atividades agrícolas (MEDEIROS et al., 1999; GONÇALVES, 1999b). Sendo assim, lodo é o termo que se aplica para os sólidos gerados durante o processo de tratamento de esgotos antes do tratamento adequado para a disposição final. O termo biossólidos é aplicado aos produtos orgânicos gerados no processos de tratamento de esgoto, que podem ser reutilizados de modo benéfico, após tratamento adequado por higienização (MIKI, ANDRIGUETI, SOBRINHO, 2001). Assim, quando devidamente higienizado, estabilizado e seco, o lodo de esgoto recebe o nome de biossólido (MEDEIROS et al., 1999; MIKI et al., 2001; MELO, MARQUES, MELO, 2001).

I.3.2. Tipos de lodo

Existem basicamente três tipos de lodo orgânico: bruto, ativado e digerido. O lodo bruto é aquele produzido por decantadores primários das ETEs, por sedimentação ou flotação, e possui uma coloração acinzentada, sendo pegajoso, de odor ofensivo e facilmente fermentável (MEDEIROS et al., 1999; FERREIRA, ANDREOLI, JÜRGENSEN, 1999a). O lodo que é produzido por ETE's, que utilizam o processo biológico de tratamento, denominado de lodo ativado (Figura 3), tem aparência floculenta, cor marrom e o odor é pouco ofensivo quando fresco (MEDEIROS et al., 1999). O lodo de coloração marrom-escuro, obtido por biodigestores anaeróbios ou aeróbios, através de um processo de estabilização biológica, é chamado de lodo digerido. Quando bem digeridos, tanto o lodo anaeróbio quanto o aeróbio, não possuem odor (MEDEIROS et al., 1999; FERREIRA et al., 1999a).



Figura 3: Lodo coletado diretamente da prensa desaguadora, na Estação de Tratamento de Esgoto - Sistema Insular, do Município de Florianópolis. **Fonte:** Autora.

I.3.3. Produção do lodo

A produção do lodo é variável e está diretamente relacionada com a eficiência das Estações de Tratamento de Água (ETA's), com a eficiência das ETE's e com a qualidade da água tratada. Assim, pode-se dizer que quanto melhor for a eficiência dos sistemas de tratamento melhor a qualidade da água tratada, e maior será a produção (quantidade) de lodo (AISSE, FERNANDES, SILVA, 1999).

Uma ETE que adota como método de tratamento o lodo ativado convencional produz 1,1 a 1,5m³ de lodo/habitante/ano. O tratamento denominado de filtro biológico, de baixa carga, produz 0,4 a 0,6 m³/de lodo/habitante/ano. Na lagoa facultativa do sistema de lagoas de estabilização, se produz apenas 0,03 a 0,04 m³ de lodo/habitante/ano. (FERREIRA et al., 1999a).

Deve-se lembrar, ainda, que a quantidade e a qualidade do lodo produzido por uma ETE dependem, também, da vazão de esgoto tratado, das características do esgoto (domiciliar ou industrial), do tipo de tratamento de

I.3.4. Composição do lodo

As características de um lodo de esgoto dependem do tipo de esgoto, e do processo e grau de tratamento do mesmo (TSUTIYA, 2001a).

No lodo encontram-se nutrientes, matéria orgânica (40% a 70%), nitrogênio (2% a 6%), fósforo (1% a 3,7%), potássio (<1%), cálcio, magnésio, cobre, ferro, metais pesados (cobre, zinco, mercúrio, cádmio, cromo, níquel e chumbo), microrganismos patogênicos (coliformes fecais, bactérias, vírus, fungos e parasitas) (GONÇALVES et al., 1999) e água (TSUTIYA, 2001a).

Os metais pesados, contidos nos biossólidos, podem ser divididos em duas categorias, dependendo do risco que eles representam às plantas e aos animais. São considerados metais que oferecem pequeno risco o manganês, o ferro, o alumínio, o cromo, o arsênio, o selênio, o antimônio, o chumbo e o mercúrio. Os metais potencialmente perigosos aos homens e aos animais são: zinco, cobre, níquel, molibdênio e cádmio (TSUTIYA, 2001a).

Os metais pesados requerem uma atenção especial, pois representam um grupo de poluentes que não são biodegradados biologicamente ou quimicamente de forma natural, principalmente, em ambientes terrestres e em sedimentos aquáticos. Ao contrário, são acumulados e podem tornar-se, ainda, mais nocivos quando reagem com alguns componentes dos solos (GONÇALVES et al., 1999).

Os microrganismos ficam absorvidos às partículas sólidas e tendem a precipitar na fase de decantação, durante o processo de tratamento de esgoto, concentrando-se no lodo de esgoto (TSUTIYA, 2001a). A densidade dos patógenos que podem estar presentes no lodo de esgoto, de uma determinada localidade, é bastante variável e depende das condições sócio-econômicas da população, das condições sanitárias, da região geográfica, da presença de animais, da presença de indústrias agro-alimentares, da natureza do efluente, e por fim, do tipo de tratamento ao qual o lodo foi submetido. Numa mesma ETE, a contaminação do lodo pode variar constantemente, dependendo das características da população (MEDEIROS et al., 1999). Nos países mais desenvolvidos, cujas populações apresentam padrões adequados de saúde, a densidade de alguns patógenos no lodo, como a de ovos de helmintos, é mais

baixa do que em países em desenvolvimento (TSUTIYA, 2001a).

Normalmente, o controle desses microorganismos é feito em amostras coletadas no afluente e no efluente final de uma ETE, tornando possível a avaliação da eficiência do tipo de tratamento adotado e a avaliação do impacto do despejo do efluente líquido no corpo receptor (águas oceânicas ou rios) (KELLNER & PIRES, 1998).

De maneira geral, os microorganismos patogênicos costumam aparecer em pequeno número e esporadicamente, o que torna difícil sua detecção. Para contornar este problema, ao invés de investigar a presença de microorganismos patogênicos, procura-se outros organismos que permitam supor a possível existência dos mesmos. Esses organismos são considerados como indicadores da contaminação fecal e denominados de coliformes fecais. Os organismos indicadores devem estar sempre presentes na microbiota intestinal, ser de origem exclusivamente fecal, estar associados com os organismos patogênicos intestinais, estar em número mais elevado que os patogênicos, ser tão ou mais resistentes que os patogênicos, não devem se reproduzir fora do intestino, devem ser de fácil detecção e não podem ser patogênicos (KELLNER & PIRES, 1998; MEDEIROS et al., 1999).

1.3.5. Higienização do lodo

Para o reuso na agricultura dos lodos ativados, a sanidade do mesmo, caracterizada pela ausência de agentes patogênicos, tais como ovos de helmintos, cistos de protozoários, colônias de bactérias, hifas de fungos e alguns vírus, deve ser assegurada. Essa é realizada através de métodos de higienização, que devem ser econômicos, seguros e de fácil aplicação prática (ANDREOLI et al., 2001). As práticas de higienização do lodo têm como objetivo primordial eliminar ou reduzir a densidade de microorganismos patogênicos. Os biossólidos constituem o resíduo que se obtém após o tratamento do esgoto, com a finalidade de torná-lo menos poluído e permitir seu retorno ao ambiente sem que seja, agente de poluição (MEDEIROS et al., 1999; MELO et al., 2001; MIKI et al., 2001).

A remoção dos patógenos pode ser realizada através de processos

químicos, físicos ou biológicos, buscando sempre assegurar a qualidade sanitária do lodo a ser utilizado para reciclagem na agricultura. Após o tratamento, obtém-se o lodo estável que é aquele que minimiza os riscos para a saúde pública e o meio ambiente (AISSE et al., 1999).

Os principais processos de tratamento do lodo são digestão anaeróbia, calagem (AISSE et al., 1999; ILHENFELD et al., 1999; PASSAMANI & GONÇALVES, 1999; MIKI et al., 2001), compostagem (AISSE et al., 1999; ILHENFELD et al., 1999; PASSAMANI & GONÇALVES, 1999; CARVALHO, 2001; MIKI et al., 2001) e pasteurização (AISSE et al., 1999; ILHENFELD et al., 1999; PASSAMANI & GONÇALVES, 1999) .

Embora a exposição do lodo aos raios solares seja um método reconhecido de higienização, a sua eficiência ainda não foi estudada nas condições brasileiras. Este sistema apresenta, naturalmente, uma grande dependência das condições climáticas, do tempo de exposição e da espessura da camada de lodo (ILHENFELD et al., 1999).

O tratamento do lodo através da técnica anaeróbia é uma das práticas mais antigas na história do saneamento (MIKI et al., 2001) e a mais utilizada para estabilizar os lodos produzidos nas estações de tratamento de esgotos (AISSE et al., 1999; GONÇALVES et al., 1999), devido ao seu baixo custo operacional e ao potencial energético gerado (geração de gás carbônico e gás metano). A digestão anaeróbia consiste em uma série de fases encadeadas, que envolve vários organismos do tipo facultativo ou anaeróbio, que simultaneamente quebram e assimilam a matéria orgânica (MIKI et al., 2001). Esta técnica apresenta como objetivos principais a redução ou destruição dos agentes patogênicos, a estabilização da matéria orgânica; a redução do volume do lodo, com conseqüente redução da umidade e de odores desagradáveis; e a redução da presença de vetores (FERREIRA et al., 1999a).

A calagem, processo químico alcalino, é um dos processos mais eficientes para a eliminação de patógenos do lodo, além de atuar na estabilização e na desodorização do mesmo (AISSE et al., 1999; PASSAMANI & GONÇALVES, 1999). Neste mecanismo de higienização, três fatores intervêm no processo de desinfecção: inicialmente, a alteração da temperatura,

a mudança de pH da massa resultante (mistura de lodo e cal) e, finalmente, a ação da amônia, formada a partir do nitrogênio do lodo quando a temperatura e o pH se elevam (ILHENFELD et al., 1999). A cal (cal virgem – CaO/cal hidratada – CaOH₂) é um dos produtos alcalinos mais baratos e sua adição ao lodo provoca a alcalinização brusca do mesmo, elevando os níveis de pH ligeiramente acima de 12, o que torna o meio insalubre à sobrevivência e ao desenvolvimento de patógenos. Os níveis de pH devem ser mantidos por um período de tempo de aproximadamente 14 dias para garantir, assim, a eficiência do tratamento (AISSE et al., 1999; PASSAMANI & GONÇALVES, 1999; ANDREOLI et al., 2001).

A compostagem é um processo de degradação aeróbia onde a matéria orgânica se decompõe e/ou se transforma, sob a ação de microrganismos. Sua ação na eliminação dos patógenos ocorre através da elevação natural da temperatura do lodo para mais de 60°C. Esta condição, mantida por alguns dias, provoca a morte dos microrganismos patogênicos (AISSE et al., 1999; PASSAMANI & GONÇALVES, 1999; ANDREOLI et al., 2001; CARVALHO, 2001). Este processo pode ser considerado uma forma ambientalmente adequada de reciclagem de matéria orgânica. Por ser natural, é possível reproduzi-lo a partir do emprego de técnicas físicas, biológicas e bioquímicas, constituindo uma aplicação biotecnológica. Esta tecnologia tem sido utilizada como uma das formas de reciclar a matéria orgânica (REIS, BIDONE, GEHLING, 2000).

O processo físico de elevação da temperatura do lodo, oriundo das lagoas de estabilização, com conseqüente diminuição da concentração de patógenos é denominado de pasteurização. Quando a temperatura é elevada a 70°C e mantida durante 30min, os vírus, helmintos, protozoários e bactérias patogênicas são inteiramente destruídos (AISSE et al., 1999; ILHENFELD, et al., 1999;* PASSAMANI & GONÇALVES, 1999)

De acordo com Chávez, Toscano, Márquez (2000), os processos térmicos e os processos alcalinos são equivalentes para o tratamento do lodo. Os critérios de seleção para a utilização de um ou de outro devem levar em consideração o local da ETE e os fatores econômicos.

Uma outra alternativa para o tratamento, e conseqüente desinfecção em geral do lodo de esgoto, foi proposta por Robertson et al. (1999). Trata-se de ciclos de congelamento (-25°C) e descongelamento (temperatura ambiente) do material contaminado. Por ter reduzido a viabilidade dos oocistos, este método merece ser melhor estudado.

I.4. Lodo de esgoto: disposição final e utilidades

O objetivo dos sistemas de tratamento de esgoto é concentrar as impurezas e o material potencialmente poluído dos esgotos, em um subproduto (ILHENFELD, PEGORINI, ANDREOLI, 1999). Em qualquer tipo de tratamento utilizado para o esgoto sanitário, haverá a geração do referido subproduto, denominado de lodo de esgoto, e seu destino final pode representar até 60% dos custos operacionais de uma ETE (BONNET, LARA, DOMASZAK, 1998; ANDREOLI & FERNADES, 1999). Segundo Tsutiya (2001b), o custo para o tratamento e a disposição final do lodo pode variar de 20% a 40% do custo operacional de uma ETE.

Durante anos, os projetos das ETE's, praticamente, ignoravam o destino adequado do lodo de esgoto a ser removido (ANDREOLI & FERNADES, 1999). No entanto, com o aumento da consciência ambiental, o destino do lodo passou a representar um problema a ser resolvido, tendo em vista, principalmente, a segurança sanitária e ambiental (GONÇALVES et al., 1999).

Caso o esgoto e o lodo não sejam tratados adequadamente e se, de algum modo, alcançarem os rios, podem contaminá-los, estendendo seus efeitos nocivos à pastagens, plantações e indivíduos. Portanto, conclui-se que quanto maior for a proporção de lodo tratado, menores serão os riscos da população em contaminar-se com patógenos, sejam eles, vírus, bactérias ou parasitas (SOCCOL et al., 1999). Infelizmente, não é raro o lodo ser armazenado em condições precárias, ou ser distribuído para agricultores sem controle algum de sua qualidade, ou, pior ainda, ser lançado nos cursos d'água (ANDREOLI & FERNANDES, 1999).

Além dos potenciais efeitos nocivos deste lodo liberado no ambiente à saúde humana, animal e vegetal, em função da presença de patógenos, ele

pode, também, provocar o acúmulo de metais pesados ou compostos orgânicos no solo (GONÇALVES et al. 1999).

Dentre as várias alternativas racionais que, de fato, são utilizadas para dar um destino adequado ao lodo, pode-se destacar sua aplicação em áreas florestais, o reúso industrial (TSUTIYA, 2001b), a disposição de superfície (GONÇALVES et al., 1999; LARA, 1999; MEDEIROS et al., 1999), as lagoas de armazenamento (FERREIRA, ANDREOLI, JÜRGENSEN, 1999b; GONÇALVES et al., 1999; LARA, 1999; MEDEIROS et al., 1999), os aterros sanitários, a incineração e, principalmente, o uso agrícola (também denominado de reciclagem agrícola) (IMHOFF & IMHOFF, 1986; LARA, 1999; MEDEIROS et al., 1999). A disposição oceânica do lodo, como destino final, é um processo aceito por Imhoff & Imhoff (1986), Medeiros et al., (1999), Lara (1999), Gonçalves et al., (1999) e Tsutiya (2001b); porém, Ferreira et al., (1999b) afirmam que trata-se de um processo, que não é mais usado por grande parte dos países e que, tende a ser uma prática proibida.

A incineração é uma alternativa cara, que requer o monitoramento cuidadoso dos gases gerados no processo, apresentando como subproduto as cinzas, as quais necessitam de disposição adequada. Trata-se de uma solução interessante para cidades densamente povoadas, onde as alternativas de destino final são escassas (AISSE et al., 1999).

No Brasil, a disposição dos lodos gerados pelas ETE's visa, quase que exclusivamente, a sua retirada da área da ETE por caminhões, sem nenhuma definição clara de seu destino final (SOBRINHO, 2001).

De acordo com Ferreira et al. (1999b), a reciclagem agrícola, quando realizada de forma racional e segura, alia baixo custo e um impacto ambiental positivo, podendo ser considerada, ambientalmente, a solução mais correta, pois promove o retorno dos nutrientes ao solo.

De acordo com Sperling (1997), muitos países já utilizam o lodo como fertilizante para o solo de plantações, pastagens, áreas recreativas, jardins, florestas ou áreas degradadas. Na França, 58% dos biossólidos gerados pelas ETE's destinam-se ao uso agrícola, 27% são dispostos em aterros e 15% são incinerados. Dos biossólidos gerados pela Espanha, 50% são destinados à

reciclagem agrícola, 35% são destinados aos aterros sanitários, apenas 5% são incinerados e os restantes 10% são destinados para disposição oceânica. A Suíça destina 45% dos seus biossólidos para a reciclagem agrícola, 30% têm como destino os aterros sanitários e 25% são incinerados (TSUTIYA, 2001b).

No Brasil, onde a prática de tratamento de esgotos é recente e pouco desenvolvida, o uso agrícola ainda é restrito; oficialmente, esta prática ocorre, em escala experimental, nos estados de São Paulo, Paraná e Distrito Federal (VANZO, MACEDO, TSUTIYA, 2001).

Para as condições ambientais brasileiras, a reciclagem agrícola do lodo apresenta vários aspectos positivos, pois os climas tropical e subtropical expõem o solo a intenso intemperismo e rápida mineralização da matéria orgânica, sendo uma alternativa bastante promissora. O uso do lodo na agricultura fornece ao solo matéria orgânica, macro e micronutrientes, atuando como condicionador do solo e contribuindo para uma agricultura auto-sustentável (GONÇALVES et al., 1999; LARA, 1999).

Como fator positivo do reuso do lodo, resta ainda acrescentar que a quantidade e a variedade de nutrientes da matéria orgânica presente no lodo aumentam a fertilidade do solo, melhorando suas características físico-químicas. A mistura do lodo ao solo permite aumentar a capacidade de armazenamento de nutrientes do mesmo e facilita a infiltração de água, sem, no entanto, propiciar a ocorrência de erosão; este risco, na verdade, fica bastante diminuído (GONÇALVES et al., 1999).

As propriedades dos biossólidos são semelhantes as de outros produtos orgânicos, geralmente, usados na agricultura (esterco suíno, bovino e avícola); portanto, em termos de resultados agronômicos, os biossólidos poderiam ser aplicados a maioria das culturas. Porém, algumas culturas se prestam mais do que outras para o uso de biossólidos. Desta forma, por precaução, é vetado o uso de biossólidos (mesmo que higienizados) para a horticultura e demais produtos consumidos crus, que tenham contato direto com os mesmos. As gramíneas (milho, trigo, cana-de-açúcar e sorgo), pelas suas características, são as culturas mais recomendadas e as que dão melhores respostas ao uso de biossólidos (TSUTIYA, 2001b).

Pesquisas atuais apresentam bons resultados do uso do lodo nas culturas de milho e repolho, na produção do tamboril (*Enterolobium contortissiliquum* Vell. Morong) e no plantio do cafeeiro (*Coffea canephora*) (COSTA et al., 1999).

Por outro lado, este processo de reciclagem do lodo (biossólidos) exige a definição de critérios seguros para sua implementação, principalmente, no que se refere ao acúmulo de metais pesados. Os elementos potencialmente contaminantes necessitam ser neutralizados e controlados para garantir a segurança do uso agrícola do lodo (SOCCOL et al., 1999). Os biossólidos devem também, apresentar pequena ou nenhuma atração de vetores como moscas, roedores e mosquitos, para reduzir o potencial de transmissão de doenças (TSUTIYA, 2001a). O monitoramento do lodo (biossólidos) é, particularmente, imprescindível para as condições brasileiras, onde não há conhecimento acumulado sobre a persistência de patógenos nos solos, após sua aplicação (BONNET et al., 1998).

Desde a mais remota antigüidade, os biossólidos são utilizados na agricultura, principalmente, entre os povos do oriente, como na China, onde a reciclagem dos excrementos humanos era rotineira. No mundo ocidental, entretanto, barreiras culturais dificultam essa prática. É de extrema importância para o sucesso da reciclagem agrícola do lodo de esgoto, que esta seja bem aceita por parte dos produtores/agricultores, pois para muitos, os esgotos e as ETE's são, ainda, consideradas como fontes de poluição, e não como prováveis fontes de energia para uma agricultura auto-sustentável (VANZO, 2001). Como já citado acima, para uma maior valorização agrícola deste produto, é fundamental o monitoramento dos patógenos nos solos fertilizados e nos produtos produzidos (BONNET et al., 1998).

Nessa perspectiva, as ETE's poderiam transformar-se em indústrias de fertilizantes, e os seus lodos, quando tratados adequadamente, em produtos, que ao serem aplicados nos solos, a eles devolveriam os minerais e a matéria orgânica que um dia foram retirados (VANZO, 2001).

Infelizmente, no Brasil, a disposição dos lodos gerados pela ETE's visa a sua retirada da área de tratamento, por caminhões, que os transportam, geralmente, para aterros sanitários, sem maiores critérios de segurança

A ETE-CASAN, Sistema Insular, localizada em Florianópolis, produz, aproximadamente, 30m³ de lodo/dia, que são transportados por uma empresa privada, ao custo de R\$ 900,00/dia, até o aterro sanitário do mesmo município, sem que tenha sido devidamente tratado por um processo de higienização.

Este trabalho teve como objetivo primordial padronizar uma metodologia capaz de detectar e quantificar oocistos de *Cryptosporidium* spp., no lodo da ETE-CASAN, Sistema Insular, como forma de contribuir para o monitoramento da presença de microorganismos patogênicos.

1.5. Considerações sobre o lodo como disseminador de parasitoses

A transmissão de doenças humanas pelo lodo não tratado pode ocorrer de forma direta e/ou indireta (SOCCOL et al., 1998; GONÇALVES et al., 1999; MEDEIROS et al., 1999) ou, ainda, de forma vetorizada (GONÇALVES et al., 1999).

A contaminação direta (Figura 4) pode ocorrer pelo manejo de áreas onde o lodo foi aplicado, pelo contato com vegetais crus cultivados em solo adubado com lodo e pela inalação de microrganismos patogênicos através do espalhamento do lodo no solo (GONÇALVES et al., 1999; MEDEIROS et al., 1999).

A transmissão indireta (Figura 5) pode acontecer por consumo de vegetais, carne e leite e animais, que tenham sido contaminados por patógenos presentes no lodo, pela ingestão de água contaminada, pela proximidade das áreas de aplicação do lodo e pelo contato com agentes vetores (roedores e insetos), que tenham estado nas áreas que receberam lodo (GONÇALVES et al., 1999; MEDEIROS et al., 1999).

Os microrganismos encontrados no lodo podem ser saprófitas (que participam nos processos de tratamento biológico dos esgotos), comensais, simbioses e parasitas. Apenas alguns deles são patogênicos, ou seja, capazes de causar doenças no homem e em animais (MEDEIROS et al., 1999;

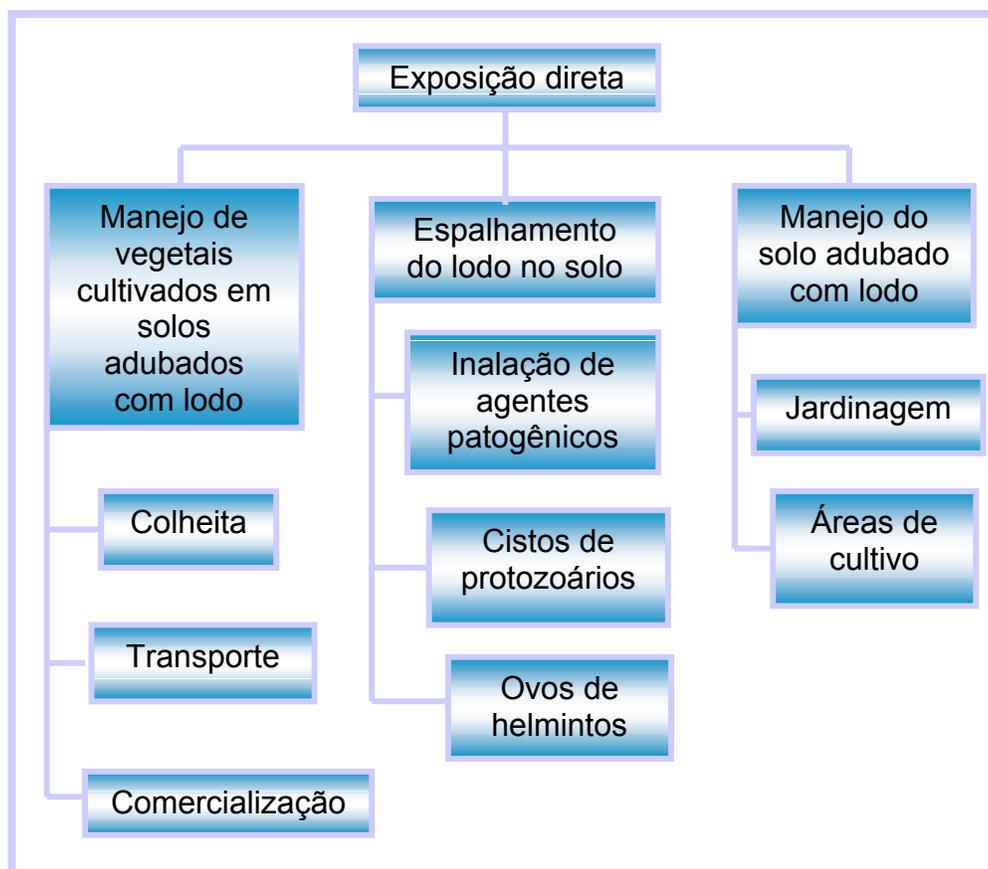


Figura 4: Riscos de exposição a patógenos presentes no lodo: Exposição direta.
Fonte: Adaptado de SOCCOL et al. (1998) e MEDEIROS et al. (1999).

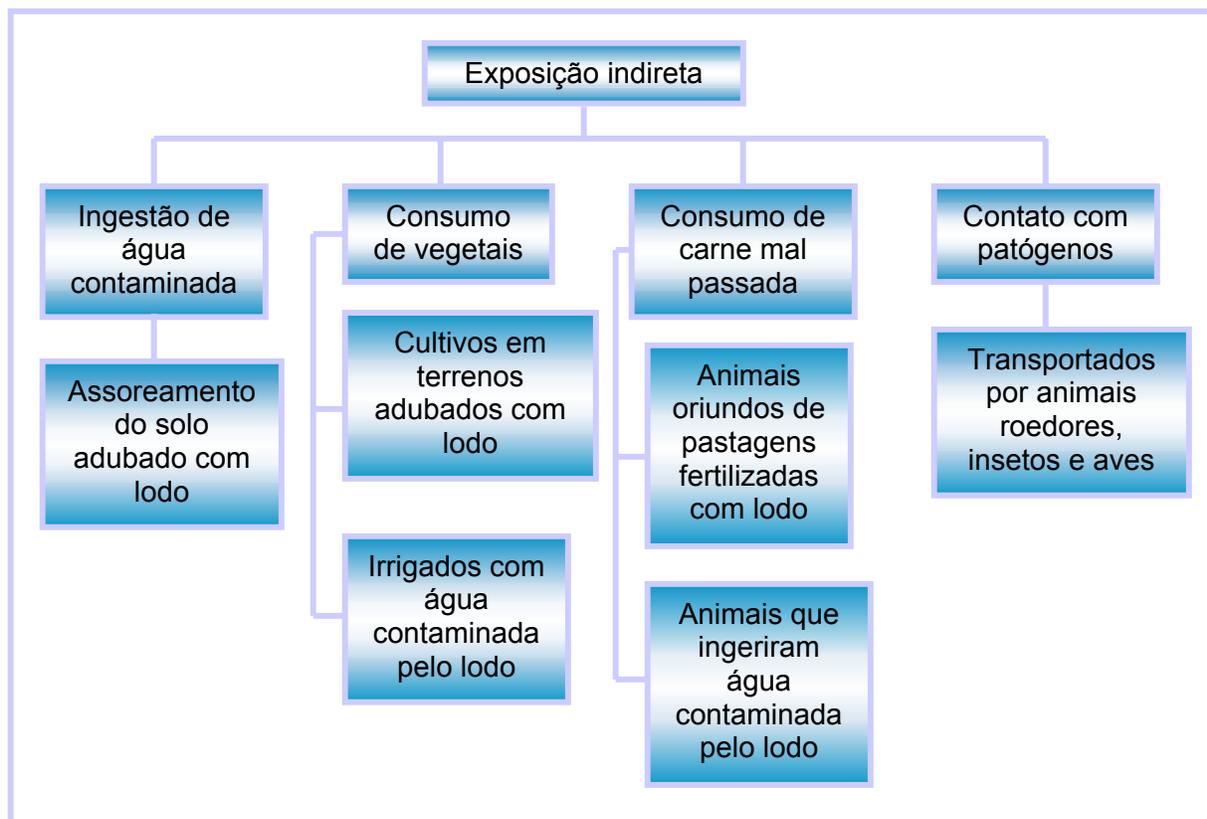


Figura 5: Riscos de exposição a patógenos presentes no lodo: Exposição indireta
Fonte: Adaptado de SOCCOL et al. (1998) e MEDEIROS et al. (1999).

TSUTIYA, 2001a). Dentre os patogênicos, quatro grupos podem ser encontrados: fungos, vírus, bactérias e parasitas (helmintos e protozoários) (BONNET et al., 1998; ILHENFELD et al., 1999; MEDEIROS et al., 1999; ANDREOLI et al., 2001; TSUTIYA, 2001a).

Em relação aos patógenos presentes no lodo, anteriormente mencionados, os ovos de helmintos, cistos e oocistos de protozoários e as bactérias podem representar riscos à saúde humana e animal. Esses riscos são devido à ampla distribuição geográfica destes patógenos, à alta frequência de doenças parasitárias na população, ao longo tempo de sobrevivência dos ovos de helmintos no meio externo, à baixa dose infectante (um ovo ou alguns cistos e oocistos são suficientes para infectar o hospedeiro) e à ausência de imunidade permanente dos hospedeiros (SOCCOL, et al., 1999; ANDREOLI et al., 2001).

Atualmente, estima-se que existam aproximadamente 30 enfermidades, que podem ser transmitidas pelo uso do lodo em ambientes domiciliares, as quais são mais comuns em países de climas temperados e tropicais, sendo geralmente provocadas por nematódeos ou cestódeos (SEMENAS et al., 1999).

Por exemplo, capacidade de um determinado parasita causar infecção em humanos depende de vários fatores, tais como:

- * o tipo de agente infeccioso e sua virulência;
- * seu modo de transmissão;
- * o número de indivíduos que estão parasitando o homem;
- * o tamanho do agente agressor;
- * a capacidade de produzir ou não toxinas;
- * a localização do microorganismo no organismo do hospedeiro;
- * a resistência do hospedeiro (imunidade), pois apenas um número limitado de espécies de microorganismos são capazes de provocar doenças em hospedeiros normais;
- * a idade do hospedeiro, uma vez que crianças são mais suscetíveis à doenças parasitárias do que os adultos;

* o bom estado nutricional do hospedeiro pode bloquear a ação do parasito; por outro lado, o hospedeiro com estado nutricional debilitado torna-se suscetível à ação parasitária;

* os diferentes hábitos e costumes podem influenciar na aquisição de uma doença parasitária;

* a utilização inadequada de medicamentos antiparasitários e imunossuppressores podem exacerbar os sintomas de uma parasitose (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

Parasitas são seres organizados que durante sua vida, ou parte dela, vivem às custas de outro, dele se nutrindo e causando algum dano ao outro (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

Os principais parasitas patogênicos presentes nos biossólidos são os helmintos e os protozoários. Durante sua fase parasitária, eles vivem no trato gastrointestinal do hospedeiro (homem ou animal) e seus ovos e cistos, respectivamente, são eliminados para o exterior através das fezes, podendo contaminar alimentos, (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999), águas de abastecimento, águas residuárias de estações de tratamento e, conseqüentemente, lodos (SOCOOL et al., 1999).

No grupo dos protozoários, destacam-se o *Cryptosporidium* spp., causador de gastroenterites; a *Entamoeba histolytica*, causadora de enterites agudas; a *Giardia lamblia*, que causa giardíase; o *Balantidium coli*, que causa diarréia e disenteria, e o *Toxoplasma gondii*, que provoca toxoplasmose (SILVA & MARA, 1979; UEHARA & VIDAL, 1989; BONNET et al., 1998; KELLNER & PIRES 1998; CIMERMAN & CIMERMAN, 1999; GONÇALVES et al., 1999; ILHENFELD et al., 1999; SOCOOL et al., 1999; TSUTIYA, 2001a).

Pertencem ao grupo dos helmintos: *Ascaris lumbricoides* (provoca distúrbios digestivos e nutricionais, dores no abdômen e vômitos), *Trichuris trichuria* (provoca dores abdominais, diarréia, anemia e perda de peso), *Toxocara canis* (provoca febre, desconforto abdominal, dores musculares e sintomas neurológicos), *Taenia saginata* (provoca insônia, anorexia, dores abdominais e distúrbios digestivos), *T. solium* (provoca os mesmo sintomas da *T. saginata*, associados ou não, a sintomas nervosos), *Necator americanus* (provoca

distúrbios digestivos), *Hymenolepis nana* (provoca diarreia) (SILVA & MARA, 1979; UEHARA & VIDAL, 1989; BONNET et al., 1998; KELLNER & PIRES 1998; CIMERMAN & CIMERMAN, 1999; GONÇALVES et al., 1999; ILHENFELD et al., 1999; SOCOOL et al., 1999), *Ancylostoma duodenale* (provoca distúrbios intestinais, emagrecimento e anemia), *Trichostrongylus axei* (provoca gastrite e úlcera gástrica em bovinos, eqüinos e no homem (ILHENFELD et al., 1999; TSUTIYA, 2001a) e *Ascaris suum* (provoca em suínos distúrbios digestivos, nutricionais e emagrecimento) (BONNET et al., 1998; TSUTIYA, 2001a).

O solo é um meio inóspito para a maioria dos organismos existentes no lodo, em decorrência da existência de intensa atividade microbiológica. Por esta razão, a maioria dos patógenos apresenta um curto período de sobrevivência no solo, após a incorporação do lodo. Os ovos de helmintos são exceção a essa regra, por possuírem no seu ciclo biológico normal, uma fase de sobrevivência no solo (ILHENFELD et al., 1999; ANDREOLI et al., 2001).

As restrições ao uso do lodo na agricultura se referem, principalmente, à definição de um período de carência entre a incorporação do lodo no solo e sua utilização; à proibição do plantio de algumas culturas e à observação de distâncias adequadas entre as áreas de aplicação do lodo e regiões densamente povoadas e/ou corpos d'água (ILHENFELD et al., 1999).

Águas minerais podem ser contaminadas por bactérias e por vírus depois da disposição do lodo no solo. Existem evidências científicas de que as bactérias podem migrar verticalmente por 10m, e por 450m horizontalmente, em solos arenosos, e que os vírus podem percorrer 67m vertical e 408m horizontal. Os parasitas, por serem maiores que as bactérias e as partículas virais, acabam ficando na superfície do solo. Assim, não são detectados em águas minerais, mas em contrapartida, são detectados nos solos e em alimentos neles cultivados (MAVRIDOU et al., 2001).

O tempo de estocagem do lodo influencia diretamente na viabilidade de alguns microorganismos. Os vírus entéricos não foram detectados no solo estocado por três meses, e a pesquisa de *Salmonella* spp. foi negativa no lodo estocado há 15 semanas; porém, ovos viáveis de helmintos foram, ainda,

detectados em amostras de lodo estocadas por um período de 46 semanas (MAVRIDOU et al., 2001).

O conhecimento acerca da sobrevivência dos vírus no solo, após a aplicação do lodo não é, ainda, muito extenso; porém, sugere-se que a natureza protéica desses microorganismos favorece sua adsorção à superfície de partículas do solo (principalmente, se este solo for de natureza argilosa), onde ficam protegidos das condições adversas do ambiente (CHERNICHARO, 1997).

O tempo de sobrevivência dos ovos de helmintos e dos cistos de protozoários no meio ambiente pode variar de acordo com a espécie do parasita, com as condições de temperatura do ambiente, umidade e pH do solo, oxigênio e luz solar. O tempo de sobrevivência dos ovos de helmintos pode ser de alguns meses ou até anos, enquanto que os cistos de protozoários duram apenas alguns dias (2 a 15 dias) (SOCCOL et al., 1999).

A quantidade de patógenos encontrada no lodo é variável e está diretamente relacionada com o tipo de efluente e com o processo de tratamento ao qual ele foi submetido (MEDEIROS et al., 1999).

Estudos indicam que alguns processos de tratamento de esgoto apresentam alta eficiência na remoção de alguns protozoários intestinais, ao passo que outros dados indicam que a concentração de oocistos liberada por um efluente de esgoto pode variar na ordem de milhares por litro. Sendo assim, a concentração de protozoários intestinais, presentes no esgoto, depende sobretudo da capacidade de captação do esgoto; da prevalência e da intensidade das infecções na população; da contribuição de águas de uso animal para a estação de tratamento e da intensidade das infecções em animais que habitam a região (ROBERTSON et al., 1999).

Os poucos estudos que têm dado relevância à questão da detecção do *Cryptosporidium* spp. em esgotos e nos seus resíduos, indicam que o número de oocistos é variável, tanto para os afluentes como para os efluentes do esgoto (RIMHANEN-FINNE; RONKAINEN, HÄNNINEN, 2001). Os mesmos autores relataram que no lodo de esgoto foram encontrados de 10^5 a 10^6 oocistos/Kg de lodo.

Dados publicados por Bukhari et al. (1997) indicam que os níveis podem variar de 4 a 13.700 oocistos/litro nos esgotos dos Estados Unidos e de 2 a 800 oocistos/litro nos esgotos da Escócia.

A concentração de oocistos de *Cryptosporidium* em afluentes de esgoto foi também estimada por Robertson et al. (1999), podendo variar entre as ETE's e conforme o processo de recuperação de microorganismos, adotado pela estação.

Para o reuso seguro do lodo na agricultura é necessário que se estabeleçam limites da presença de patógenos, para se evitar que a saúde de homens e de animais seja colocada em risco. É de extrema importância a proposição de limites aceitáveis para a ocorrência de cistos e oocistos de protozoários. Os ovos de parasitas também merecem atenção especial, porque são extremamente resistentes a maioria dos tratamentos de estabilização de efluentes.

A França, que utiliza águas residuárias de esgoto na irrigação agrícola, regulamentou como limite aceitável a ocorrência de um ovo de nematódeo por litro de água residuária (GASPARD, WIART, SCHWARTZBROD, 1997).

Com a reciclagem agrícola, o lodo pode disseminar os patógenos (bactérias, vírus e parasitas) no ecossistema. As águas das chuvas podem arrastar os microorganismos para fontes de água que, por sua vez, podem contaminar as pastagens (RIMHANEN-FINNE et al., 2001).

Alguns fatores influenciam na dispersão dos microorganismos patogênicos pelas culturas e para as águas, dentre eles destaca-se o pH do solo, o tipo de microorganismo presente, as condições climáticas da região, as chuvas, o tipo de atividade agrícola, a competição da flora e da fauna do solo (MAVRIDOU et al., 2001).

Por se dispersarem no solo com maior facilidade que os parasitas, as bactérias são consideradas como bons indicadores da contaminação fecal do solo (a bactéria mais comumente utilizada para este fim é a *Escherichia coli*). Em cultivos experimentais, previamente tratados com resíduos de esgoto, a presença de 10^2 coliformes fecais/100mL foi considerada como pouca ou nenhuma contaminação do solo por microorganismos patogênicos

(MAVRIDOU et al., 2001). Os mesmos autores observaram a presença de outros patógenos, como vírus entéricos, vírus da hepatite A, poliovírus, *Salmonella* spp., protozoários e helmintos no solo e em culturas, depois da disposição do lodo no solo.

I.6. Considerações sobre o gênero *Cryptosporidium*

I.6.1. Histórico

O gênero *Cryptosporidium* foi designado em 1907, por Tyzzer, para nomear um pequeno coccídio encontrado nas glândulas gástricas de camundongos (TZIPORI, 1988; FARTHING, CEVALLOS, KELLY, 1996; NETO & ASSEF, 1996; LIMA, 2000; REY, 2001), recebendo o nome de *C. muris*. Em 1911, o mesmo autor encontrou outra espécie no intestino delgado de camundongos, e a descreveu como *C. parvum*, por ser menor que o primeiro (FARTHING et al., 1996; LIMA, 2000).

Até o ano de 1955, quando foi relacionado à enterite em perus, era considerado comensal (FARTHING et al., 1996; NETO & ASSEF, 1996).

O primeiro caso humano de criptosporidiose foi registrado em 1976 em uma criança imunocompetente com quadro de enterocolite aguda e autolimitada (FARTHING et al., 1996; SODRÉ & FRANCO, 2001). Assim, seu papel como patógeno foi, então, reconhecido nos anos 70, como causador de enterites em perus, bovinos, várias espécies de peixes e répteis, e no homem (FERREIRA & NISSHIOKA, 1999).

No entanto, 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; DE CARLI, 2001).

Taxonomicamente, o gênero *Cryptosporidium* pertence ao filo Apicomplexa (protozoários que possuem um complexo apical); classe Sporozoa (ciclo reprodutivo exibindo fases assexuada e sexuada) (FARTHING et al., 1996; NETO & ASSEF, 1996; SODRÉ & FRANCO, 2001; REY, 2001);

com formação de oocistos; subclasse Coccidia (ciclo de vida envolvendo merogonia, gametogonia e esporogonia); ordem Eucoccidiorida (merogonia presente) (FARTHING et al., 1996; NETO & ASSEF, 1996; SODRÉ & FRANCO, 2001); subordem Eimeriina (com desenvolvimento independente de micro e macrogametas); família Cryptosporidiidae (oocistos apresentando quatro esporozoítos e sem esporocistos) (SODRÉ & FRANCO, 2001).

I.6.2. Habitat

O *Cryptosporidium* spp. parasitam a parte externa do citoplasma da célula, dando a impressão de se localizar fora dela, ou seja, de localização intracelular extracitoplasmática (Figura 6) (FARTHING et al., 1996; LIMA, 2000). Assim, o parasita se desenvolve nas microvilosidades de células epiteliais do trato gastrintestinal, mas podendo se localizar também no parênquima pulmonar, vesícula biliar (ASH & ORIHEL, 1997; LIMA, 2000), ductos pancreáticos, esôfago e faringe (LIMA, 2000).

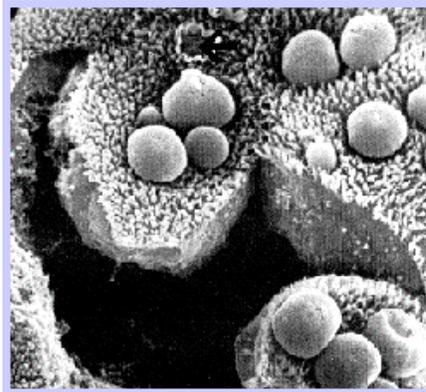


Figura 6: Microscopia eletrônica de *Cryptosporidium* spp. no trato intestinal.

Fonte: <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/cryptosporidium.html>

I.6.3. Morfologia

Os oocistos do *Cryptosporidium* são pequenos, esféricos ou ovóides: cerca de 5,0 x 4,5µm para o *C. parvum* (ASH & ORIHEL, 1997; HEYNEMAN, 1998; LIMA, 2000; REY, 2001) e 7,4 x 5,6µm para *C. muris*, e contêm quatro esporozoítos livres em seu interior (Figura 7), quando eliminados nas fezes (LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001).



Figura 7: Microscopia eletrônica de um meronte rompido de *Cryptosporidium* spp., mostrando os merozoítos em seu interior.

Fonte: <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/cryptosporidium.html>

I.6.4. Reprodução

Por ser um coccídio, multiplica-se por um processo assexuado (merogonia) com a ocorrência de duas gerações de merontes, e por um processo sexuado (gametogonia) com a formação de macrogametas, e microgametas que resultarão em oocistos, após a fecundação, em um mesmo hospedeiro (LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001).

I.6.5. Transmissão

O homem pode se infectar pela ingestão dos oocistos infectantes (FARTHING et al., 1996; ASH & ORIHIEL, 1997; LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001), pela inalação das formas infectantes (FAYER, MORGAN, UPTON, 2000; LIMA, 2000) ou pela auto-infecção (LIMA, 2000).

Outras rotas de transmissão também são conhecidas: contato direto ou indireto pessoa-pessoa (via orofecal), incluindo-se a possibilidade de atividades sexuais (FAYER et al., 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001); contato de humanos com animais contaminados; ingestão de águas minerais contaminadas; ingestão de águas de recreação (piscinas, lagoas, etc.) (FAYER et al., 2000); ingestão de águas contaminadas com oocistos de *Cryptosporidium* (contaminadas pelas fezes de bovinos, de outros animais ou por esgotos) (FARTHING et al., 1996; FERREIRA & NISHIOKA, 1999; LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001) e ingestão de alimentos crus contaminados (FAYER et al.,

2000; LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001). A transmissão do *Cryptosporidium*, sob a forma aerossolizada, parece ser possível, e essa questão tem sido alvo de alguns estudos epidemiológicos (NETO & ASSEF, 1996; SODRÉ & FRANCO, 2001).

Fayer et al. (2000) relataram, em seus estudos, que a dose média infectante (DI_{50}) para os voluntários foi de 132 oocistos. Mas durante a pesquisa, um entre cada cinco dos voluntários se contaminou com a ingestão de apenas 30 oocistos. Este dado está de acordo com Du Pont et al. (1995), que também relataram que inóculos de apenas 30 oocistos são capazes de causar infecções.

1.6.6. Ciclo biológico

O ciclo biológico (Figura 8) é monoxênico (que se processa num único hospedeiro) e tem início com a ingestão dos oocistos infectantes, que liberam os esporozoítos na luz do intestino delgado (SODRÉ & FRANCO, 2001). Os esporozoítos penetram nos enterócitos, localizando-se num vacúolo parasitóforo superficial extracitoplasmático, onde amadurecem assexuadamente iniciando, assim, a fase de merogonia (TZIPORI, 1988; NETO & ASSEF, 1996; LIMA, 2000). Nessa fase assexuada do ciclo biológico são formados merontes do tipo I e do tipo II. Os merontes do tipo I contêm de 6 a 8 merozoítos e são capazes de se reproduzirem e se multiplicarem no interior do enterócito infectado ou, então, de invadirem as células vizinhas. Essa fase assexuada propicia que o protozoário se dissemine por vários enterócitos, mesmo que o hospedeiro não seja repetidamente exposto a novas infecções. Os merontes do tipo II contêm quatro merozoítos e não se multiplicam (NETO & ASSEF, 1996; ASH & ORIHÉL, 1997; LIMA, 2000; REY, 2001; SODRÉ & FRANCO, 2001).

Os merozoítos darão início à fase sexuada (gametogonia), culminando na formação dos micro e macrogametócitos. Os microgametócitos livres fertilizam os macrogametócitos originando o zigoto; este estágio é diplóide e evolui até a formação dos oocistos; a primeira divisão que se segue é meiótica (esporogonia) produzindo os quatro esporozoítos, contidos no interior do

ocisto. Cerca de 20% dos ocistos produzidos apresentam parede frágil (delgada) e são responsáveis pela auto-infecção interna do indivíduo, enquanto que os demais, de parede espessa, são eliminados nas fezes do hospedeiro (FARTHING et al., 1996; NETO & ASSEF, 1996; ASH & ORIHEL, 1997; MARSHALL et al., 1997; LIMA, 2000; REY, 2001; SODRÉ & FRANCO, 2001;). Os ocistos eliminados pelas fezes podem contaminar o ambiente e permanecerem viáveis por muitos meses (REY, 2001).

A autoinfecção interna ocorre somente em pacientes suscetíveis e que apresentam um grande número (10^{10}) de formas infectantes delgadas (BUKHARI et al., 1997).

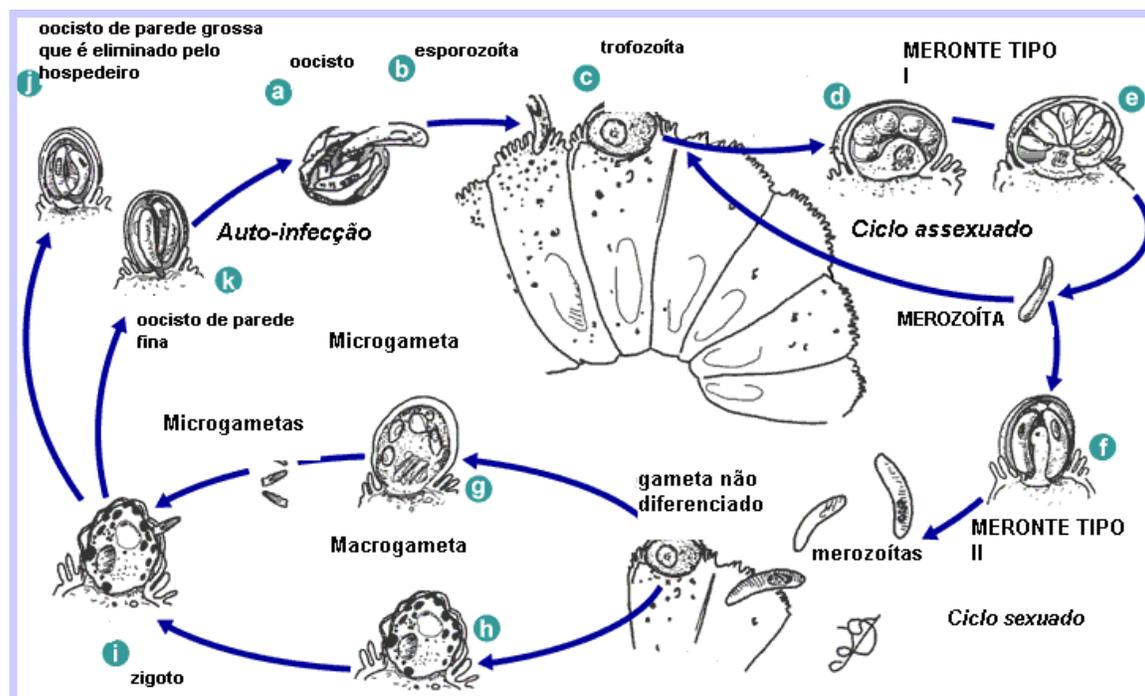


Figura 8: Ciclo biológico do *Cryptosporidium*.
Fonte: Adaptado de HEYWOERT (1992).

Ao contrário dos ocistos da maioria dos outros coccídios, que precisam de um período de incubação fora do hospedeiro para esporularem e se tornarem infectantes, os ocistos já são eliminados esporulados, sendo então infectantes para outros indivíduos (LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001).

A duração do ciclo biológico é curto e varia em média de 2 a 14 dias (ASH & ORIHEL, 1997; LIMA, 2000).

I.6.7. Patogenia

Desde o relato do primeiro caso, em 1976, a criptosporidiose foi considerada uma doença apenas de pacientes imunodeprimidos; porém, atualmente, tem sido observado que é uma doença também de indivíduos imunocompetentes (LIMA, 2000).

Apesar de todos os estudos realizados sobre *Cryptosporidium* spp. ainda não se conhece totalmente a forma como ele causa a doença (FERREIRA & NISHIOKA, 1999; SODRÉ & FRANCO, 2001).

O período de incubação é de 7 a 10 dias, mas pode variar de 5 a 28 dias (NETO & ASSEF, 1996).

A doença tem sido associada com alterações funcionais estruturais do intestino delgado (SODRÉ & FRANCO, 2001), sede preferencial do protozoário (HEYNEMAN, 1998; FERREIRA & NISHIOKA, 1999). A infecção tem sido documentada também no esôfago e no reto (FARTHING et al., 1996; FERREIRA & NISHIOKA, 1999), sistema hepatobiliar e aparelho respiratório.

No intestino delgado, os oocistos liberam os esporozoítos infectantes, que invadem as células epiteliais (enterócitos) (FERREIRA & NISHIOKA, 1999; SODRÉ & FRANCO, 2001). A morte ou dano dos enterócitos podem ser consequência direta da invasão, multiplicação e extrusão dos esporozoítos, (SODRÉ & FRANCO, 2001).

Ainda no intestino delgado, observa-se alteração das células epiteliais, atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas intestinais. Também pode ocorrer uma alteração marcante na arquitetura das vilosidades intestinais, acompanhada da má-absorção de nutrientes (síndrome da má-absorção) (FARTHING et al., 1996; FERREIRA & NISHIOKA, 1999; SODRÉ & FRANCO, 2001; REY, 2001), (especialmente D-xilose e vitamina B₁₂) e diarreia (SODRÉ & FRANCO, 2001).

Pequenos inóculos (aproximadamente 10 oocistos) podem produzir uma infecção persistente, devido ao ciclo de auto-infecção interna (FERREIRA & NISHIOKA, 1999), e algumas evidências indicam que o número de parasitas, que infectam a mucosa é um fator determinante da severidade da doença (SODRÉ & FRANCO, 2001).

I.6.8. Sintomatologia

A severidade e a duração da doença variam de acordo com o estado imunitário do paciente (NETO & ASSEF, 1996).

Em pacientes imunocompetentes, a infecção pelo *Cryptosporidium* resulta em diarreia aguda e, em pacientes imunocomprometidos, ocorre diarreia crônica (XIAO et al., 1998).

Em indivíduos imunocompetentes, a doença se caracteriza por diarreia aquosa (três a dez evacuações diárias, que representam perda de um a três litros de água e nutrientes/dia) com duração de um a 30 dias (média de 12 a 14 dias) (NETO & ASSEF, 1996; LIMA, 2000). Este quadro é denominado de infecção autolimitada (FERREIRA & NISHIOKA, 1999). A excreção dos oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes é intermitente e costuma ser mais prolongada que a fase sintomática da doença. Nesta fase da doença, pode surgir ainda: anorexia, dor abdominal, náusea, flatulência e dor de cabeça. Em crianças, também ocorrem vômitos, desidratação (MARSHALL, et al., 1997; LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001) e febre (NETO & ASSEF, 1996; SODRÉ & FRANCO, 2001).

Nos pacientes imunodeprimidos infectados pelo vírus HIV, o grau de imunodeficiência correlaciona-se com a severidade da infecção; assim, muitas vezes, os sintomas desenvolvem-se insidiosamente, à medida que piora a função imune, apresentando diarreias extremamente volumosas, com importante perda de peso e desnutrição. A contagem de linfócitos CD₄ é útil para prever o curso da infecção pelo *Cryptosporidium* (NETO & ASSEF, 1996).

Em indivíduos imunodeprimidos, o quadro clínico compõe-se de diarreia aquosa que pode conter muco sem apresentar sangue e pus, por vários meses (três a seis litros por dia em média), refratária a qualquer medicação antimicrobiana, com acentuada perda de peso (CURRENT, 1994; FERREIRA & NISHIOKA, 1999, LIMA, 2000). Nesses pacientes podem ocorrer: desequilíbrio eletrolítico, má-absorção (LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001) (principalmente de D-xilose e vitamina B₁₂), esteatorréia, intolerância à lactose (SODRÉ & FRANCO, 2001), emagrecimento acentuado e até óbito (LIMA, 2000). Outros sintomas podem também se manifestar, como por exemplo:

cólicas (que, freqüentemente, se acentuam após a ingesta de alimentos), náuseas, flatulência, mal-estar, fraqueza, anorexia, vômitos, febre e mialgias (NETO & ASSEF, 1996; REY, 2001).

De acordo com Sodré & Franco (2001), as manifesta es clínicas de pacientes (HIV+), com criptosporidiose, mostram quatro padrões da doença: transiente (28,7%), cr nica (59,7%), fulminante (7,8%) e assintomática (3,9%). Ainda de acordo com os referidos autores, a sobrevida dos pacientes mencionados foi de 25 semanas, sendo que os que apresentaram a forma cr nica sobreviveram por 20 semanas e naqueles com a forma fulminante, a sobrevida foi de apenas cinco semanas.

Nos indivíduos com AIDS, a infec o respiratória por *Cryptosporidium* apresenta-se com tosse persistente e dispnéia. A forma pulmonar da doença, provavelmente, é comum, mas essa forma de transmissão é ainda subestimada, podendo ser fatal para pacientes imunodeprimidos (SODRÉ & FRANCO, 2001).

1.6.9. Epidemiologia

O parasita *C. parvum* apresenta distribui o geográfica mundial (NETO & ASSEF, 1996; MURRAY et al., 1998; LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001) e já foi reconhecido em todos os continentes (NETO & ASSEF, 1996; FERREIRA & NISHIOKA, 1999), sendo considerado o causador da zoonose emergente mais importante da atualidade (LIMA, 2000).

A prevalência da doença   variável e alguns fatores interferem na sua ocorrência, dentre eles: a idade, os hábitos e os costumes das popula es, a época do ano, a área geográfica, a densidade populacional, o estado nutricional da popula o e a imunocompetência dos indivíduos (LIMA, 2000).

Indivíduos infectados pelo vírus HIV constituem o grupo de maior risco de desenvolver a criptosporidiose (FERREIRA & NISHIOKA, 1999), seguido das crianças com idade entre um a cinco anos de idade (principalmente as que freqüentam creches) (SODRÉ & FRANCO, 2001).

Recentemente, o *Cryptosporidium* spp. foi descrito como um dos responsáveis pela diarréia de verão e pela diarréia dos viajantes (LIMA, 2000);

isto pode ser explicado devido ao fato que os oocistos deste protozoário são resistentes à cloração da água (FARTHING et al., 1996; NETO & ASSEF, 1996; MURRAY et al., 1998; FERREIRA & NISHIOKA, 1999; REY, 2001) e à ozonização (NETO & ASSEF, 1996; MURRAY et al., 1998). Porém, o uso de altas temperaturas com o objetivo de diminuir a viabilidade dos oocistos tem apresentado bons resultados. Alguns oocistos se tornaram inviáveis quando expostos à temperaturas que variaram de 25 a 30°C, por três meses e ainda quando expostos à temperatura de 71°C, por apenas cinco horas, os oocistos foram destruídos. A dessecação também é letal para os oocistos, sendo que apenas 3% deles continuam viáveis, depois de duas horas de dessecação e 100% são destruídos após quatro horas (FAYER et al., 2000).

Segundo Graczyk et al. (1999), a mosca doméstica (*Musca domestica*) tem grande importância na disseminação dos oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente. Estes autores demonstraram a presença de oocistos na superfície e no trato intestinal destes insetos, quando submetidos ao contato com fezes contendo diversas concentrações de oocistos.

I.6.10. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose baseia-se na detecção dos oocistos do parasita através do exame microscópico das fezes e/ou, eventualmente, de outros líquidos orgânicos (ASH & ORIHEL, 1997; MARSHALL et al., 1997; HEYNEMAN, 1998; MURRAY et al., 1998; FERREIRA & NISHIOKA, 1999; DE CARLI, 2001; REY, 2001).

Em indivíduos imunocompetentes, os parasitas são identificados nas fezes três dias após a contaminação e o tempo de emissão é curto (duas a três semanas), não havendo abundância. Já em pacientes imunodeprimidos, a permanência dos oocistos é indefinida, correspondendo aos períodos de diarreia, e a sua eliminação é descontinuada (DE CARLI, 2001). Durante a fase sintomática da infecção, são excretados nas fezes 10^5 a 10^7 oocistos/g (RIMHANEN-FINNE et al., 2001). A diarreia aquosa acaba por diluir os parasitas, e a presença de muco e de numerosos restos alimentares pode mascarar a pesquisa. Devido aos fatores acima mencionados se faz necessária

a realização da coleta de várias amostras e exames, a cada três dias, antes de se concluir pela ausência do protozoário (DE CARLI, 2001).

Várias técnicas têm sido utilizadas para sua visualização, tais como os métodos de coloração derivados de Ziehl-Neelsen (FARTHING et al., 1996; ASH & ORIHEL, 1997; FERREIRA & NISHIOKA, 1999; FAYER et al., 2000; LIMA, 2000; DE CARLI, 2001; SODRÉ & FRANCO, 2001), método de Heine, método de Kinyoun modificado (Figura 9), método da safranina-azul-de-

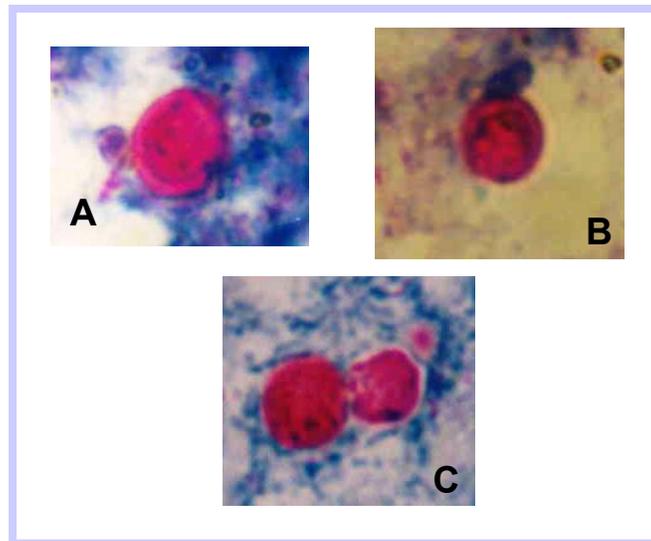


Figura 9. A e B: Oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de lodo, método de Kinyoun modificado. C - Oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes humanas, método de Kinyoun modificado. **Fonte:** Autora.

metileno (ASH & ORIHEL, 1997; FERREIRA & NISHIOKA, 1999; LIMA, 2000; DE CARLI, 2001), método da prata metenamida (FERREIRA & NISHIOKA, 1999; FAYER et al., 2000; LIMA, 2000; DE CARLI, 2001; SODRÉ & FRANCO, 2001) e método de Giemsa (NETO & ASSEF, 1996; LIMA, 2000).

Existem também métodos de coloração por fluorocromos, que incluem: auramina O, auramina-rodamina, auramina fucsina-fenicada, alaranjado de acridina, mepacrina, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e o iodeto de propídio. Esses métodos são altamente sensíveis; no entanto, devido a sua inespecificidade química, os resultados falso-positivos são freqüentes (DE CARLI, 2001).

Alguns investigadores utilizam como procedimento de triagem a microscopia de contraste de fase ou do contraste diferencial de interferência

para a observação direta dos oocistos em amostras fecais ou em concentrados (GARCIA & SHIMIZU, 1993; DE CARLI, 2001).

Também pode se utilizar métodos de concentração, que têm por finalidade aumentar a sensibilidade de detecção dos oocistos e diminuir os artefatos fecais, como a técnica de Sheather (centrífugo-flutuação em solução de sacarose) (ASH & ORIHEL, 1997; MURRAY et al., 1998; FERREIRA & NISHIOKA, 1999; LIMA, 2000; DE CARLI, 2001; SODRÉ & FRANCO, 2001), a técnica de Ritchie (centrífugo-sedimentação pelo formaldeído-éter modificado) (ASH & ORIHEL, 1997; FERREIRA & NISSHIOKA, 1999; LIMA, 2000; DE CARLI, 2001; SODRÉ & FRANCO, 2001) e a técnica de Berlin (centrífugo-sedimentação pelo hidróxido de potássio) (DE CARLI, 2001).

Técnicas imunoenzimáticas utilizando anticorpos monoclonais (FARTHING et al., 1996; FERREIRA & NISHIOKA, 1999) apresentam alto grau de sensibilidade e especificidade ao demonstrarem a presença de oocistos, não somente em fezes como também em águas contaminadas (FERREIRA & NISSHIOKA, 1999). Outras técnicas imunológicas também podem ser utilizadas, como os testes com anticorpos policlonais fluorescentes; técnicas de aglutinação com látex; imunofluorescência com anticorpos monoclonais e ensaios imunoenzimáticos (FAYER et al., 2000).

O diagnóstico pode, ainda, ser feito pela pesquisa de anticorpos circulantes, utilizando a reação de imunofluorescência indireta (FARTHING et al., 1996; NETO & ASSEF, 1996; LIMA, 2000) e/ou a técnica de ELISA (FARTHING et al., 1996; ASH & ORIHEL, 1997; LIMA, 2000).

Os testes realizados através de PCR (reação em cadeia da polimerase) constituem, também, uma alternativa para a detecção de *Cryptosporidium* spp. tanto em amostras clínicas (fezes, escarro, etc) quanto em amostras ambientais. Porém, em determinadas amostras ambientais, alguns contaminantes podem interferir nesses testes (FAYER et al., 2000).

Além das técnicas mencionadas, a realização de medidas micrométricas, com o auxílio do micrômetro ocular, é um critério muito usado para o diagnóstico diferencial entre os oocistos de *Cyclospora cayetanensis* e

Cryptosporidium parvum (FAYER et al., 2000; DE CARLI, 2001; SODRÉ & FRANCO, 2001).

I.6.11. Profilaxia e tratamento

Devido à distribuição disseminada deste protozoário nos seres humanos e em outros animais e a sua resistência aos tratamentos da água (cloração, ozonização e filtração) é difícil prevenir a infecção (MURRAY et al., 1998; FERREIRA & NISHIOKA, 1999).

Recomenda-se o consumo de água fervida, principalmente, para pacientes imunodeprimidos (MURRAY et al., 1998; FERREIRA & NISHIOKA, 1999). Estes pacientes devem, ainda, ter um cuidado especial com a higiene pessoal, vestuário e utensílios (LIMA, 2000). Devem ainda evitar as fezes de animais e dispensar atenção especial às condições sanitárias do local onde habitam (HEYNEMAN, 1998).

Ainda não existe um tratamento efetivo para a criptosporidiose (FARTHING et al., 1996; ASH & ORIHIL, 1997; FERREIRA & NISHIOKA, 1999; LIMA, 2000; REY, 2001). O tratamento é essencialmente sintomático, visando aliviar os efeitos da diarreia e da desidratação (HEYNEMAN, 1998; LIMA, 2000). Para tal, faz-se uso da reidratação oral ou parenteral e/ou de antidiarréicos (FARTHING et al., 1996; FERREIRA & NISHIOKA, 1999).

O primeiro medicamento que acreditou-se ser efetivo para o tratamento da criptosporidiose foi a espiramicina (Rovamycine[®]) (HEYNEMAN, 1998; LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001); porém, ao contrário dos resultados preliminares promissores, esse fármaco não mostrou atividade, quando administrado via oral ou endovenosa (LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO 2001).

Atualmente, a paramomicina (Humatin[®]) tem apresentado uma boa resposta na melhoria do quadro diarréico (FARTHING et al., 1996; LIMA, 2000; SODRÉ & FRANCO, 2001), podendo, também, ser administrada por inalação, para a resolução da criptosporidiose pulmonar sintomática (SODRÉ & FRANCO, 2001).

I.7. Técnicas empregadas para detecção e quantificação de *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais

A primeira dificuldade a enfrentar quando se propõe identificar *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais é diferenciar os oocistos de outras pequenas partículas (algas, leveduras e pequenos fragmentos de plantas) ou de outro parasita (*Cyclospora cayetanensis*) (FAYER et al., 2000).

Deve-se dar atenção e importância para a questão do esgoto como transmissor de patógenos (tal como *Cryptosporidium* spp.), mas os estudos realizados são insuficientes quando comparados com aqueles realizados com a água, enquanto potencial vetor de doenças.

Existem diferenças fundamentais entre a água e o esgoto, incluindo o número de parasitas, concentração de partículas interferentes e outros microorganismos. Essas diferenças sugerem que as técnicas, que são apropriadas para purificação, concentração e monitoramento de *Cryptosporidium* spp. na água não são totalmente adequadas para o lodo (ROBERTSON et al., 2000).

Os estágios infectantes (cistos e oocistos) de um pequeno grupo de parasitas, os protozoários intestinais, formado por espécies dos gêneros *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Entamoeba*, *Balantidium*, *Cyclospora*, *Isospora* e pelos microsporídios, podem sobreviver por extensos períodos no meio ambiente, mesmo quando expostos a variações de umidade e temperatura (ROBERTSON et al., 1999).

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. presentes no esgoto são precipitados para o lodo, durante o processo de tratamento, seja ele a floculação (sedimentação) ou lodo ativado (RIMHANEN-FINNE et al., 2001).

O lodo de esgoto é uma amostra difícil de ser analisada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), devido à presença de algumas substâncias, que podem agir como inibidores da enzima polimerase e da própria reação (VESEY, et al., 1994; RIMHANEN-FINNE et al., 2001).

A pesquisa do *Cryptosporidium* spp. pode ser realizada, com base nas poucas pesquisas já relatadas, através da associação de métodos para

concentração, purificação, detecção e quantificação dos oocistos nas amostras (CALL et al., 2001; HSU et al., 2001).

Para a detecção dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais é necessário que as mesmas sejam, primeiramente, concentradas e purificadas. As técnicas de concentração e purificação têm que remover, ao máximo, as partículas contaminantes e outros fragmentos, que venham a interferir, posteriormente, na metodologia, sem no entanto, provocarem a perda do organismo de interesse (ROBERTSON et al., 2000).

Em vista do *Cryptosporidium parvum* possuir uma dose infectante mínima (de 30 oocistos) (DU PONT et al., 1995), que é consideravelmente baixa para causar diarreia em humanos, as técnicas empregadas para detecção e quantificação deste parasita devem possuir alta sensibilidade e especificidade (CALL et al., 2001).

A microscopia é o método de detecção de *Cryptosporidium* spp. mais comumente usado para amostras ambientais, mas tem sido severamente criticado, devido à ausência de critérios morfológicos para a identificação desses oocistos (RIMHANEN-FINNE et al., 2001).

Bukhari et al. (1997) averiguaram a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras de afluentes e efluentes de esgoto, utilizando vários processos seqüenciais, e não uma única metodologia. Os referidos autores, primeiramente, filtraram (para retirar partículas maiores), e centrifugaram as amostras. O passo seguinte foi submeter as amostras à técnica de flutuação em gradiente de sacarose e os sedimentos obtidos foram concentrados com uma mistura de água-éter. Os concentrados finais foram, então, marcados com anticorpos ligados a fluorocromos e examinados em microscópio de epifluorescência.

Robertson et al. (2000) sugerem para a concentração e purificação do *Cryptosporidium* spp. no lodo, as técnicas de filtração seguida de flutuação em gradiente de sacarose (durante a filtração de afluentes de esgoto pode ocorrer o bloqueio do filtro por causa da alta concentração de partículas de grande tamanho, por este motivo, este método é usualmente mais indicado para amostras de efluentes de esgoto); de recuperação das amostras seguida da

clarificação em éter; captura da amostra seguida da flutuação em sacarose e captura da amostra seguida da técnica da sacarose combinada.

As técnicas de flutuação fundamentam-se no princípio da diferença das densidades específicas 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. As principais vantagens apresentadas pela flutuação são a formação de uma membrana clara com poucos detritos e a remoção e concentração dos parasitas pela membrana, presentes na amostra. No entanto, a alta densidade dos reagentes empregados torna as paredes dos parasitas distorcidas, o que dificulta sua identificação no 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 oocistos de *Cryptosporidium* ssp. (ROSE et al., 1989). As técnicas de citometria de fluxo e de separação imunomagnética, empregam anticorpos policlonais ou monoclonais, marcados com uma substância fluorescente (VESEY et al., 1994).

A citometria de fluxo é realizada através da aplicação 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 indica o 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* e, 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, que podem ser coletadas individualmente. Assim, os oocistos

podem ser purificados das amostras e, ao mesmo tempo, identificados através dos diversos detectores (VESEY et al., 1994). Entretanto, a citometria de fluxo apresenta limitações quando são analisadas amostras ambientais, pois essas amostras, freqüentemente, contêm algas autofluorescentes, organismos que se ligam inesperadamente aos anticorpos monoclonais empregados e partículas minerais, que são indistinguíveis dos oocistos pelos detectores do citômetro de fluxo (VESEY et al., 1993).

Assim, Ferrari et al. (2000) incluíram anticorpos monoclonais marcados com duas diferentes substâncias fluorescentes e, desta forma, os parâmetros de seleção dos oocistos foram aumentados e conseguiu-se uma maior especificidade para a técnica.

Na fase de detecção e quantificação, as metodologias comumente utilizadas são a citometria de fluxo (VESEY et al., 1993; FERRARI et al., 2000), a reação de PCR (RIMHANEN-FINNE et al., 2001) e a imunofluorescência direta e indireta (BUKHARI et al., 1997).

A técnica da separação imunomagnética (SIM) acoplada à imunofluorescência (IMF) vem sendo, usualmente, utilizada para detectar e quantificar microorganismos patogênicos em águas, alimentos e solos. A SIM realiza o isolamento destas estruturas do meio onde se encontram (água, fezes, alimentos, solo ou lodo), enquanto que a IMF confirma e quantifica a estruturas isoladas (DI GIOVANNI et al., 1999; PEREIRA, ATWILL, JONES, 1999; ROCHELLE et al., 1999; YAKUB & STADTERMAN-KNAUER, 2000; SOUZA, STEINDEL, BARARDI, 2001; ROTARIU et al., 2002).

Muitos estudos já foram realizados utilizando tais técnicas para a pesquisa de vários microorganismos, 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 é utilizada para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp., em amostras ambientais de

águas, geralmente em conjunto com *Giardia* spp. (DENG, CLIVER, MARIAM, 1997; ROCHELLE et al., 1999; McCUIN et al., 2001; GREINERT, 2002).

A separação imunomagnética baseia-se na utilização de pequenas pérolas magnéticas (1-5 μ m de diâmetro), sensibilizadas com anticorpos monoclonais ou policlonais, dirigidos contra o microorganismo de interesse (Figura 10).

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 liga na porção Fc dos anticorpos; ou revestimento das pérolas com anticorpo anti-IgG ou IgM, que faz ligação do tipo antígeno-anticorpo com o anticorpo monoclonal ou policlonal a ser utilizado (Figura 11).

As pérolas sensibilizadas são colocadas na amostra e os microorganismos, ligados aos anticorpos presentes na superfície das pérolas magnéticas, são atraídos com o auxílio de um ímã, acoplado à parede do tubo. Enquanto permanecem imóveis, com o auxílio de um campo magnético, o sobrenadante pode ser removido após lavagens com um tampão específico (SAFARÍK & SAFARIKOVÁ, 1999). Essa técnica facilita a remoção de partículas, tanto de amostras ambientais quanto fecais, tornando-as mais limpas para a pesquisa de microrganismos (ROCHELLE et al., 1999).

Pode-se usar anticorpos monoclonais dirigidos contra os epítomos antigênicos das paredes dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Mab CRY 104) e revelá-los pela IMF, através da adição de um anticorpo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Figura 12).

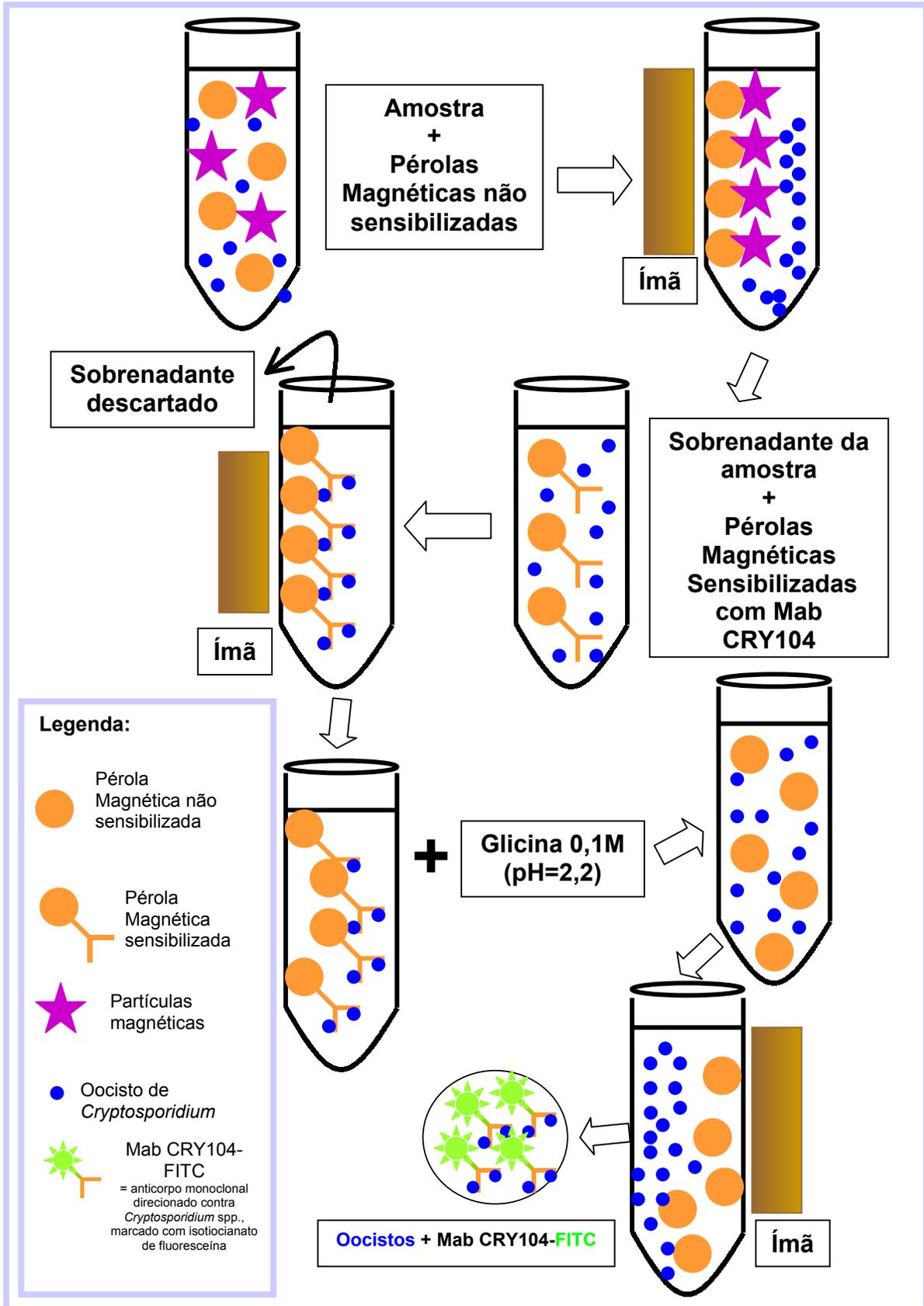


Figura 10: Esquema geral da separação imunomagnética. **Fonte:** Autora

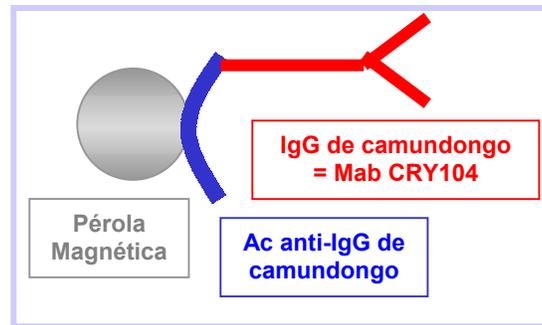


Figura 11: Pérola Magnética sensibilizada.
Fonte: Autora.



Figura 12. Oocisto de *Cryptosporidium* spp. marcado com isotiocianato de fluorescência
Fonte: Autora.

Rotariu et al. (2002) formularam modelos estatísticos para melhorar a performance da separação imunomagnética, aumentando a captura (recuperação) dos microorganismos pelas partículas magnéticas (pérolas). Os autores concluíram que o tempo de captura do microorganismo de interesse pelas partículas magnéticas depende: da concentração e do tamanho das partículas interferentes presentes na suspensão; do volume de fragmentos magnéticos, que compõem o material analisado; da intensidade e do ângulo do campo magnético, que é aplicado no sistema; do tamanho e da densidade do microorganismo a ser capturado; e da densidade e viscosidade do líquido, que contém o microorganismo em suspensão.

A separação imunomagnética pode ser muito útil para reduzir os fatores inibitórios encontrados nas amostras fecais clínicas e nas amostras ambientais

que diminuem a eficiência da reação de PCR (VESEY et al., 1994; RIMHANEN–FINNE et al., 2001).

Em um estudo, realizado por Rimhanen–Finne et al. (2001), a reação da PCR associada à captura imunomagnética mostrou ser um ensaio sensível e objetivo para a detecção simultânea de oocistos de *Cryptosporidium parvum* e cistos de *Giardia* spp. em lodo de esgoto, sendo, pelo menos, 100 vezes mais sensível que a microscopia de imunofluorescência. Assim, este ensaio pode ser usado para diagnosticar a criptosporidiose e giardíase na comunidade e, também, para determinar a contaminação do lodo antes dele ser utilizado na agricultura.

A imunofluorescência direta, que utiliza anticorpos monoclonais marcados com substâncias fluorescentes, é uma técnica utilizada para detecção e quantificação de oocistos em lodo. O microrganismo de interesse é observado ao microscópio de epifluorescência e, através de suas características morfológicas, é detectado e quantificado. No entanto, algas, leveduras, partículas fluorescentes e outros contaminantes são comuns no lodo e interferem na detecção do microrganismo (ROSE et al., 1989). Em amostras de água, como forma de minimizar estas interferências, processos de purificação, como citometria de fluxo e separação imunomagnética, são empregados antes da identificação ao microscópio (FERRARI et al., 2000).

Pode-se concluir, com base nos estudos já realizados e aqui citados, que a detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais, incluindo o lodo de esgoto, deve associar diferentes procedimentos e técnicas, com o objetivo de aumentar a recuperação dos oocistos e, conseqüentemente, estabelecer uma metodologia sensível e específica para o monitoramento do referido parasita em resíduos sólidos de esgoto, higienizados ou não, antes da sua reciclagem agrícola.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo Geral

➤ Avaliar a metodologia da separação imunomagnética acoplada à imunofluorescência indireta para a detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em amostras de lodo, da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN) – Sistema Insular, do município de Florianópolis, SC.

II.2. Objetivos específicos

➤ Padronizar o método de concentração dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., através da sedimentação espontânea do lodo e centrifugação do sobrenadante obtido;

➤ Padronizar a técnica da separação imunomagnética (SIM) para detectar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em amostras de lodo;

➤ Padronizar a técnica da imunofluorescência indireta (IMF) para quantificar oocistos de *Cryptosporidium* spp., em amostras de lodo;

➤ Aplicar a metodologia da SIM-IMF, padronizada neste trabalho, para detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em amostras de campo de lodo;

➤ Aplicar a metodologia da SIM-IMF, de detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., para detectar e quantificar de cistos de *Giardia* spp., em amostras de campo de lodo;

➤ Pesquisar helmintos em amostras de campo de lodo;

➤ Avaliar a eficiência das técnicas empregadas através da comparação dos valores de recuperação obtidos neste trabalho com os valores descritos na literatura.

III. Materiais e Métodos

III.1. Materiais

III.1.1. Material de estudo

III.1.1.1. Amostra inicial para a padronização das metodologias

A amostra de lodo utilizada na padronização metodológica foi coletada na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN) – Sistema Insular, do município de Florianópolis, SC. A coleta foi realizada por um funcionário capacitado e em recipiente previamente autoclavado, com vedação adequada, diretamente da saída da esteira da prensa desaguadora.

A amostra foi armazenada sob refrigeração (8°C) no Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

III.1.1.2. Amostras de campo

As amostras de lodo foram coletadas no período de 11 a 31 de julho de 2002, pelo funcionário de plantão responsável pela operação da ETE da CASAN – Sistema Insular, do município de Florianópolis, SC, diretamente da saída da esteira da prensa desaguadora.

Foram realizadas 31 coletas, duas amostras por dia, quando possível. Uma coleta foi realizada no período matutino e outra no período noturno. As amostras foram coletadas em tubos de 50mL, devidamente esterilizados e etiquetados, e armazenadas sob refrigeração (8°C).

III.1.2. Controles positivos internos

III.1.2.1. Padrão LVA

Para os ensaios da padronização foi utilizado um controle interno positivo, preparado no Laboratório de Virologia Aplicada e denominado de Padrão LVA.

Uma suspensão de 50mL, de oocistos inativados de *Cryptosporidium* spp., com 10⁹ oocistos/mL, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Patógenos Ambientais da Macquarie University (Sydney - Austrália), sendo

diluída em tampão das pérolas magnéticas (TPM) até a obtenção de uma suspensão com 10^5 oocistos/mL. O Padrão LVA, por sua vez, com 10^2 oocistos/ $10\mu\text{L}$, foi obtido da diluição dessa suspensão.

Após as diluições, a concentração de oocistos do Padrão LVA foi confirmada pela contagem das referidas estruturas, depois de marcadas pela imunofluorescência indireta, a leitura das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus® BX-FLA 40, 400x filtro de barreira, de 515nm, conforme descrito no item III.2.3..

Para tal, foram preparadas três lâminas, sendo que cada uma delas foi examinada três vezes e, assim, o Padrão LVA foi obtido pela média aritmética das nove leituras.

III.1.2.2. Padrão ColorSeed®

Para o processamento das amostras de campo, foi adquirido um controle interno positivo denominado ColorSeed® (Biotechnology Frontiers Inc., Austrália). O ColorSeed® é uma suspensão de *Cryptosporidium parvum* e de *Giardia lamblia*, com concentração conhecida ($98\pm 1,5$ oocistos/ $1.636\mu\text{L} \pm 56\mu\text{L}$ e $98\pm 1,5$ cistos/ $1.636\mu\text{L} \pm 56\mu\text{L}$), contados por citometria de fluxo, previamente marcados com o corante Texas Red®. A introdução deste controle positivo comercial possibilitou a diferenciação entre o microorganismo semeado (controle interno positivo ColorSeed®) e o microorganismo da própria amostra. Os cistos e os oocistos pertencentes ao controle comercial apresentam-se corados de verde e vermelho, ao microscópio de epifluorescência, e os protozoários das amostras apresentam-se corados somente de verde.

III.1.3. Reagentes, materiais de consumo e equipamentos

III.1.3.1. Reagentes

√ Pérolas magnéticas Biomag® (Polysciences Inc., EUA) recobertas com anti-IgG;

√ Anticorpo monoclonal (Mab) CRY104 (gentilmente cedido pelo Dr. Graham Vesey, da Biotechnology Frontiers Inc., Austrália);

√ Anti-IgG de camundongo conjugada com isotiocianato de fluoresceína-FITC (Anti-mouse IgG, whole molecule, FITC conjugate, Antibody developed in sheep, Sigma, Alemanha);

√ Color Seed[®] (Biotechnology Frontiers Inc., Austrália);

√ Pre-Clear Beads[®] (Biotechnology Frontiers Inc., Austrália);

√ Solução aquosa de glicina 0,1M, pH=2,2 (Sigma, Alemanha);

√ Tampão das Pérolas Magnéticas/TPM (PBS, 1% BSA¹, 0,1% de SDS² e 0,05% de Azida Sódica³);

√ Meio de Montagem (50% glicerol⁴, 40% PBS, 5% NaCl⁵ 5M, 5% formalina⁶ e 2,5% DABCO⁷).

III.1.3.2. Materiais de consumo

√ Membranas Nuclepore[®]; 13mm; 0,8µm (Membrane Filtration Products, Whatman, USA);

√ Tubos plásticos de 6mL com tampa;

√ Tubos tipo Falcon de 50mL com tampa;

√ Pipetas Pasteur de vidro;

√ Lâminas para microscopia;

√ Lamínulas 20x20.

III.1.3.3. Equipamentos

√ Estantes de separação imunomagnética;

√ Agitador tipo Vortex (Quimis, Brasil);

√ Agitador orbital (Glas-Col[®], USA);

√ Bomba de vácuo;

√ Microscópio de epifluorescência (Olympus[®], BX-FLA 40);

√ Centrífuga de mesa refrigerada (ALC[®], PK, modelo 121R, Itália);

√ pHmetro (Digitec, Brasil);

√ Mesa de agitação (Elmeco, modelo RP-50, USA).

¹ Bovine Albumin Fraction V, Gibco, USA.

² Gibco, Brasil.

³ Sigma, USA.

⁴ Sigma, USA.

⁵ Gibco, Brasil.

⁶ Synth, Brasil.

⁷ 1,4-diazilbíciclo-2,2,2-octano (Sigma D2522).

III.2. Métodos

Antes de efetuar a padronização da técnica de SIM-IMF (item III.2.4.) para lodo, foi necessária a realização de alguns ensaios preliminares: a detecção de coccídios na amostra inicial (item III.2.1.), a sensibilização das Pérolas Magnéticas Biomag[®] com anticorpos monoclonais CRY 104 (item III.2.2.) e a marcação dos oocistos por imunofluorescência indireta (item III.2.3.).

III.2.1. Detecção de coccídios na amostra inicial

A amostra inicial de lodo, utilizada na padronização dos ensaios conforme descrito em III.1.1.1., foi uniformemente homogeneizada, para a retirada de sete alíquotas de aproximadamente 1,0g. Cada uma das alíquotas foi diluída em 2mL de solução fixadora SAF (Acetato de Sódio + Ácido Acético + Formaldeído) (DE CARLI, 2001). O material fixado foi utilizado para o preparo de lâminas com esfregaços de lodo. As lâminas foram enviadas para o Laboratório Médico Santa Luzia (LMSL), que gentilmente, realizou o método de Kinyoun modificado, conforme sugerido por De Carli (2001), para a pesquisa de coccídios. A leitura das lâminas foi realizada pela autora desta dissertação.

III.2.2. Sensibilização das Pérolas Magnéticas Biomag[®] com anticorpos monoclonais CRY104

Para a utilização das pérolas magnéticas Biomag[®] (Polysciences Inc., Warrington) na captura dos oocistos em amostras de lodo foi necessário realizar a sensibilização prévia das mesmas com anticorpos monoclonais CRY104. A sensibilização das pérolas consiste no acoplamento dos anticorpos contidos nos sobrenadantes celulares dos hibridomas, gentilmente, cedidos pelo Laboratório de Patógenos Ambientais da Macquarie University (Sidney-Austrália) às pérolas magnéticas Biomag[®], através de uma ligação covalente com um anticorpo anti-IgG, que reveste estas pérolas. Esse processo foi realizado da seguinte forma:

- 1 – Em um tubo de 15mL foi lavado, por duas vezes, 5mL de pérolas magnéticas em 5mL de tampão das pérolas magnéticas (TPM);
- 2 – Para a captura das pérolas, após a lavagem, colocou-se o tubo em contato com um magneto (ímã) por 1 min e desprezou-se o sobrenadante;
- 3 – Foi adicionado 5mL de sobrenadante celular dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais (Mab) CRY104 às pérolas lavadas;
- 4 – Incubou-se as pérolas com o sobrenadante por 14 a 16h em agitador orbital a temperatura de 8° C;
- 5 – Para a captura das pérolas magnéticas sensibilizadas, o tubo foi colocado novamente em contato com o magneto por 1 min;
- 6 – Descartou-se o sobrenadante por inversão;
- 7 – As pérolas sensibilizadas foram lavadas em 5mL de TPM;
- 8 – Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as pérolas em 5mL de TPM;
- 9 – As Pérolas Magnéticas Sensibilizadas (PMS) foram estocadas à temperatura de 8°C.

III.2.3. Marcação dos oocistos por imunofluorescência indireta

O método de marcação dos oocistos, utilizado na padronização metodológica e no processamento das amostras, foi o da imunofluorescência indireta. Neste método, os oocistos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais específicos CRY104 (Mab CRY104) que, por sua vez, se ligam a uma anti-IgG de camundongo conjugada à molécula de FITC, após sua adição (Figura 13).

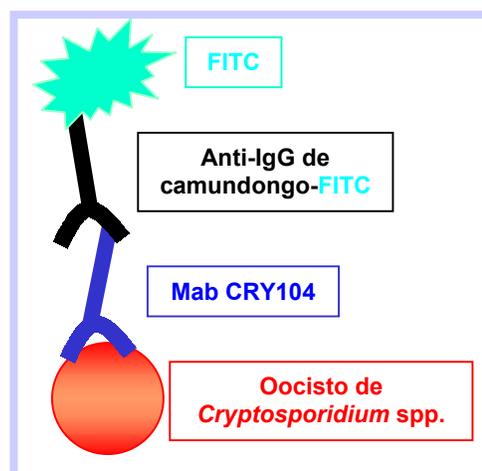


Figura 13: Esquema da marcação indireta pela imunofluorescência.
Fonte: Autora.

Os oocistos marcados com anticorpo CRY104 foram encubados com conjugado e a contagem foi realizada em microscopia de epifluorescência.

Esse processo foi realizado da seguinte forma:

- 1 – Foi filtrado em Membrana Nucleopore[®] 10 μ L do Padrão LVA;
- 2 - A Membrana Nucleopore[®] foi recoberta com 100 μ L de sobrenadante celular com Mab CRY104, sendo incubada por 5min, para favorecer a ligação do anticorpo monoclonal específico com os oocistos aderidos na membrana;
- 3 – Lavou-se a membrana com 500 μ L de TPM para remover os anticorpos não ligados;
- 4 – Recobriu-se novamente a membrana com 100 μ L de anti-IgG de camundongo conjugados a FITC;
- 5 – Lavou-se a membrana com 500 μ L de TPM, para retirar o excesso de anti-anticorpos conjugados;
- 6 - A membrana foi fixada a uma lâmina com o auxílio do Meio de Montagem sendo coberta com lamínula;
- 7 - A lâmina para a detecção e quantificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi analisada em microscopia de epifluorescência, Olympus[®] BX-FLA 40, 400x filtro de barreira, de 515nm para leitura da marcação com FITC.

III.2.4. Padronização das metodologias de detecção e quantificação de oocistos em lodo

A metodologia inicialmente utilizada para as primeiras análises foi aquela padronizada para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia*, em amostras de fezes humanas (SOUZA, 2002).

A partir dos resultados obtidos com a utilização dessa metodologia, algumas alterações foram introduzidas com a finalidade de adaptá-la à amostra de lodo, usada para esta padronização, que originou a metodologia final, posteriormente utilizada para a análise das amostras de campo de lodo (Protocolo Final – Lodo; item III.2.4.12.).

A metodologia usada por Souza (2002), por sua vez, é uma adaptação do protocolo de concentração, detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de lodo, oriundas das Lagoas de Estabilização de Joinville (CASAN). Por sua vez, esse experimento piloto foi uma adaptação do protocolo de detecção e quantificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., em amostras de água de piscina, desenvolvido por Greinert (2002), com base na metodologia preconizada pela Biotechnology Frontiers Inc. (Austrália) (Figura 14).

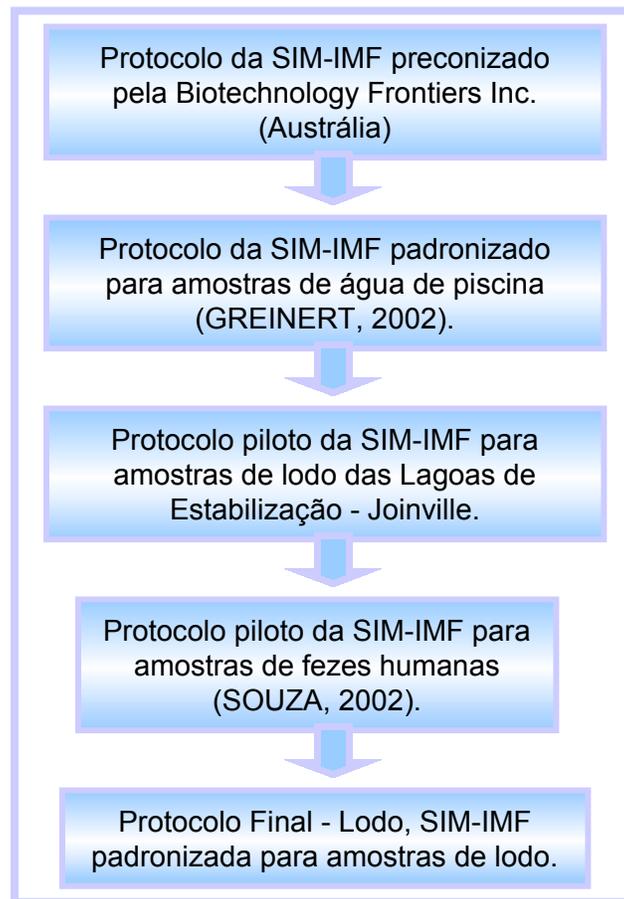


Figura 14: Fluxograma da origem do protocolo de SIM-IMF para amostras de lodo.

III.2.4.1. Seleção do volume adequado a ser usado no processo inicial de sedimentação do lodo no tampão das pérolas magnéticas

Seguindo o protocolo para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia* em amostras de fezes humanas, previamente desenvolvido por Souza

(2002), a amostra de lodo foi também submetida a um processo inicial de sedimentação, antes da realização da separação imunomagnética (SIM) acoplada à imunofluorescência indireta (IMF).

Diversas quantidades de lodo (0,5g; 1,0g; 1,5g; 2,0g; 2,5g; 3,0g; 3,5g e 4,0g) foram pesadas em balança analítica e transferidas para tubos de 15mL. Adicionou-se ao mesmo TPM, tampão usado no procedimento de sensibilização das pérolas magnéticas (item III.2.2.), até completar o volume para 14mL. As amostras foram agitadas em agitador tipo vortex até completa homogeneização e dissolução dos flocos de lodo. Para aguardar a sedimentação do lodo, os tubos foram deixados em repouso na bancada por 40min. Os diferentes volumes de sobrenadante obtidos foram transferidos para tubos de 6mL, para serem posteriormente submetidos à SIM-IMF.

O mesmo procedimento, acima descrito, foi realizado com as mesmas quantidades de lodo, que foram transferidas para tubos de 50mL. Adicionou-se o mesmo tampão até a marca de 48mL. Os tubos foram deixados em repouso na bancada, por 40min, para sedimentação. Após a sedimentação do lodo, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 50mL, e foram submetidos à SIM-IMF.

Neste experimento, avaliou-se quais seriam os melhores tubos (15mL e 6mL/50mL e 50mL) para se processar a SIM. Como controle positivo, foram semeados, em cada amostra testada, 10 μ L de Padrão LVA.

III.2.4.2. Determinação da quantidade de lodo a ser processada

A quantidade de lodo, usada no processo inicial de sedimentação, influencia diretamente no volume de sobrenadante formado, que será posteriormente submetido à SIM-IMF e, conseqüentemente, no percentual de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. a partir das amostras analisadas.

Pesou-se 1,0g, 2,0g e 3,0g de lodo em balança analítica. O lodo foi transferido para tubo de 15mL onde adicionou-se o tampão TPM até a marca de 14mL. As amostras foram agitadas em agitador tipo vortex até completa

homogeneização. As amostras foram deixadas em repouso, por 40min, para sedimentação das partículas maiores de lodo. Após o repouso, 5mL de cada sobrenadante foram transferidos para tubos de 6mL, que foram submetidos à SIM-IMF.

O experimento foi realizado com inclusão do controle interno positivo Padrão LVA (10 μ L), em triplicata.

III.2.4.3. Inclusão da pré-lavagem do sobrenadante

Para a pré-lavagem do sobrenadante, utilizou-se 200 μ L de Pérolas Magnéticas Pré-Clear Beads[®], previamente agitadas em agitador tipo vortex. A amostra foi incubada por 15min, em agitador orbital, para proporcionar a captura de partículas magnéticas e outros interferentes. O tubo com a amostra foi colocado em contato com um magneto (ímã) na estante magnética para capturar as pérolas magnéticas agora aderidas aos interferentes. O sobrenadante livre dos interferentes foi transferido para um novo tubo de 6mL para somente, então, ser processado.

III.2.4.4. Adequação de parâmetros relativos à amostra

Nesta fase da padronização, o protocolo para detecção e quantificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia* em fezes (SOUZA, 2002) foi adequado para as amostras de lodo, principalmente, na etapa da imunofluorescência indireta, com alteração dos volumes do sobrenadante celular com anticorpo monoclonal CRY104 e do volume do anti-IgG de camundongo acoplado ao FITC (título 1:100).

Alterou-se, também, o tempo de incubação do sobrenadante com as Pérolas Magnéticas Sensibilizadas (PMS), objetivando favorecer a formação do complexo pérola-ocisto.

III.2.4.5. Seleção do processo para quebra do floco de lodo

Os flocos de lodo são gelatinosos e os oocistos de *Cryptosporidium* spp. aderem em sua superfície e em seu interior. O processo de homogeneização

do lodo por agitação em agitador tipo vortex não foi suficiente para propiciar a quebra do floco e a conseqüente liberação dos oocistos para o sobrenadante, que será processado.

Os flocos de lodo, foram quebrados através da peneiração em peneira descartável de malha fina. Amostras de 1,0g de lodo peneirado foram transferidas para tubos de 15mL, onde foi adicionado tampão TPM até a marca de 14mL do tubo. Procedeu-se a agitação, em agitador tipo vortex, até a completa homogeneização do lodo peneirado no tampão TPM. As amostras foram deixadas sedimentando espontaneamente na bancada, por 40min. Em seguida processou-se a SIM-IMF.

O esmagamento do floco de lodo em cadinho de porcelana com pistilo foi outro processo testado, objetivando liberar os oocistos dos flocos. Amostras de 1,0g de lodo esmagado foram transferidas para tubos de 15mL, onde foi adicionado tampão TPM até a marca de 14mL do tubo. Procedeu-se a agitação, em agitador tipo vortex, na tentativa de se homogeneizar o lodo esmagado no tampão TPM. As amostras foram deixadas sedimentando espontaneamente na bancada, por 40min. Em seguida processou-se a SIM-IMF.

III.2.4.6. Escolha do processo de semeadura do Padrão LVA

Para a observação das possíveis perdas de oocistos durante o processo de pré-tratamento por sedimentação, 10 μ L do Padrão LVA foram semeados em cinco diferentes momentos do processo.

Foram pesadas 15 alíquotas de 1,0g de lodo, que foram separadas em cinco grupos, com três alíquotas em cada grupo.

O Padrão LVA foi semeado em diferentes etapas, conforme a separação das amostras em grupos, abaixo descrita:

Grupo 1 – 1,0g de lodo foi transferido para um tubo de 15mL. Semeou-se 10 μ L de Padrão LVA, adicionou-se 2mL de tampão TPM e agitou-se em agitador tipo vortex. Completou-se o volume até a marca de 14mL com tampão

TPM. A amostra foi homogeneizada, delicadamente, por inversão, e deixada em repouso na bancada por 40min para sedimentar.

Grupo 2 – 1,0g de lodo foi transferido para um tubo de 15mL e semeou-se 10 μ L do Padrão LVA, completou-se o volume até a marca de 14mL com tampão TPM. A amostra foi homogeneizada, delicadamente, por inversão, e deixada em repouso na bancada por 40min para sedimentar.

Grupo 3 – 1,0g de lodo foi transferido para um tubo de 15mL, adicionou-se 2mL de tampão e agitou-se em agitador tipo vortex, completou-se o volume com tampão TPM até a marca de 14mL e semeou-se 10 μ L de Padrão LVA. A amostra foi, delicadamente, homogeneizada, por inversão, e deixada em repouso na bancada por 40min para sedimentar.

Grupo 4 – 1,0g de lodo foi transferido para um tubo de 15mL adicionou-se 2mL de tampão e agitou-se a amostra em agitador tipo vortex, semeou-se 10 μ L de Padrão LVA, agitou-se novamente em agitador tipo vortex e completou-se o volume até a marca de 14mL, com TPM. A amostra foi homogeneizada, delicadamente, por inversão, e deixada em repouso na bancada por 40min para sedimentar.

Grupo 5 – 1,0g de lodo foi transferido para um tubo de 15mL, completou-se o volume até a marca de 14mL com tampão, agitou-se em agitador tipo vortex e semeou-se 10 μ L de Padrão LVA. A amostra foi, delicadamente, homogeneizada, por inversão, e deixada em repouso na bancada por 40min para sedimentar.

III.2.4.7. Determinação do volume de sobrenadante

Com o objetivo de aumentar o percentual de recuperação dos oocistos, juntamente com o experimento anterior, foi testada a possibilidade de se usar todo o sobrenadante formado durante a sedimentação, e não apenas 5mL.

O lodo previamente peneirado foi pesado, transferido para um tubo de 15mL, onde foi adicionado tampão (até a marca de 14mL) e agitado em agitador tipo vortex. Semeou-se 10 μ L de Padrão LVA. A amostra foi homogeneizada, delicadamente, por inversão, e deixada em repouso na bancada por 40min para sedimentar.

A parte superior do sobrenadante foi transferido para o tubo 1 e o restante do sobrenadante foi transferido para o tubo 2, e os dois tubos foram processados. Cada tubo originou uma lâmina, que foi examinada ao microscópio de epifluorescência (Figura 15).

O número de oocistos da lâmina correspondente ao tubo 1 somado ao número de oocistos da lâmina correspondente ao tubo 2 resultou no número total de oocistos presentes em cada uma das amostras analisadas. A inclusão dos tubos 1 e 2 foi realizada com o intuito de aumentar o percentual de recuperação dos oocistos do sobrenadante.

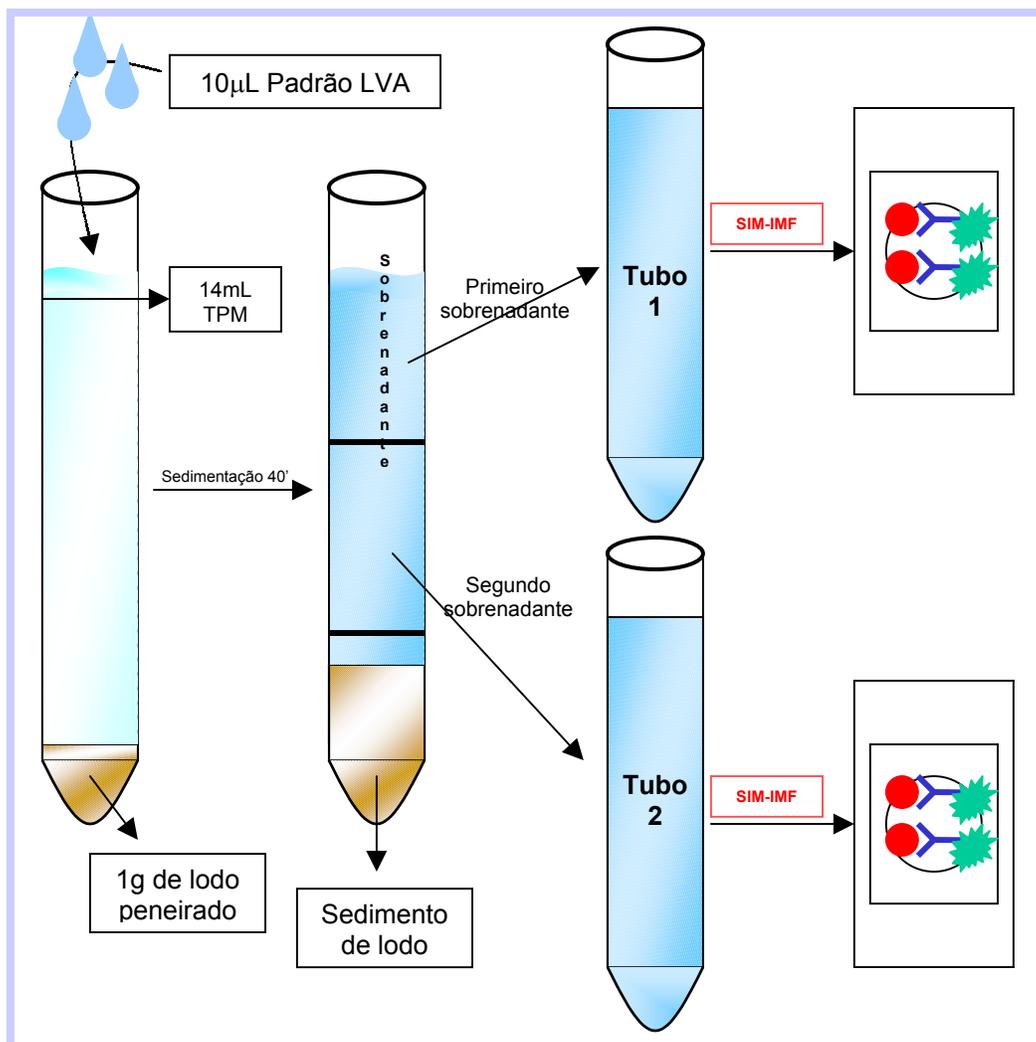


Figura 15: Esquema do aproveitamento de todo o volume de sobrenadante formado para a realização da separação imunomagnética acoplada à imunofluorescência indireta. **Fonte:** Autora.

III.2.4.8. Definição do tempo de sedimentação do lodo

As partículas de lodo formadas depois do processo de peneiração dissolvem com maior facilidade no tampão TPM e precipitam com maior velocidade.

Tempos de sedimentação altos favorecem a decantação dos oocistos juntamente com as partículas de lodo. Tempos menores de sedimentação favorecem a permanência dos oocistos no sobrenadante e, conseqüentemente, o aumento do percentual de recuperação.

O lodo peneirado foi pesado (1,0g) e dividido em 12 alíquotas que foram separadas em quatro grupos distintos, compostos por três alíquotas cada. Depois da transferência do lodo para tubos de 15mL, completou-se com tampão TPM o volume para 14mL, agitou-se vigorosamente em agitador tipo vortex e semeou-se 10 μ L do Padrão LVA. As amostras foram homogeneizadas, delicadamente, por inversão, e deixadas em repouso na bancada para a sedimentação.

As amostras do grupo 1 foram deixadas em repouso para sedimentação por 10min, as de grupo 2 por 20min, as do grupo 3 por 30min e, as pertencentes ao quatro por 40min.

O volume total de sobrenadante, formado pela sedimentação de cada uma das amostras, nos diferentes tempos testados (10, 20, 30 e 40min) foi submetido ao protocolo habitual.

III.2.4.9. Inclusão da etapa de centrifugação do sobrenadante

O experimento para a inclusão da centrifugação do sobrenadante na padronização da técnica (Figura 16) foi conduzida da seguinte maneira: do lodo peneirado foram pesadas seis alíquotas de 1,0g. As alíquotas foram divididas em dois grupos, cada grupo com três amostras.

O primeiro grupo foi denominado de grupo Controle e o segundo grupo foi denominado de grupo Teste. As amostras do grupo Controle foram transferidas para tubos de 15mL, onde receberam tampão TPM (até a marca de 14mL), foram agitadas em agitador tipo vortex, receberam 10 μ L de Padrão

LVA, foram homogeneizadas por inversão e sedimentadas por 20min. O volume total de sobrenadante formado foi transferido equivalentemente para os tubos 1 e 2 e submetidos à SIM-IMF.

As amostras do grupo Teste foram também transferidas para tubos de 15mL, receberam tampão TPM (até o volume de 14mL), foram agitadas em agitador tipo vortex, receberam 10 μ L de Padrão LVA e foram homogeneizadas por inversão e sedimentadas também por 20min. Todo o volume de sobrenadante formado foi transferido para outro tubo de 15mL, que foi centrifugado por 15min a 666.66Xg, à temperatura ambiente. Depois da centrifugação, a parte superior do sobrenadante foi transferida para um tubo de 6mL (denominado de tubo A). O sedimento formado e o sobrenadante restante (aproximadamente 5mL) foram transferidos para outro tubo de 6mL (tubo B).

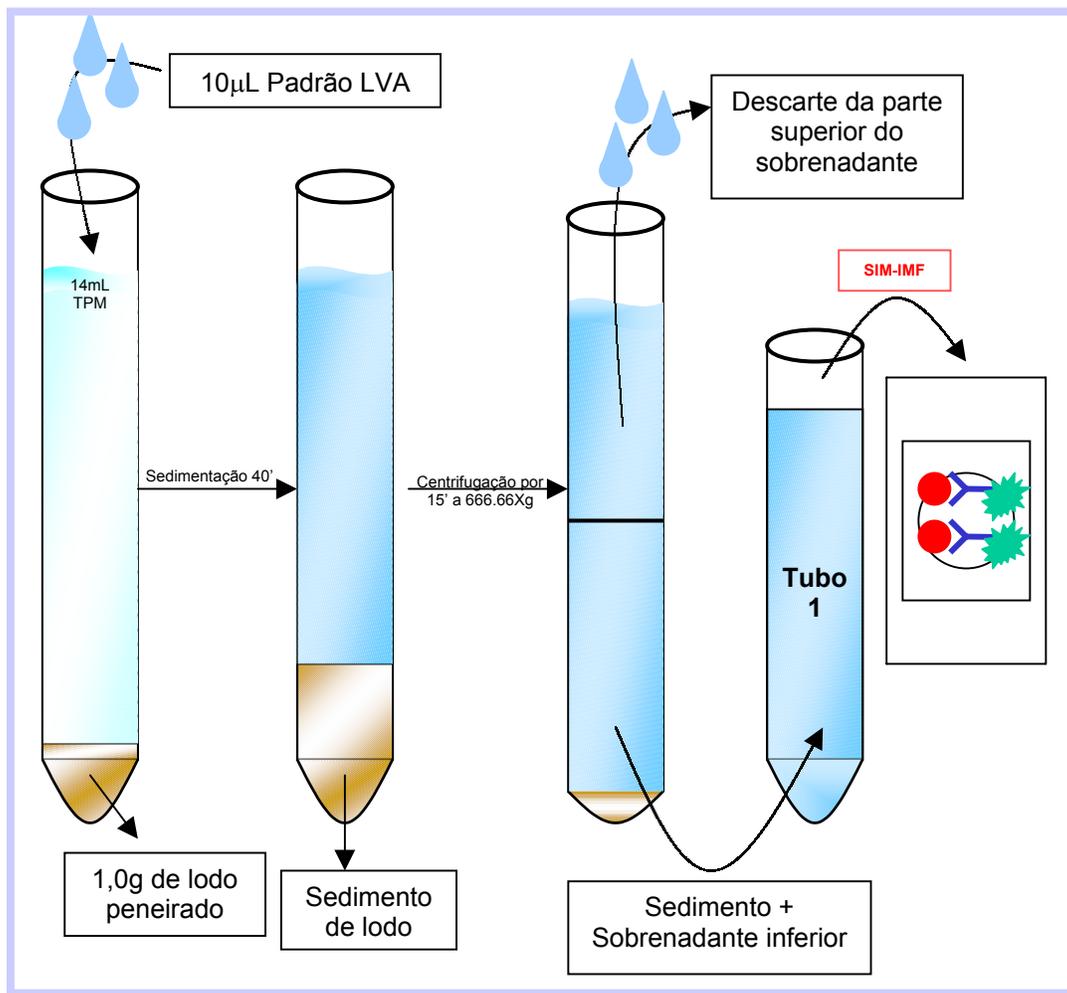


Figura 16: Tratamento inicial da amostra por sedimentação do lodo, seguida de centrifugação do sobrenadante. **Fonte:** Autora.

Os sobrenadantes do tubo A foram submetidos à SIM-IMF, com a finalidade de averiguar uma possível perda de oocistos.

A detecção e a quantificação dos oocistos pela SIM-IMF foi realizada nos dois tubos (A e B), das três amostras deste grupo.

Os resultados dos dois grupos foram confrontados estatisticamente.

III.2.4.10. Ressuspensão do sedimento formado no processo inicial de sedimentação

O processo de sedimentação espontânea das partículas de lodo durante o processo inicial de sedimentação, ao qual as amostras são submetidas, pode arrastar alguns oocistos para o fundo do tubo, onde ficam aderidos ao sedimento formado.

A ressuspensão do sedimento formado com tampão TPM libera os oocistos para o novo sobrenadante, que se forma depois de uma segunda sedimentação de 20min. Este experimento foi realizado também com o objetivo de aumentar o percentual de recuperação dos oocistos.

O tempo e a velocidade de centrifugação foram alterados para garantir a total sedimentação dos oocistos do sobrenadante.

Os resultados deste experimento foram confrontados estatisticamente com os resultados do experimento anterior, quando a amostra foi submetida a apenas uma sedimentação.

Uma segunda ressuspensão e, conseqüentemente, uma terceira sedimentação do lodo também foram testadas para averiguar quantos oocistos restavam ainda presos ao sedimento.

Com a inclusão de uma segunda sedimentação no processo inicial que antecede à SIM-IMF, ocorreu a formação de um segundo sobrenadante, armazenado no tubo denominado de B.

III.2.4.11. Redução do volume de sobrenadante a ser processado

Este experimento teve como objetivo diminuir o custo da técnica por amostra, reduzindo a quantidade de sobrenadante e, conseqüentemente, o número de tubos a serem processados.

O lodo peneirado foi pesado em alíquotas de 1,0g, que foram transferidas para tubos de 15mL, onde se processou a primeira sedimentação. O sobrenadante formado foi transferido para outro tubo de 15mL (tubo 1) sendo armazenado em estante. O sedimento foi ressuspensão em tampão TPM e sedimentado pela segunda vez, por mais 20min. O segundo sobrenadante obtido foi também transferido para um tubo de 15mL (tubo 2). Os dois tubos, da primeira e da segunda sedimentação, respectivamente, foram centrifugados, a 1.000Xg, por 30min. A parte superior dos sobrenadantes foram transferidas para tubos de 6mL (1A e 2A), sendo submetidos à SIM-IMF, apenas com o intuito de confirmar a negatividade.

Os sedimentos e o restante dos sobrenadantes (aproximadamente 2,0mL de cada tubo) foram transferidos para um único tubo de 6mL, denominado de tubo Controle, sendo também submetidos à SIM-IMF.

O experimento foi realizado com inclusão de 10 μ L de controle positivo interno Padrão LVA. Os resultados foram confrontados estatisticamente com os resultados do experimento anterior, que fazia uso de dois tubos (A e B) para o processamento da amostra.

III.2.4.12. Protocolo Final – Lodo

A padronização realizada (itens III.2.4.1. a III.2.4.11.) gerou, então, o protocolo final, que foi usado para avaliar as amostras de campo (item III.2.6.1.).

Protocolo Final – Lodo

A – Tratamento inicial da amostra de lodo, seguida da centrifugação do sobrenadante

1 – Pesou-se 1g de lodo, em balança analítica;

- 2 – Transferiu-se o material pesado para um tubo de 15mL;
- 3 – Adicionou-se tampão TPM até a marca de 14mL do tubo;
- 4 – A amostra foi agitada, em agitador tipo vortex, até a homogeneização do lodo com o tampão TPM;
- 5 – Foi semeado o controle positivo interno (10 μ L de Padrão LVA ou 1.636 μ L \pm 56 μ L de ColorSeed[®]);
- 6 – Homogeneizou-se a amostra delicadamente por inversão;
- 7 – Deixou-se a amostra em repouso por 20min (primeira sedimentação das partículas pesadas de lodo);
- 8 – Com auxílio de uma pipeta Pasteur, o sobrenadante formado pela primeira sedimentação (primeiro sobrenadante) foi transferido para um tubo de 15mL (tubo 1) e deixado aguardando na bancada;
- 9 – Ao sedimento, adicionou-se tampão TPM até a marca de 14mL do tubo;
- 10 – Homogeneizou-se o conteúdo por inversão (10 vezes) delicadamente;
- 11 – Deixou-se em repouso na bancada, para sedimentação por mais 20min (segunda sedimentação);
- 12 – Transferiu-se o sobrenadante formado pela segunda sedimentação (segundo sobrenadante) para outro tubo de 15mL (tubo 2), com auxílio de uma pipeta Pasteur;
- 13 – Centrifugou-se os tubos 1 e 2, por 30min a 1.000Xg em temperatura ambiente;
- 14 – As partes superiores dos sobrenadantes formados nos tubos 1 e 2, após a centrifugação foram descartados;
- 15 – Transferiu-se os sedimentos e o restante dos sobrenadantes formados (aproximadamente 2,0mL) dos tubos 1 e 2 para o tubo Controle de 6mL;
- 16 – Submeteu-se o tubo Controle a SIM-IMF.

B – SIM-IMF

- 1 – Ao sobrenadante do tubo Controle A adicionou-se 200 μ L de pérolas Pré-Clear Beads[®], que foram agitadas em agitador tipo vortex;
- 2 – Colocou-se o tubo em agitador orbital por 15min;
- 3 – Após este período o tubo Controle A foi colocado na estante magnética e esta sobre a mesa de agitação por 15min;
- 4 – Sem retirar-se o tubo da estante magnética, o sobrenadante foi removido para um novo tubo (tubo B);
- 5 – Ao sobrenadante do tubo B, livre dos interferentes pela pré-lavagem, foi adicionado 200 μ L de Pérolas Magnéticas Sensibilizadas (PMS) com Mab CRY104;
- 6 – O sobrenadante foi agitado em agitador tipo vortex por 1min;
- 7 – Colocou-se o tubo B no agitador orbital por 40min, afim de propiciar a captura dos oocistos pelos anticorpos monoclonais acoplados às Pérolas Magnéticas;
- 8 – Decorrido o tempo de incubação, colocou-se o tubo B na estante magnética e esta sobre a mesa de agitação por 20min, para a captura das PMS agora aderidas aos oocistos;
- 9 – Sem retirar o tubo da estante magnética, removeu-se o sobrenadante para outro tubo (tubo C);
- 10 – Recolocou-se o sobrenadante (tubo C) na estante magnética sobre a mesa de agitação, por mais 10min, para garantir a captura das PMS com oocistos e garantir que não sejam descartadas com o sobrenadante;
- 11 – Sem retirar o tubo C da estante magnética, com auxílio de uma pipeta Pasteur, descartou-se o sobrenadante;
- 12 – Ao tubo C foi adicionado 4mL de tampão TPM para ressuspender as PMS com oocistos em agitador tipo vortex;
- 13 – Transferiu-se o conteúdo do tubo C para o tubo B;
- 14 – Vortexou-se o tubo B para a homogeneização do tampão TPM com as pérolas anteriormente capturadas;

15 – Colocou-se o tubo B na estante magnética sobre a mesa de agitação, por 15min, para nova captura das PMS com Mab CRY104 ligadas aos oocistos;

16 – O sobrenadante do tubo B foi descartado sem ser retirado da estante magnética;

17 – A este tubo adicionou-se 4mL de glicina 0,1M (pH=2,2);

18 – Agitou-se em agitador tipo Vortex por 2min;

19 – Colocou-se o tubo B no agitador orbital por 15min;

Obs.: Esta etapa é denominada de dissociação ácida, que consiste no desligamento dos anticorpos monoclonais CRY104 (acoplados às Pérolas Magnéticas) dos oocistos. A agitação vigorosa em agitador tipo vortex e o baixo pH da glicina favorecem a quebra da ligação covalente que se estabelece entre os oocistos de *Cryptosporidium* spp. e os anticorpos monoclonais específicos (Mab CRY104) ligados às Pérolas Magnéticas.

20 – Colocou-se a estante magnética, com o tubo B, sobre a mesa de agitação por 5min, para a captura das Pérolas Magnéticas agora desligadas dos oocistos;

21 – Sem retirar o tubo B da estante magnética o sobrenadante, que contém os oocistos livres em suspensão, foi filtrado em Membrana Nucleopore[®];

22 – A Membrana Nucleopore[®], que contém os oocistos fixados, foi lavada com 500 μ L de TPM.

C – Preparação das amostras para detecção e quantificação por Imunofluorescência Indireta (IMF)

1 – Recobriu-se a Membrana Nucleopore[®] com 100 μ L de sobrenadante celular com Mab CRY104;

2 – Deixou-se incubando por 5min, para favorecer a ligação do anticorpo monoclonal específico com os oocistos aderidos na membrana;

3 – Lavou-se a membrana com 500 μ L de tampão TPM para remover os anticorpos não ligados;

4 – Recobriu-se novamente a membrana com 100 μ L de anti-IgG de camundongo acoplado a molécula de FITC;

5 – A membrana foi lavada com 500 μ L de tampão TPM, para retirar o excesso de anti-anticorpos e de isotiocianato de fluoresceína.

D - Montagem da lâmina para leitura em microscopia de epifluorescência

1 – Retirou-se a membrana cuidadosamente do filtro;

2 – Fixou-se a membrana sobre a lâmina com auxílio de 8 μ L de Meio de Montagem;

3 – Recobriu-se a Membrana Nucleopore[®] com lamínula;

4 – Procedeu-se a leitura da lâmina para a detecção e quantificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em microscopia de epifluorescência, Olympus[®] BX-FLA 40, 400x filtro de barreira, de 515nm para leitura da marcação com FITC (oocisto com coloração verde).

III.2.5. Análise estatística

Os resultados de percentagem média de recuperação de oocistos dos diferentes experimentos, conduzidos com a amostra inicial de lodo, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e, quando foi detectada diferença significativa entre as médias, ao teste de separação de médias (Teste de Tukey a 5%), segundo as recomendações de Sokal & Rohlf (1995) e Centeno (1999).

Todos os experimentos realizados durante a padronização das metodologias que conduziram ao Protocolo Final – Lodo (item III.2.4.12.) foram realizadas em triplicata.

III.2.6. Processamento e análise das amostras de campo de lodo

III.2.6.1. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Todas as amostras foram, individualmente, homogeneizadas e peneiradas. Pesou-se 1,0g de cada amostra, que foi transferido para tubos de 15mL e numerados de acordo com a data de coleta (Tabela 1).

Das 31 amostras coletadas, 27 foram analisadas para detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., seguindo o Protocolo Final – Lodo (item III.2.4.12.). Após a aquisição dos controles positivos internos (ColorSeed[®]), o Padrão LVA foi substituído.

Tabela 1: Dados sobre a coleta e numeração dada às amostras de lodo.

Nº da Amostra	Data	Dia da Semana	Período de Coleta	Nº da Amostra	Data	Dia da Semana	Período de Coleta
1	11/07	Quinta-feira	Matutino	17	22/07	Segunda-feira	Matutino
2	11/07	Quinta-feira	Noturno	18	22/07	Segunda-feira	Noturno
3	12/07	Sexta-feira	Matutino	19	23/07	Terça-feira	Matutino
4	12/07	Sexta-feira	Noturno	20	23/07	Terça-feira	Noturno
5	13/07	Sábado	Matutino	21	24/07	Quarta-feira	Matutino
6	13/07	Sábado	Noturno	22	24/07	Quarta-feira	Noturno
7	15/07	Segunda-feira	Matutino	24	26/07	Sexta-feira	Matutino
8	15/07	Segunda-feira	Noturno	25	26/07	Sexta-feira	Noturno
9	16/07	Terça-feira	Matutino	27	28/07	Domingo	Matutino
10	16/07	Terça-feira	Noturno	30	31/07	Quarta-feira	Matutino
11	17/07	Quarta-feira	Matutino	31	31/07	Quarta-feira	Noturno
12	17/07	Quarta-feira	Noturno				
13	18/07	Quinta-feira	Matutino				
14	18/07	Quinta-feira	Noturno				
15	19/07	Sexta-feira	Matutino				
16	19/07	Sexta-feira	Noturno				

III.2.6.2. Pesquisa de cistos de *Giardia* spp.

Apenas oito amostras foram analisadas para a detecção e quantificação de *Giardia* spp., seguindo o mesmo protocolo. Após a aquisição dos controles positivos internos (ColorSeed[®]), o Padrão LVA foi substituído.

III.2.6.3. Pesquisa de helmintos

A pesquisa de ovos e larvas de helmintos foi realizada através da microscopia de uma lâmina de cada amostra, preparada após a realização da técnica de Ritchie (centrífugo-sedimentação pelo formaldeído-acetato de etila), conforme proposto por De Carli (2001).

IV. Resultados e Discussão

IV.1. Padronização das metodologias de detecção e quantificação de oocistos em lodo

Na padronização das metodologias de sedimentação espontânea do lodo, de centrifugação dos sobrenadantes formados após a sedimentação do lodo, da separação imunomagnética (SIM) e da imunofluorescência indireta (IMF), foram analisados os principais fatores que poderiam interferir nos percentuais de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Assim, as técnicas foram inicialmente realizadas com uma amostra de lodo negativa para coccídios pela coloração de Kinyoun modificado (item III.2.1.), e foram, posteriormente, aplicadas na análise das amostras de campo de lodo, provenientes da esteira da prensa desaguadora da ETE da CASAN – Sistema Insular, coletadas de 11/07/2002 a 31/07/2002.

IV.1.1. Seleção do volume adequado a ser usado no processo inicial de sedimentação do lodo no tampão das pérolas magnéticas

Conforme observado na Tabela 2, as porcentagens de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., nas diferentes quantidades de lodo testadas pela combinação das técnicas de SIM-IMF, em tubos de 50mL, foram nulas. Quando as amostras, nas mesmas quantidades, foram sedimentadas em tubos de 15mL e a SIM foi processada em tubos de 6mL, as porcentagens de recuperação variaram de 0,81% a 21,9%.

Tabela 2. Porcentagens de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., através da combinação das técnicas de SIM-IMF, após sedimentação espontânea do lodo, em dois tubos de volumes diferentes, com diversas quantidades de lodo da ETE da CASAN - Sistema Insular, Florianópolis, SC.

Massa (g)	Porcentagens de recuperação (%)	
	Tubos de 50mL	Tubos de 15mL
0,5	0	16,50
1,0	0	21,90
1,5	0	9,75
2,0	0	4,87
2,5	0	0,81
3,0	0	1,62
3,5	0	2,49
4,0	0	2,44

A sedimentação do lodo em tubo de 50mL foi rejeitada por diversos fatores, dentre eles destacam-se:

- formação de grande volume de espuma durante a agitação da amostra em TPM;
- o campo magnético gerado pelo ímã não foi suficientemente forte para capturar as pérolas magnéticas e, conseqüentemente, os oocistos ficaram em suspensão nos sobrenadantes formados nestes tubos;
- o maior tamanho do recipiente usado para a sedimentação gerou maior superfície de contato entre as pérolas magnéticas sensibilizadas e os oocistos, que ficaram aderidos às paredes do tubo, acarretando perdas;
- impossibilidade de trabalhar com mais de duas amostras por ímã;
- a dificuldade de manusear os tubos e o ímã não permite a captura eficiente das pérolas magnéticas, quando este fica mal acoplado aos tubos,
- ausência de estante magnética para processar a SIM com tubos de 50mL.

Optou-se, então, por trabalhar com tubos de 15mL para a sedimentação espontânea do lodo, por ser técnica e economicamente mais vantajoso (usando menor volume de TPM e de pérolas magnéticas para a pré-lavagem); por formar menos espuma durante o processo de homogeneização; por permitir trabalhar com maior número de amostras (quatro amostras em cada estante magnética) (Figura 17); por não haver necessidade de se trabalhar fora da estante magnética, o que poderia acarretar em acidentes e perda de pérolas magnéticas e de oocistos; e por ter apresentado percentuais de recuperação de oocistos com valores numéricos significativos, quando comparado com a recuperação nula de oocistos em amostras sedimentadas e processadas em tubos de 50mL (Tabela 2).

Observou-se que, quanto maior o volume de lodo submetido à sedimentação maior volume de sedimento se forma, conseqüentemente, diminuindo o volume de sobrenadante formado. Assim, a quantidade de sobrenadante formado após sedimentação é inversamente proporcional ao volume de lodo submetido à sedimentação espontânea (Figura 18). Isto explica as menores percentagens de recuperação de oocistos conforme, aumenta-se o volume de lodo a ser sedimentado nos tubos de 15mL (Tabela 2), pois esse grande volume de precipitado dificulta o processamento da amostra durante a separação imunomagnética.

Ao final destas análises foi possível concluir que o uso de tubos de 15mL para a pré-limpeza das amostras por sedimentação espontânea do lodo, em conjunto com o uso de tubos de 6mL para armazenar os sobrenadantes obtidos e processar a SIM, melhora significativamente a recuperação dos oocistos nas amostras de lodo e mostrou-se técnica e economicamente mais vantajoso.

O tratamento inicial das amostras de lodo por sedimentação espontânea mostrou-se eficiente, propiciando sobrenadantes límpidos, livres de interferentes e com oocistos em suspensão.



Figura 17: Estante magnética com quatro tubos de 6mL contendo, sobrenadantes de amostras de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis, usados para processamento da separação imunomagnética.

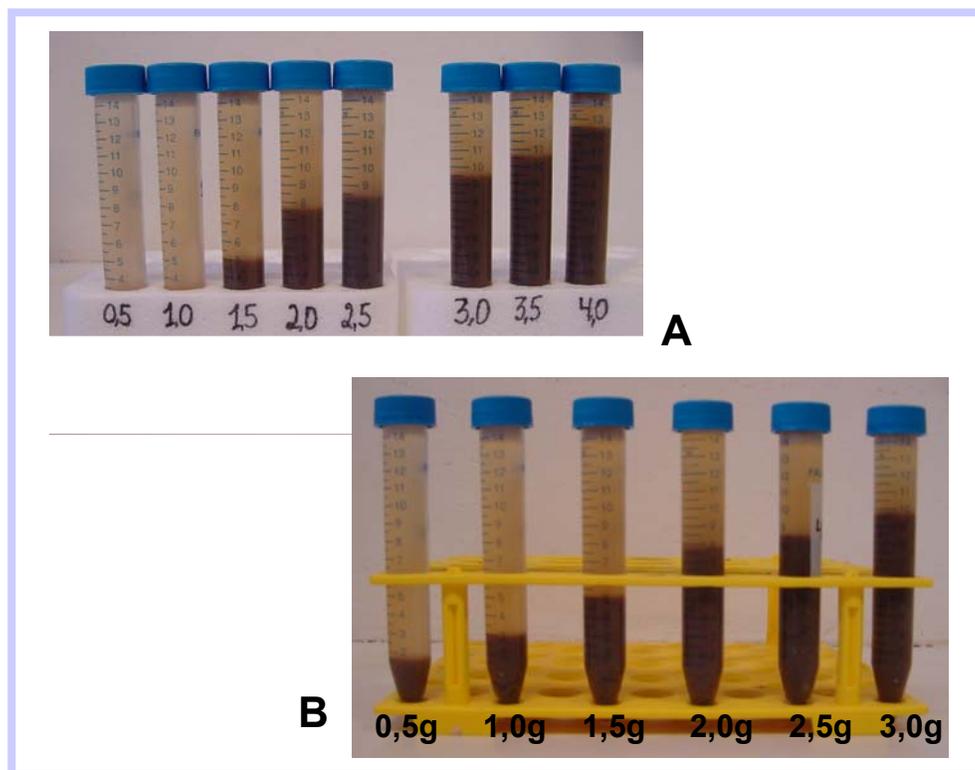


Figura 18: A – Diferentes volumes de sobrenadantes após a sedimentação espontânea de diferentes quantidades de lodo; B – Comparação entre as quantidades de sedimento e os volumes de sobrenadante formados, após a sedimentação de amostras de lodo.

IV.1.2. Determinação da quantidade de lodo a ser processada

Conforme observado na Tabela 3, a recuperação média de oocistos obtida na amostra com peso igual a 1,0g foi aproximadamente 46,85%, sendo

percentualmente superior à recuperação de oocistos nas amostras de 2,0g (10,47%) e 3,0g (3,04%). A média de recuperação \pm desvio padrão aumentou de $3,04 \pm 2,92$ para $46,85 \pm 8,06$ ($n=3$), quando testou-se 3,0g e 1,0g respectivamente (tabela 3), indicando que a quantidade de amostra era uma das principais fontes de perda, durante o processo de sedimentação do lodo. Este resultado justifica o uso de apenas 1,0g de lodo para o processamento das amostras.

Tabela 3. Porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., pela combinação das técnicas de SIM-IMF, após sedimentação espontânea de lodo, usando-se três diferentes quantidades de lodo.

Quantidade (g)	Porcentagens médias de recuperação (%) \pm S (n=3)
1,0	$46,85 \pm 8,06$
2,0	$10,47 \pm 7,79$
3,0	$3,04 \pm 2,92$

S = Desvio Padrão

A aplicação da Análise de Variância aos resultados mostrou que as diferenças entre os percentuais médios de recuperação de oocistos foram significativas (Tabela 4), tendo sido confirmadas pelo Teste de Tukey (5%) (Figura 19).

Tabela 4. Análise da variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em lodo, analisando as quantidades de 1,0g, 2,0g e 3,0g na etapa de sedimentação espontânea.

Causas de Variação	GL	QM	Fcalculado
Entre os volumes	2	1.649,01	36,83
Dentro dos volumes	6	44,77	-
Total	8	-	-

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

Coefficiente de Variação do Erro ou Resíduo: $CV_e = 33\%$

GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio

Os sobrenadantes formados, após a sedimentação das amostras de 2,0g e 3,0g, apresentaram-se turvos e com grande número de partículas interferentes, mesmo após a pré-lavagem com pérolas magnéticas (Figura 19). Após a filtração dos referidos sobrenadantes, as Membranas Nucleopore® ficaram recobertas com partículas interferentes, com partículas de lodo não sedimentadas e com pérolas magnéticas não capturadas, que interferiram na leitura das lâminas, diminuindo a recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., mas isto não ocorreu com as amostras de 1,0g (Figura 20).

As amostras de 1,0g sedimentadas espontaneamente propiciaram a formação de volumes suficientes de sobrenadantes para serem submetidos à SIM-IMF; em contrapartida, as amostras de 2,0g e 3,0g, após sedimentação, formaram pequenos volumes de sobrenadantes turvos (Figura 21). Este fato confirma que o volume de sobrenadante é inversamente proporcional à quantidade de lodo utilizado na sedimentação, e que, quanto maior o volume da amostra, mais partículas se sedimentarão, arrastando os oocistos para o fundo do tubo e diminuindo o percentual de recuperação.

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Robertson & Gjerde (2001), quando avaliaram a influência do volume da amostra na eficiência da recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de vegetais pela separação imunomagnética e, concluíram que os percentuais de recuperação de oocistos aumentaram em até 70%, quando pequenas quantidades de amostras de vegetais (<100g) são analisadas, e que os percentuais de recuperação para amostras maiores (>100g) não ultrapassam a 15%.

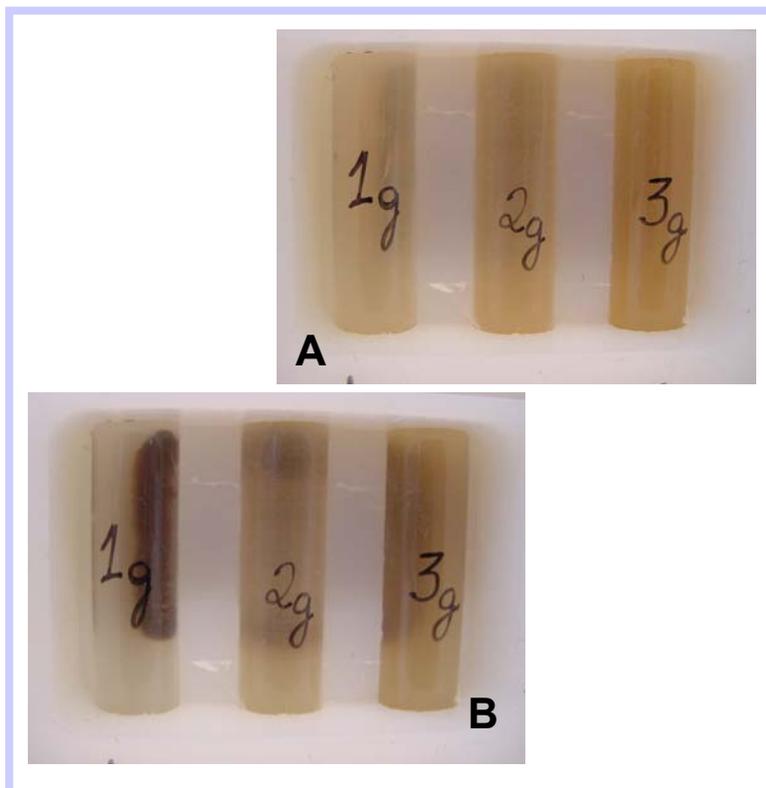


Figura 19: Sobrenadantes formados, após a sedimentação de amostras de 1,0g, 2,0g e 3,0g de lodo. A - antes da pré-lavagem com pérolas magnéticas; B - depois da pré-lavagem com pérolas magnéticas.

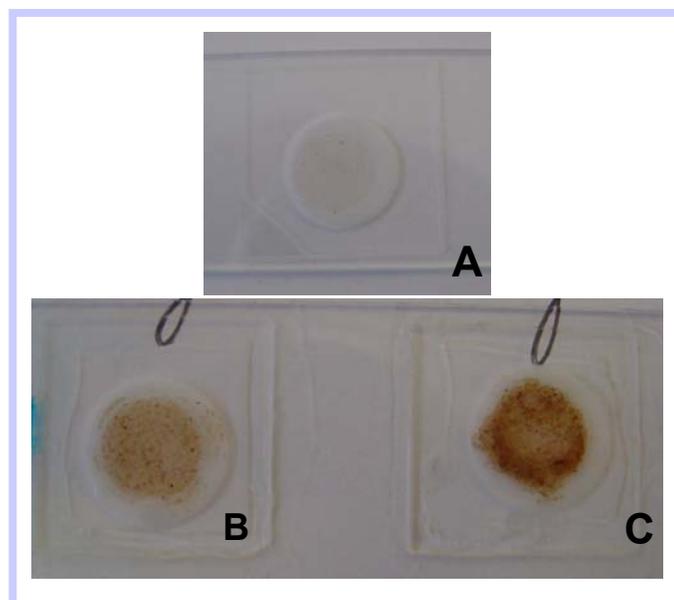


Figura 20: Membrana Nucleopore® após filtração do sobrenadante. A - amostra de 1,0g de lodo; B - amostra de 2,0g de lodo; C - amostra de 3,0g de lodo.

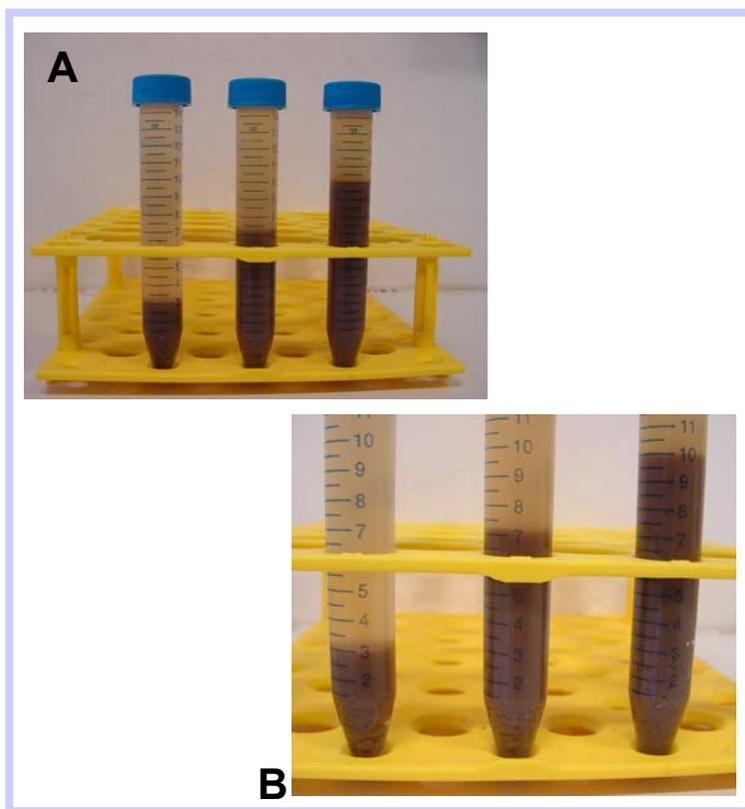


Figura 21: A – Comparação entre o volume de sobrenadante e a quantidade de sedimento formado após a sedimentação espontânea de amostras com 1,0g, 2,0g e 3,0g de lodo; B – Quantidade de sedimento formado após a sedimentação espontânea de amostras com 1,0g, 2,0g e 3,0g de lodo.

IV.1.3. Inclusão da pré-lavagem do sobrenadante

Por tratar-se de uma amostra ambiental, resíduo de uma ETE, e ser o resultado de um processo de tratamento de esgoto, o lodo possui muitas partículas eletromagnéticas, microorganismos, fragmentos de algas, e outros inúmeros interferentes, que precisam ser retirados da amostra antes da mesma ser processada.

Com o objetivo de retirar as partículas interferentes, propiciando uma maior limpeza do sobrenadante, formado depois da sedimentação do lodo, adicionou-se um passo de pré-lavagem do sobrenadante ao protocolo de fezes preconizado por Souza (2002), na etapa que antecede a SIM.

IV.1.4. Adequação de parâmetros relativos à amostra

O protocolo para detecção e quantificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia* em fezes (SOUZA, 2002) foi adequado para as amostras de lodo, principalmente, na etapa da imunofluorescência indireta, com alteração do volume do sobrenadante celular com anticorpo monoclonal CRY104, de 50 μ L para 100 μ L, e do volume de anti-IgG de camundongo acoplado ao FITC, de 80 μ L para 100 μ L, com a manutenção do título. Estas correções de volume melhoraram a fluorescência dos oocistos quando as lâminas contendo os oocistos foram analisados em microscópio de epifluorescência.

O tempo de incubação do sobrenadante com as Pérolas Magnéticas Sensibilizadas (PMS) também foi alterado, de 30min para 40min objetivando favorecer a formação do complexo pérola-ooocisto e, conseqüentemente, aumentar o percentual de recuperação de oocistos.

IV.1.5. Seleção do processo de quebra do floco de lodo

Com a passagem do material pela malha da peneira, os flocos abrem-se originando pequenas partículas de lodo, que, quando diluídas em tampão TPM e agitadas, em agitador tipo vortex, dissolvem-se com maior facilidade, propiciando uma adequada homogeneização da amostra e a liberação dos oocistos do interior das partículas de lodo.

Após o esmagamento da amostra de lodo ocorreu a formação de uma compacta massa gelatinosa, que, quando diluída em tampão TPM e agitada em agitador tipo vortex, não permitiu a liberação dos oocistos do interior das partículas de lodo .

A quebra do floco de lodo pelo processo de peneiração permitiu a formação de maior volume de sobrenadante, mais límpido e em menor tempo, quando comparado com o sobrenadante formado pelo processo de esmagamento do lodo em cadinho de porcelana.

Tabela 5. Porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., através da combinação das técnicas de SIM-IMF, após dois diferentes processos de quebra do floco de lodo.

Processo de quebra do floco de lodo	Porcentagens médias de recuperação (%) \pm S (n = 3)
Peneiração	32,48 \pm 7,82
Esmagamento	0,81 \pm 0,80

S = Desvio Padrão

A Tabela 5 mostra as diferenças entre as porcentagens médias de recuperação de oocistos após a quebra do floco de lodo. O processo de esmagamento leva a formação de uma massa gelatinosa, que retém os oocistos aderidos às partículas de lodo, que precipitaram durante o pré-tratamento por sedimentação espontânea, não ficando em suspensão no sobrenadante e, conseqüentemente, diminuindo drasticamente o percentual de recuperação.

A aplicação da Análise de Variância aos resultados mostrou que foram detectadas diferenças entre os processos de quebra do floco de lodo (Tabela 6). As diferenças entre os percentuais médios de recuperação de oocistos das amostras peneiradas e das amostras esmagadas em cadinho de porcelana foram confirmadas pelo Teste de Tukey (5%).

Após a avaliação estatística dos percentuais médios de recuperação de oocistos das amostras esmagadas em cadinho de porcelana e peneiradas incluiu-se a etapa de peneiração do lodo antes da pesagem e da sedimentação à padronização da técnica.

Tabela 6. Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. após a quebra do floco de lodo por peneiração ou por esmagamento em cadinho de porcelana.

Causas de Variação	GL	QM	Fcalculado
Entre os tratamentos	1	1505,11	48,66
Dentro dos tratamentos	4	30,93	-
Total	5	-	-

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

Coefficiente de Variação do Erro ou Resíduo: $CV_e = 31,51\%$

GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio

IV.1.6. Escolha do processo de semeadura do Padrão LVA e determinação do volume de sobrenadante

Observando-se o Grupo 5, na Tabela 7, percebe-se que o mesmo apresenta uma porcentagem média de recuperação de oocistos (40,54%) numericamente superior ao percentual dos Grupos 1 (36,82%), 3 (32,02%) e 4 (28,63%) e que o valor do Desvio Padrão ($\pm 3,50$) é numericamente menor que o do Grupo 2 ($\pm 9,95$) e menor que dos demais grupos estudados. Após a análise estatística dos dados, padronizou-se a semeadura do Padrão LVA conforme a seqüência de etapas descrita no Grupo 5, em Materiais e Métodos (item III. 2.4.6.).

Tabela 7. Porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em lodo, pela combinação das técnicas da SIM-IMF, após diferentes processos de semeadura de 10 μ L do Padrão LVA como interno.

Processo de semeadura do controle interno Padrão LVA	Porcentagens médias de recuperação (%) \pm S (n = 3)
Grupo 1	36,82 \pm 15,79
Grupo 2	41,26 \pm 9,95
Grupo 3	32,02 \pm 7,51
Grupo 4	28,63 \pm 4,06
Grupo 5	40,54 \pm 3,50

S = Desvio Padrão

Grupos 1, 2, 3, 4, e 5 \rightarrow Ver processos de semeadura descritos em Materiais e Métodos (item III.3.6.).

O aproveitamento de todo o volume de sobrenadante formado, após a sedimentação do lodo, garantiu a detecção de todos os oocistos que estavam em suspensão, diminuindo a variação dos percentuais de recuperação de oocistos entre cada uma das repetições a que foi submetido o Grupo 5 (S = $\pm 3,50$) e propiciou um aumento no percentual de recuperação de oocistos (Tabela 7). Porém, a inclusão dos tubos 1 e 2, usados para armazenar todo o volume de sobrenadante formado após a sedimentação da amostra, gerou maior gasto das Membrana Nucleopore[®], das pérolas magnéticas na pré-

lavagem, dos anticorpos monoclonais e do anticorpo secundário conjugado FITC, aumentando o custo da análise por amostra.

Tabela 8. Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em todo o volume de sobrenadante formado, após a sedimentação do lodo, por diferentes processos de semeadura de 10 μ L do Padrão LVA.

Causas de Variação	GL	QM	Fcalculado
Entre os processos	4	89,25	1,01
Dentro dos processos	10	88,32	-
Total	14	-	-

Ver processos de semeadura descrito em Materiais e Métodos (III. 3. 6.).

Valor do F Tabelado: $F_{0,05(4, 10)} = 3,48$

Coefficiente de Variação do Erro ou Resíduo: $CV_e = 26,21\%$

GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio

A aplicação da Análise de Variância aos resultados mostrou que não foram detectadas diferenças significativas entre os processos de semeadura (Grupos 1, 2, 3, 4 e 5) (Tabela 8), o que permitiu a escolha do processo usado no Grupo.

O Grupo 5 apresentou a segunda maior porcentagem média de recuperação de oocistos (40,54%) e o menor valor numérico do desvio padrão ($\pm 3,5$), significando tratar-se, dentro dos grupos testados, do processo de semeadura de 10 μ L do Padrão LVA, que apresentou menor variação na porcentagem de recuperação para as repetições realizadas.

IV.1.7. Definição do tempo de sedimentação do lodo

Conforme observa-se na Tabela 9, a porcentagem média de recuperação de oocistos no tempo de sedimentação de 20min é, aproximadamente, 5% maior do que nos tempos de sedimentação de 10 e 30 min e, aproximadamente, 7% maior quando as amostras foram sedimentadas por 40min.

Tabela 9. Porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., após a sedimentação espontânea do lodo, em quatro diferentes tempos.

Tempo de sedimentação (min)	Porcentagens médias de recuperação (%) \pm S (n=3)
10	38,85 \pm 1,71
20	43,04 \pm 8,28
30	38,66 \pm 4,21
40	36,18 \pm 2,00

S = Desvio Padrão

Embora os resultados, em alguns casos, tenham revelado uma diferença na porcentagem média de recuperação maior que 7%, quando foram submetidos à Análise de Variância, nenhuma diferença significativa foi detectada entre os tempos testados (Tabela 10). Quando comparado com os demais tempos testados, o tempo de 20min para a sedimentação espontânea de 1,0g de lodo, apresentou a maior porcentagem média de recuperação e diminuiu o tempo de processamento de cada amostra analisada em pelo menos 20min, sendo então, incorporado à técnica.

Tabela 10. Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., após a sedimentação do lodo, nos tempos de 10, 20, 30 e 40min.

Causas de Variação	GL	QM	Fcalculado
Entre os tempos	3	24,23	0,89
Dentro dos tempos	8	23,34	-
Total	11	-	-

Valor do F Tabelado: $F_{0,05(3,8)} = 4,07$

Coefficiente de Variação do Erro ou Resíduo: $CV_e = 12,32\%$

GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio

Por serem partículas leves, os oocistos precipitam lentamente e, tempos de sedimentação superiores a 20min propiciaram a sedimentação de maior número de oocistos, diminuindo a recuperação. Em contrapartida, tempos inferiores a 20min não permitem a sedimentação das partículas de lodo, que acabam por ficar em suspensão no sobrenadante, não permitindo a formação

de um sobrenadante límpido, ocasionando também, queda da recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp..

IV.1.8. Inclusão da etapa de centrifugação do sobrenadante

A porcentagem média de recuperação de oocistos após a centrifugação do sobrenadante é semelhante à porcentagem de recuperação de oocistos das amostras não centrifugadas, sendo muito menor que 1% (Tabela 11).

Tabela 11. Porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., através da combinação das técnicas da SIM-IMF, após a centrifugação de todo o volume de sobrenadante formado pela sedimentação espontânea.

Tratamento do sobrenadante	Porcentagens médias de recuperação (%) \pm S (n=3)
Não centrifugado	47,80 \pm 5,49
Centrifugado	47,61 \pm 8,74

S = Desvio Padrão

Através da Análise da Variância, a que foram submetidos os resultados, não foi detectada diferença significativa alguma entre o sobrenadante não centrifugado e o sobrenadante centrifugado (Tabela 12), tendo sido, então, possível incorporar a técnica à metodologia de centrifugação do sobrenadante formado, após a sedimentação espontânea de 1,0g de lodo, por 20min.

Tabela 12. Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., após a centrifugação de todo o volume de sobrenadante formado pela sedimentação do lodo no tempo de 20min.

Causas de Variação	GL	QM	Fcalculado
Entre os tratamentos	1	0,03	0,00056
Dentro dos tratamentos	4	53,35	-
Total	5	-	-

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

Coefficiente de Variação do Erro ou Resíduo: $CV_e = 15\%$

GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio

O processo de centrifugação de todo o volume de sobrenadante formado pela sedimentação espontânea, mostrou-se economicamente vantajoso, pois eliminou o segundo tubo de 6mL, no qual era armazenado o sobrenadante, reduzindo os custos com o uso de anticorpos monoclonais, com as pérolas magnéticas usadas na pré-lavagem, com o anticorpo secundário conjugado a FITC e com as membranas Nucleopore®. As lâminas, correspondentes aos materiais armazenados nestes tubos, apresentaram-se negativas para oocistos de *Cryptosporidium*, confirmando a sedimentação do microorganismo durante a centrifugação.

Após a análise estatística, a centrifugação de todo o volume de sobrenadante formado após a sedimentação espontânea de 1,0g do lodo, por 20min, foi incluída na técnica.

IV.1.9. Ressuspensão do sedimento formado no processo inicial de sedimentação

A porcentagem média de recuperação de oocistos após a ressuspensão do sedimento, ou seja, após duas sedimentações espontâneas do lodo, aumentou em aproximadamente 5% (Tabela 13). Através da Análise de Variância, à que foram submetidos os resultados, não detectou-se diferença significativa alguma entre os tratamentos (Tabela 14). Portanto, a etapa de ressuspensão do lodo foi incorporada à técnica.

Tabela 13. Percentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., através da combinação da técnicas da SIM-IMF, após a ressuspensão do sedimento formado a partir do processo de sedimentação espontânea do lodo.

Número de sedimentações espontâneas do lodo	Percentagens médias de recuperação (%) \pm S (n=3)
1	47,61 \pm 8,74
2	52,18 \pm 8,08

S = Desvio Padrão

Tabela 14. Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., após duas sedimentações espontâneas do lodo.

Causas de Variação	GL	QM	Fcalculado
Entre os tratamentos	1	31,30	0,4123
Dentro dos tratamentos	4	75,90	-
Total	5	-	-

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

Coefficiente de Variação do Erro ou Resíduo: $CV_e = 17,42\%$

GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio

Como os oocistos são estruturas muito pequenas, os mesmos podem facilmente ficar retidos nos detritos e nas partículas maiores de lodo, através de forças eletrostáticas, e serem arrastados para o fundo do tubo.

A ressuspensão, por agitação do sedimento formado na primeira sedimentação de 1,0g de lodo (por 20 min), permitiu a liberação dos oocistos que estavam aderidos às partículas maiores e que foram, conseqüentemente, arrastados para o fundo do tubo. O sobrenadante formado pela segunda sedimentação da amostra foi armazenado em um segundo tubo de 6mL, sendo também, submetido à SIM-IMF, o que aumentou os percentuais de recuperação de oocistos por amostra. Em contrapartida, a inclusão deste segundo tubo na padronização aumentou novamente o custo da análise por amostra.

IV.1.10. Redução do volume de sobrenadante a ser processado e validação do Protocolo Final - Lodo

A porcentagem média de recuperação de oocistos, através da combinação das técnicas da SIM-IMF, seguindo o Protocolo Final – Lodo foi 2% maior do que quando seguiu-se o Protocolo III e, aproximadamente, 7% superior quando seguiu-se os Protocolos I e II, sendo que, apresentou, ainda um Desvio Padrão ($\pm 4,30$) menor que os demais protocolos testados (Tabela 15). Detalhes técnicos sobre tais protocolos estão nesta mesma tabela.

No Protocolo Final – Lodo foi incluída a centrifugação dos dois sobrenadantes formados pelas duas sedimentações, e armazenados em tubos de 15mL, com o objetivo de forçar a decantação dos oocistos para o fundo dos

tubos e, conseqüentemente, permitir que as partes superiores dos sobrenadantes fiquem livres dos oocistos, podendo então serem descartadas. As lâminas correspondentes, apresentaram-se negativas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. confirmado a sedimentação do microorganismo durante a centrifugação.

Com a união, em um único tubo de 6mL, das partes inferiores dos dois sobrenadantes formados (originados pelas duas sedimentações), após a centrifugação, o custo da análise por amostra diminuiu, não a inviabilizando.

Tabela 15. Comparação das porcentagens médias de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., utilizando quatro diferentes protocolos de processamento de amostras de lodo.

Protocolo	Porcentagens médias de recuperação (%) \pm S (n=3)
Protocolo I*	47,80 \pm 5,49
Protocolo II*	47,61 \pm 8,79
Protocolo III*	52,46 \pm 8,08
Protocolo Final – Lodo*	54,46 \pm 4,30

S = Desvio Padrão

*Protocolo I: processamento da SIM-IMF, com todo o volume de sobrenadante, formado após uma única sedimentação espontânea de 1,0g de lodo, armazenado em dois tubos de 6mL.

*Protocolo II: processamento da SIM-IMF com 5mL de sobrenadante obtido após a centrifugação de todo o volume de sobrenadante formado pela sedimentação espontânea de 1,0g de lodo.

*Protocolo III: processamento da SIM-IMF, com dois volumes diferentes de sobrenadante, armazenados em dois tubos de 6mL, após duas sedimentações de uma amostra de 1,0g de lodo.

*Protocolo Final - Lodo: processamento da SIM-IMF, com 5mL de sobrenadante em um único tubo de 6mL, após a centrifugação de todo o volume de sobrenadante formado pelas duas sedimentações de uma amostra de 1,0g de lodo.

Quando os resultados foram submetidos à Análise de Variância não foram detectadas diferenças significativas entre os protocolos testados (Tabela 16), principalmente, entre o Protocolo III e o Protocolo Final – Lodo. Estes dados permitiram a adoção do Protocolo Final – Lodo para a detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de campo de lodo.

Tabela 16. Análise da Variância dos resultados da recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., através da utilização dos Protocolos I, II, III e Final – Lodo.

Causas de Variação	GL	QM	Fcalculado
Entre os protocolos	3	30,74	0,614
Dentro dos protocolos	8	50,04	-
Total	11	-	-

Valor do F Tabelado: $F_{0,05(1,8)} = 4,07$

Coefficiente de Variação do Erro ou Resíduo: $CV_e = 10\%$

GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio

IV.2. Aplicação da metodologia padronizada para a detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de campo de lodo da ETE – Sistema Insular da CASAN, Florianópolis, SC

Após a padronização da metodologia usando-se várias alíquotas de uma amostra inicial de lodo, sabidamente negativa para coccídios, e a introdução de modificações do protocolo sugerido por Souza (2002), chegou-se ao Protocolo Final – Lodo (item III.2.4.12.), que foi utilizado para analisar amostras de lodo, coletadas diretamente da prensa desaguadora da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis, no período de 11 a 31 de julho de 2002.

As amostras foram processadas usando-se como controle positivo, o controle comercial ColorSeed[®], num volume de $1,636\mu\text{L} \pm 56\mu\text{L}$, contendo $98 \pm 1,5$ oocistos e $98 \pm 1,5$ cistos de *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia*, respectivamente.

O ColorSeed[®] possui uma baixa variação no número de 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 para qualquer tipo de amostra, oportunizando a avaliação da eficiência da técnica. Devido a estas características, o ColorSeed[®] passou a ser usado como controle na avaliação da qualidade das metodologias de concentração, detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de campo de lodo.

IV.2.1. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Das 27 amostras processadas, 20 (74,07%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp.. Dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* semeados, através do controle interno comercial ColorSeed[®], seguindo o Protocolo Final – Lodo (item III.2.4.12.), houve recuperação em 100% dos casos, sendo que a porcentagem média de recuperação dos oocistos do controle ColorSeed[®] foi de 39,96%, com um desvio padrão de $\pm 11,20$ (Tabela 17).

O número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. detectados por amostra analisada, variou de um a quatro (Figura 22). Das 20 amostras positivas para o referido parasita, 13 (65%) apresentaram apenas um único oocisto, cinco (25%) apresentaram dois oocistos e três oocistos foram detectados em uma (5%) amostra. Também, em apenas uma (5%) amostra detectou-se quatro oocistos (Tabela 17).

A porcentagem média de recuperação dos oocistos do ColorSeed[®], semeados nas amostras de lodo, foi de 39,96%, através da combinação das técnicas da SIM-IMF.

Similarmente, Robertson & Gjerde (2000) obtiveram um percentual de recuperação de oocistos de 42%, a partir de amostras de frutas, usando também a técnica da SIM, porém acoplada à imunofluorescência direta.

Robertson et al. (2000) obtiveram percentuais semelhantes em amostras de esgoto, pelas técnicas de clarificação em éter (40%) e flutuação em sacarose (42%).

Bukhari et al. (1997), entretanto, utilizando amostras de esgoto, obtiveram percentuais de recuperação de oocistos, que variaram de 15,4% a 46,6%, quando as mesmas foram concentradas pela técnica de flutuação em sacarose e marcadas com anticorpos monoclonais ligados ao FITC.

Bodley-Tickell e colaboradores (2002), analisaram 418 amostras de água coletadas em uma fazenda modelo da Inglaterra e detectaram oocistos de *Cryptosporidium parvum* em 274 (65,6%) amostras. Eles obtiveram percentuais de recuperação que variaram de zero a 36%, com uma média de 17,6%, indicando que as águas que passam ou que estão próximas à áreas agrícolas têm grande probabilidade de serem contaminadas com *Cryptosporidium*.

Ainda, Rochelle et al. (1999), utilizando a técnica da SIM, também acoplada à imunofluorescência, para a detecção e quantificação de *Cryptosporidium parvum* em fezes bovinas, obtiveram um percentual de recuperação de 67%, superior ao encontrado neste trabalho, concluíram que a técnica mostrou-se sensível para detectar baixos níveis de oocistos.

Tabela 17. Porcentagens de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, contidos no controle interno comercial ColorSeed[®], e resultados da detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de campo de lodo coletadas da esteira da prensa desaguadora da ETE – Sistema Insular da CASAN, Florianópolis, utilizando o Protocolo Final - Lodo.

Número da amostra	Porcentagens de recuperação de oocistos ColorSeed [®] (*)	Número de oocistos/amostra
1	44	1
2	49	2
3	47	-
4	14	-
5	40	1
6	41	1
7	65	2
8	40	-
9	46	4
10	49	2
11	29	2
12	58	2
13	28	1
14	34	1
15	37	1
16	30	-
17	37	1
18	37	1
19	15	-
20	39	1
21	42	1
22	51	1
24	38	3
25	35	1
27	46	-
30	51	1
31	37	-

(*) Média da porcentagem de recuperação dos oocistos \pm Desvio Padrão: 39,96 \pm 11,20; Coeficiente de Variação: 28%

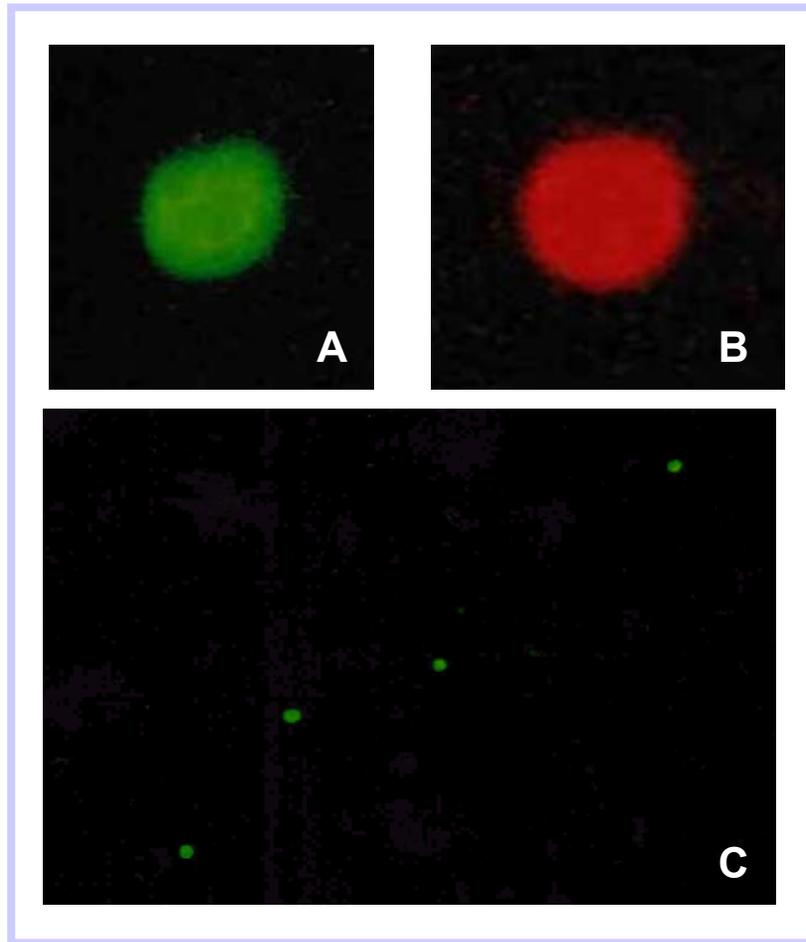


Figura 22: Oocistos de *Cryptosporidium* spp. em uma amostra de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, de Florianópolis: A - marcado com FITC, visualizado no aumento de 40x; B – marcado com Texas Red®, visualizado no aumento de 40x; C - marcados com FITC, visualizados no aumento de 10x.

A eficiência da SIM, para amostras ambientais, de acordo com Rotariu, Strachan, Badescu (2002a,b) pode ser influenciada por vários fatores: pelo diâmetro muito pequeno da pérola magnética; pelo tempo insuficiente para a ligação entre as pérolas magnéticas e os microorganismos; pelo volume da solução em que o microorganismo se encontra em suspensão; pela composição e consistência da amostra; pela quantidade de gordura e de partículas eletromagnéticas da amostra; e pela intensidade do campo magnético usado.

Assim, a eficiência na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, pode ter sido

influenciada também, por tais fatores, justificando o alto valor do desvio padrão ($\pm 11,20$), bem como, o alto coeficiente de variação (28%) obtido na análise das 27 amostras.

O Método 1623, que foi proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA, para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em água, utiliza a técnica da SIM para a concentração dos protozoários e a imunofluorescência indireta, com anticorpos monoclonais ligados ao FITC, para a quantificação das formas morfológicas, através da microscopia de epifluorescência. Este método é considerado eficiente quando o percentual médio de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* varia de 21 a 100%, sendo a precisão da técnica, calculada pelo desvio padrão, que pode atingir um percentual máximo de até 40% (USEPA, 1999). Quando outras amostras ambientais, analisadas pelas mesmas metodologias referenciadas nesse método, apresentarem valores de recuperação e de desvio padrão semelhantes aos propostos para amostras de água, poder-se-ia, por analogia considerar estas metodologias eficientes também para a amostra questão.

As amostras de lodo analisadas, apesar de possuírem uma constituição extremamente diversificada, consistência variada e grande quantidade de partículas interferentes, forneceram valores de recuperação similares àqueles propostos para amostras de água e apresentaram, também, desvio padrão inferior a 40%. Portanto, a recuperação média obtida neste trabalho de $39,96 \pm 11,20$, para oocistos de *Cryptosporidium* spp., pode ser considerada perfeitamente aceitável. Assim sendo, a combinação das técnicas de sedimentação espontânea do lodo, centrifugação do sobrenadante, separação imunomagnética e imunofluorescência indireta mostrou-se uma ferramenta eficaz para a concentração, detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis.

Coeficientes de variação elevados, como o obtido neste trabalho (28%) também foram observados por outros autores, que avaliaram diversas técnicas para a recuperação de oocistos a partir de amostras de fezes de animais e de solo (BUKHARI & SMITH, 1995; KUCZYSKA & SHELTON, 1999).

O percentual de amostras de lodo positivas (74,07%) para oocistos de *Cryptosporidium* spp., encontrado neste trabalho, foi alto quando comparado com o encontrado por Bukhari et al. (1997), que foi de 25,5%, ou seja, apenas 24 amostras positivas das 94 analisadas.

Xiao et al. (2001), obtiveram, também, um percentual de amostras de esgoto bruto positivas inferior ao deste trabalho: apenas 12 (24,48%) das 49 analisadas.

Em contrapartida, Zuckerman et al (1997) que pesquisaram oocistos de *Cryptosporidium* em águas de superfície e efluentes em Israel obtiveram 100% de positividade. Brandonisio et al. (2000), também, obtiveram 100% de positividade ao pesquisarem o mesmo parasita, em águas de esgoto de ETE's da Itália.

Robertson & Gjerde (2001), na Noruega, pesquisando a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em frutas e vegetais, observaram que a concentração variou de 1 a 6 oocistos/100g de amostra. Em contrapartida, a concentração de oocistos, em amostras de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular variou de 100 a 400 oocistos/100g de amostra.

Bukhari et al. (1997) e Carraro et al. (2000) sugerem que as variações na concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e nas porcentagens de amostras de esgoto positivas, para o mesmo parasita, dependem sobretudo do tamanho da população assistida pela ETE e dos níveis de infecção da comunidade. Os primeiros autores acrescentam, ainda, que os métodos de detecção de oocistos em fezes, usados para diagnósticos laboratoriais são ineficientes, conduzindo a uma subnotificação desta patologia; portanto é esperado que os percentuais de oocistos detectados em esgotos sejam maiores que aqueles em fezes humanas.

Silva & Da-Rin (2000), objetivaram caracterizar a biota do lodo, (através da identificação e quantificação de protozoários), e observaram que o número total dos mesmos está diretamente relacionado ao fator carga orgânica e inversamente relacionado à idade do lodo (tempo de retenção dos sólidos no sistema).

A técnica da imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos monoclonais, altamente específicos, é uma ferramenta importante para a detecção e quantificação desses parasitas ao final do processo. No entanto, a imunofluorescência detecta todos os tipos de oocistos.

Para o estudo epidemiológico da parasitose é importante detectar e diferenciar parasitas viáveis e inviáveis. Entretanto, não foi objetivo deste trabalho atestar a viabilidade e a infectividade dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., mas sim identificar sua ocorrência no lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis. Além disso, o solo é um meio inóspito, com intensa atividade microbiológica, onde a maioria dos patógenos apresenta um curto período de sobrevivência, após a incorporação do lodo. Os cistos de protozoários existentes no lodo sobrevivem apenas de dois a 10 dias no solo que recebeu esse lodo, sendo que, neste período, esse solo não deve ser usado para qualquer cultivo (ILHENFELD et al., 1999). Assim sendo, a análise da viabilidade e da infectividade dos protozoários presentes no lodo, que terá como destino a reciclagem agrícola, torna-se desnecessária.

IV.2.2 Pesquisa de cistos de *Giardia* spp.

Das oito amostras processadas com o intuito de detectar a presença de *Giardia*, sete (87,5%) foram positivas (Figura 23). Dos cistos de *Giardia lamblia* semeados, através do controle interno comercial ColorSeed[®], seguindo o Protocolo Final – Lodo (item III.2.4.12.), houve recuperação em apenas 62,5% dos casos, sendo que, a porcentagem média de recuperação destes controles foi muito baixa apenas 0,87%, indicando que o protocolo usado foi ineficiente (Tabela 18). A baixa recuperação de cistos de *Giardia lamblia* pode ter sido influenciada pelo tempo de 20min de sedimentação espontânea do lodo, padronizado para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., os cistos são maiores e mais pesados que os oocistos, assim sendo, sedimentam em menor tempo, com maior velocidade, e podem, também serem mais facilmente arrastados pelas partículas maiores de lodo para o fundo do tubo.

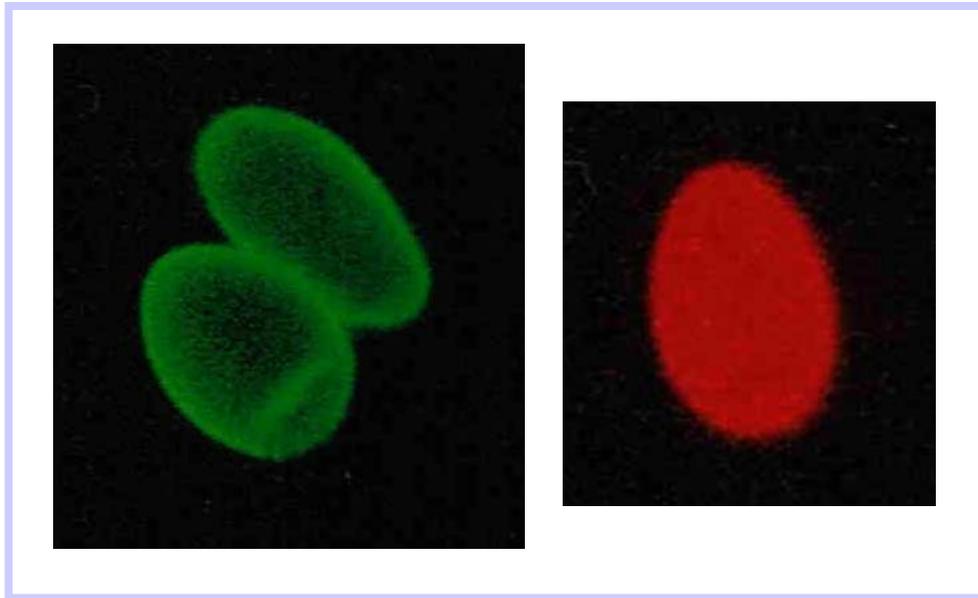


Figura 23: Cistos de *Giardia* spp. em amostra de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis, SC: A - marcados com FITC, visualizados no aumento de 40x; B – marcado com Texas Red[®], visualizado no aumento de 40x.

A Tabela 18 permite observar, ainda, que o número de cistos de *Giardia* spp. detectados nas sete amostras positivas, é visivelmente superior ao número de oocistos de *Cryptosporidium* spp., detectados nas mesmas amostras, conforme referenciado na Tabela 17. Apenas na amostra 21 não foi detectada a presença de cistos de *Giardia* spp..

Assim como propõem Semenas et al. (1999), Brandonisio et al. (2000), Carraro et al. (2000), Lloyd & Frederick (2000), Rimhanen-Finne et al. (2001), estes resultados sugerem que a patologia causada por este parasita tem alta prevalência na população assistida pela ETE analisada, quando se compara com a prevalência da patologia determinada pelo *Cryptosporidium parvum*.

Tabela 18. Percentagens de recuperação de cistos de *Giardia lamblia*, contidos no controle interno comercial ColorSeed® e resultados da detecção de cistos de *Giardia* spp., em algumas das amostras de campo de lodo, coletadas da esteira da prensa desaguadora da ETE – Sistema Insular da CASAN, Florianópolis, utilizando o Protocolo Final - Lodo.

Número da amostra	Percentagens de recuperação de cistos ColorSeed® (*)	Número de cistos/amostra
20	1	20
21	2	-
22	-	4
24	-	11
25	1	11
27	1	13
30	2	19
31	-	4

(*) Média da percentagem de recuperação dos cistos \pm Desvio Padrão: $0,87 \pm 0,83\%$; Coeficiente de Variação: 95,4%.

IV.3. Pesquisa de helmintos

Com o desenvolvimento da parasitologia médica, diversas técnicas foram propostas para a quantificação de ovos e larvas de helmintos intestinais em fezes, e os princípios básicos dessas técnicas foram adaptados para a quantificação de ovos e larvas de helmintos em amostras esgoto e lodo.

Diversos métodos para a quantificação de ovos e larvas de helmintos em esgotos estão descritos na bibliografia especializada, cada um com suas vantagens e desvantagens (ZERBINI & CHERNICHARO, 2001). Alguns apresentam elevadas percentagens de recuperação, mas demandam grande tempo de análise, outros utilizam reagentes de custo muito elevado ou não adequados para o uso em laboratórios com limitações de equipamentos, enquanto outros são capazes de recuperar apenas um número limitado de espécies. Fica claro, com isso, que não existe um método que seja universalmente útil, que recupere todos os ovos e larvas de helmintos de importância médica e que tenha uma taxa de recuperação elevada. A escolha do método a ser utilizado deve ser feita levando-se em consideração o objetivo

da pesquisa e o tipo de sistema que está sendo utilizado para o tratamento dos esgotos.

Segundo os dados obtidos (Tabela 19), observou-se que das 27 amostras analisadas pelo método de Ritchie, cinco (18,51%) foram positivas na protozooscopia (Figura 24) e 23 (85,18%) apresentaram resultados positivos para helmintos (Figura 25), sendo que apenas três (11,11%) foram negativas, tanto para helmintos quanto para protozoários.

Em nenhuma das amostras, quando analisadas pela técnica de Ritchie detectou-se cistos de *Giardia* spp., confirmando que a combinação das técnicas da SIM-IMF é mais sensível do que a simples pesquisa dos cistos do referido parasita pela técnica de concentração tradicional, em amostras de lodo. Devido ao pequeno tamanho dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., e de sua semelhança com leveduras era esperado que não fosse possível visuilizá-los, através da técnica de Ritchie (DE CARLI, 2001).

Ainda na Tabela 19, pode-se observar que, dentre os helmintos encontrados, destacou-se a presença de ovos com características de ancilostomídeos em 21 (77,77%) das amostras processadas, e em cinco (18,59%) amostras, encontrou-se ovos com características de *Ascaris* spp..

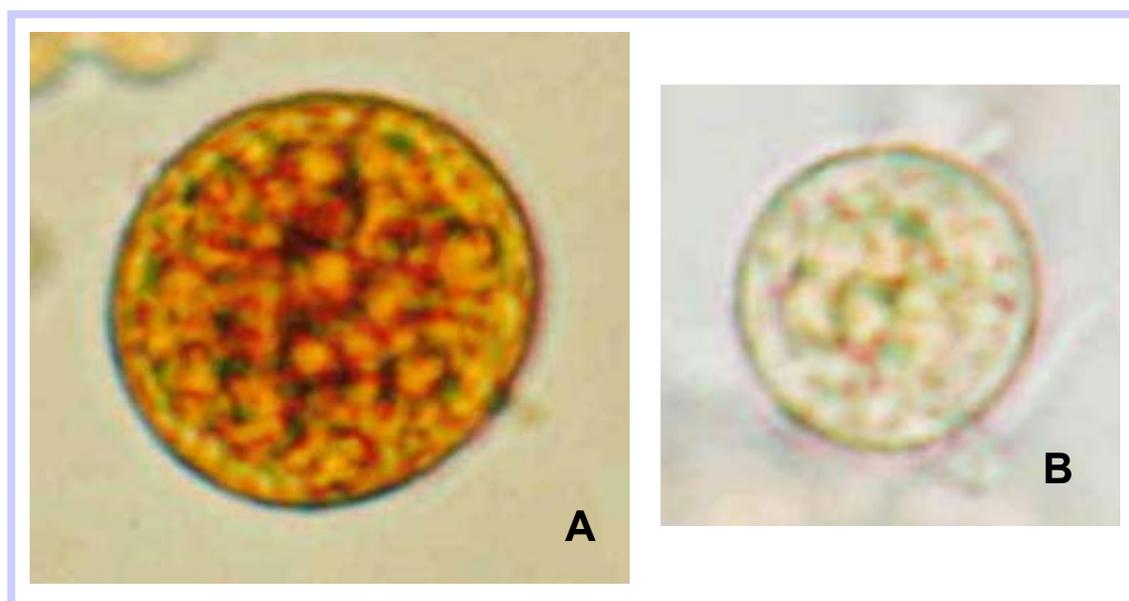


Figura 24: Cistos de protozoários detectados nas amostras de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis, pelo método de Ritchie: A – cisto de *Entamoeba coli*; B – cisto com característica de ameba.

Tabela 19. Detecção de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários pelo Método de Ritchie.

Número da amostra	Helmintoscopia	Protozooscopia
1	Negativa	Negativa
2	Negativa	Negativa
3	Ovos com característica de <i>Ascaris</i> ou <i>Toxocara</i> sp. Ovos com características de Ancilostomídeos	Cisto de ameba
4	Negativa	<i>Entamoeba coli</i>
5	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
6	Negativa	Negativa
7	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
8	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
9	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
10	Ovos com características de Ancilostomídeos Larva de Vida Livre	Negativa
11	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
12	Ovos com características de Ancilostomídeos Larva de Vida Livre	Negativa
13	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
14	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
15	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
16	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
17	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
18	Ovos com característica de <i>Ascaris</i> ou <i>Toxocara</i> sp. Ovos com características de Ancilostomídeos Larva de Vida Livre	<i>Entamoeba coli</i>
19	Ovos com características de Ancilostomídeos Larva de Vida Livre	Cisto de ameba
20	Ovos com características de Ancilostomídeos Larva de Vida Livre	Negativa
21	Ovos com característica de <i>Ascaris</i> ou <i>Toxocara</i> sp. Larva de Vida Livre	Negativa
22	Ovos com característica de <i>Ascaris</i> ou <i>Toxocara</i> sp. Ovos com características de Ancilostomídeos Larva de Vida Livre <i>Meloidogyne</i>	Negativa
24	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
25	Ovos com características de Ancilostomídeos	<i>Entamoeba coli</i>
27	Ovos com características de Ancilostomídeos	Negativa
30	Ovos com característica de <i>Ascaris</i> ou <i>Toxocara</i> sp. Ovos com características de Ancilostomídeos Larva de Vida Livre	Negativa
31	<i>Hymenolepis nana</i>	Negativa

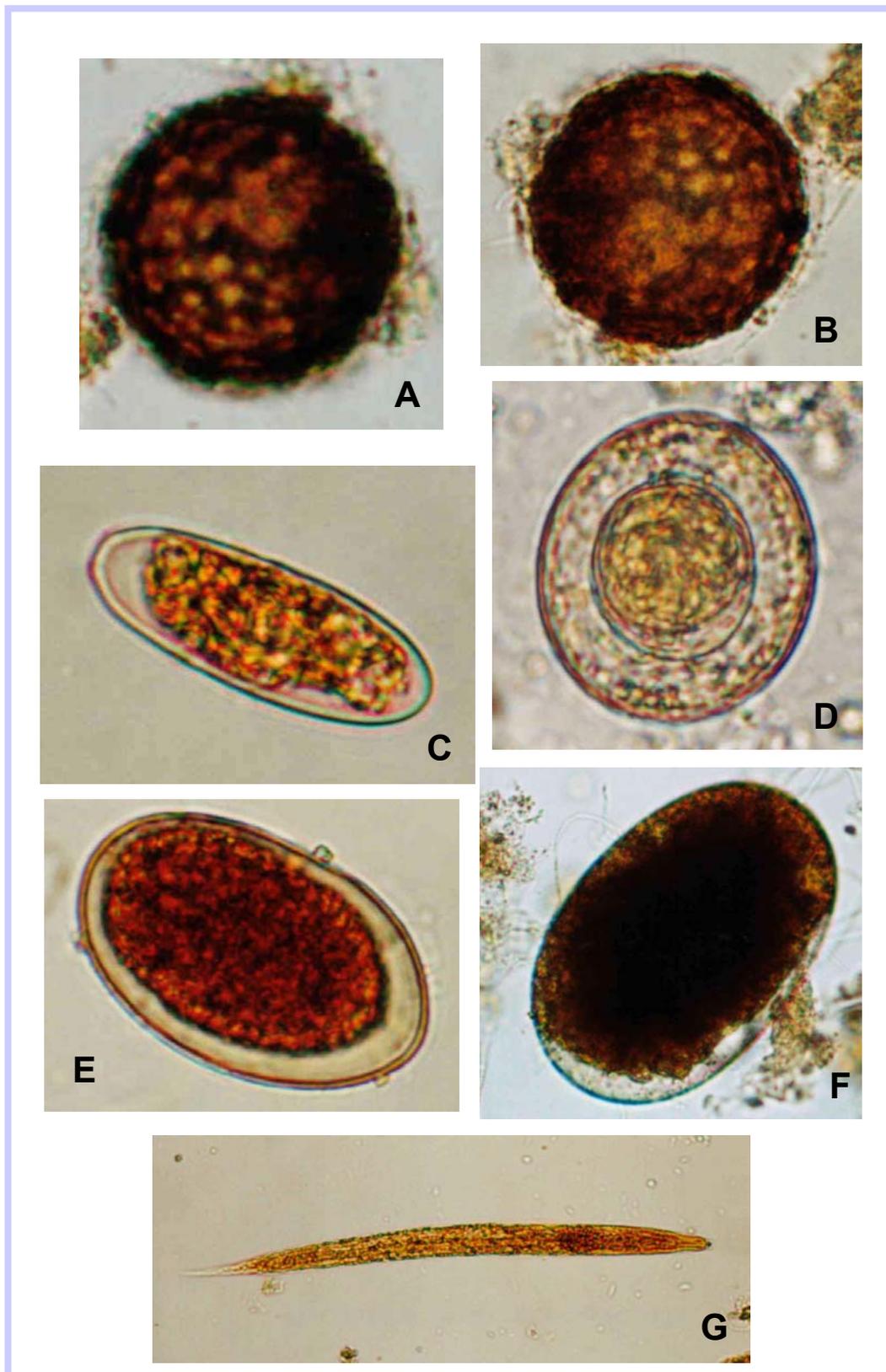


Figura 25: Ovos de helmintos detectados nas amostras de lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis, pelo método de Ritchie: A e B – ovos com características de *Ascaris* spp./*Toxocara* sp.; C – ovo de *Meloidogyne*; D - ovo de *Hymenolepis nana*; E e F – ovos com características de ancilostomídeos; G - Larva de vida livre.

Os ovos de *Ascaris* spp., visualizadas nas amostras de lodo analisadas neste trabalho, não foram morfologicamente confirmados como sendo o parasita humano, *Ascaris lumbricoides*. Assim, os ovos visualizados podem ser de *A. lumbricoides*, *A. suun*, *Toxocara canis* ou *T. catti*.

Um fato que chamou a atenção foi a ocorrência de mais de um parasita em uma única amostra. Das amostras analisadas, 14 (51,85%) apresentaram-se monoparasitadas, cinco (18,51%) biparasitadas e cinco (18,51%) poliparasitadas, ou seja, com mais de duas espécies de parasitas (Figura 26).

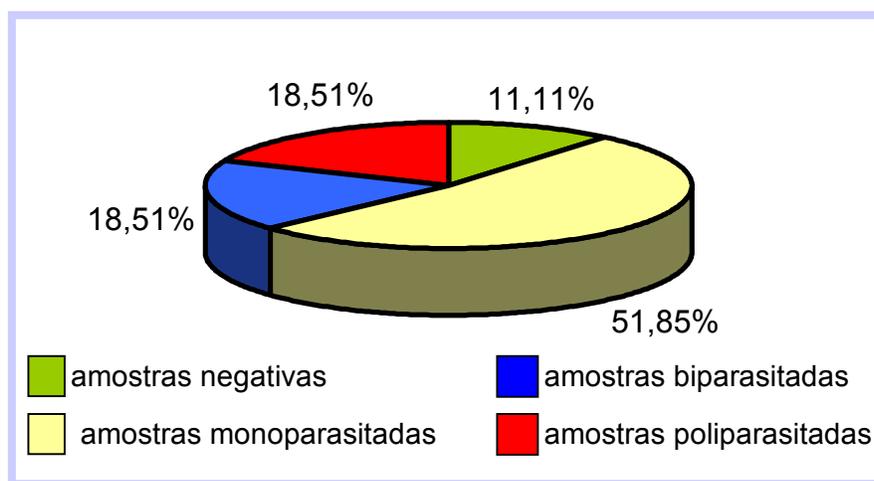


Figura 26: Frequência de parasitas nas amostras de lodo analisadas.

Os esgotos podem conter uma grande variedade de ovos provenientes de fezes humanas e animais e, conseqüentemente, esses helmintos podem ser também encontrados no lodo dos esgotos.

De acordo com Zerbini & Chernicharo (2001), a correta identificação dos ovos de helmintos deve ser realizada baseando-se, principalmente, nas suas características morfológicas e de tamanho. Para tal, torna-se indispensável proceder a medição exata dos ovos, utilizando-se um microscópio calibrado, de forma a se conseguir a correta identificação e diferenciação dos ovos de helmintos presentes na amostra. Isso porque o tamanho dos ovos é um dos principais critérios que permitem identificar as espécies de parasitas. Porém, não foi objetivo deste trabalho identificar e diferenciar os ovos e larvas de helmintos encontrados nas amostras no lodo analisadas, mas sim, detectá-los.

No Estado do Paraná, para fins de caracterização do perfil sanitário do lodo, foram estabelecidos como indicadores a contagem e viabilidade dos ovos de helmintos. Dentre os agentes patogênicos, os helmintos são os que apresentam maior capacidade de resistência às condições do meio, portanto, uma vez realizado o controle desses patógenos, os demais estarão automaticamente em níveis admissíveis, compatíveis com o uso agrícola, não proporcionando riscos aos usuários do produto e ao meio ambiente (ANDREOLI et al., 2001).

Vanzo e colaboradores (2000) afirmam que, a quantidade de patógenos nos biossólidos é bastante variável e depende, fundamentalmente, das condições sócio-econômicas da população, das condições sanitárias da região, da presença de indústrias agro-alimentícias e do tipo de tratamento ao qual o lodo é submetido. Eles sugeriram, também, que nos países mais desenvolvidos, cuja população apresenta padrões adequados de saúde, a densidade de alguns patógenos nos biossólidos, como os ovos de helmintos, seria mais baixa do que em países em desenvolvimento.

Lloyd & Frederick (2000) mostraram que há grande dificuldade de se remover ovos de *Ancylostoma*, cistos de *Giardia* e *Entamoeba* e oocistos de *Cryptosporidium* pela sedimentação do esgoto da ETE. A pequena taxa de sedimentação dos protozoários é influenciada pelo pequeno tamanho dos cistos/oocistos, o que também dificulta o monitoração desses protozoários no esgoto e, conseqüentemente, no lodo. Para a completa remoção dos cistos/oocistos dos protozoários do esgoto se faz necessário um tempo de retenção no reator, para que se processe a sedimentação das formas morfológicas de, no mínimo, 36 dias. Somente após esse período, os protozoários poderiam ser visualizados em amostras de lodo. Os autores apontaram, ainda, que *Giardia* e *Ascaris* são os parasitas, que ocorrem com maior freqüência, em todos os estágios de uma estação de tratamento, devido a sua maior prevalência na população.

Em concordância com Lloyd & Frederick (2000), outros autores também mostraram que o *Ascaris* foi o parasita de maior ocorrência em suas pesquisas (TELES, COSTA, GONÇALVES, 1999; PASSAMANI et al., 2000; RENDÓN,

VELÁSQUEZ, CISNEROS, 2000; ROBERTSON & GJERDE, 2000; PAULINO, CASTRO, THOMAZ-SOCCOL, 2001).

O maior percentual de amostras positivas para este parasita, nos estudos mencionados, pode ser em decorrência do baixo padrão de vida da população atendida; da falta de serviços sanitários; da alta rotatividade da população (turismo de baixo poder econômico); da ineficiência da ETE em estabilizar o lodo, o que não permite a eliminação do parasita; ou, até mesmo, da identificação incorreta do ovo de *Ascaris* spp., que se assemelha muito ao ovo do *Toxocara* sp.

Paulino e colaboradores (2001) sugeriram, ainda, que a alta frequência detectada poderia ser em decorrência da própria constituição do ovo de *Ascaris* spp., que tem três membranas espessas, que lhe conferem maior resistência e permitem ao parasita sobreviver por períodos longos no meio ambiente.

V. Conclusões

- A inclusão da pré-limpeza do lodo, por sedimentação espontânea, e pré-lavagem do sobrenadante formado, com Pérolas Magnéticas Biomag[®] reduziu a quantidade das partículas interferentes no processo da separação imunomagnética;
- O uso de tubos de 15mL para a sedimentação espontânea do lodo e de 6mL para o processamento da SIM, aumentou o percentual de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.;
- O ColorSeed[®], utilizado como controle positivo interno, permitiu determinar a porcentagem de recuperação e identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. para cada amostra;
- A combinação das técnicas de sedimentação espontânea do lodo e centrifugação do sobrenadante, purificação e concentração dos oocistos através da SIM e de detecção e quantificação através da IMF, mostrou ser uma ferramenta eficaz para a detecção e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em amostras lodo da ETE da CASAN – Sistema Insular, Florianópolis, SC;
- A metodologia padronizada para detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. não apresentou a mesma eficiência para detectar cistos de *Giardia* spp., nas amostras de lodo analisadas;
- O número de cistos de *Giardia* spp. por amostra analisada, detectado pela SIM-IMF, foi muito superior ao número de oocistos de *Cryptosporidium* spp., detectado nas amostras de lodo analisadas;
- A combinação das técnicas da SIM-IMF apresentou maior sensibilidade para a detecção de cistos de *Giardia* spp., em amostras de lodo, quando

comparada com a técnica de Ritchie, que não detectou cistos nas amostras analisadas;

- A técnica de Ritchie detectou a presença de ovos e larvas de helmintos (ovos com características de *Ascaris* spp./*Toxocara* sp., ovos com características de ancilostomídeos, larvas de vida livre e ovos de *Hymenolepis nana*), em 23 das 27 amostras analisadas;
- A presença de microorganismos patogênicos (protozoários e helmintos) indica maiores cuidados quanto a reciclagem agrícola do lodo, recomendando-se que o mesmo seja higienizado;
- Outros estudos são necessários para o monitoramento da presença de microorganismos patogênicos no lodo, como vírus, bactérias, e outros parasitas e, até mesmo metais pesados.

VI. Referências Bibliográficas

- AISSE, M.M.; FERNANDES, F.; SILVA, S.M.C.P. – Aspectos tecnológicos e processos. In: ANDREOLI, C.V.; LARA, A.I.; FERNANDES, F. – **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções**. Curitiba: Sanepar, 1999. p. 48-119.
- ANDREOLI, C.V. – Apresentação. In: ANDREOLI, C.V. & BONNET, B.R.P. – **Manual de métodos para análises microbiológicas e parasitológicas em reciclagem agrícola de lodo de esgoto**. Curitiba: Sanepar, 1998. p.7-9.
- ANDREOLI, C.V.; FERREIRA, A.C.; CHERUBINI, C.; TELES, C. R.; CARNEIRO, C.; FERNANDES, F. – **Higienização do lodo de esgoto**. In: **Resíduos sólidos do saneamento: processamento, reciclagem e disposição final**. Rio de Janeiro: ABES, 2001.
- ANDREOLI, V.C. & FERNANDES, F. – Aspectos metodológicos. In: ANDREOLI, C.V.; LARA, A.I.; FERNANDES, F. – **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções**. Curitiba: Sanepar, 1999. p. 21-47.
- ASH, L.R. & ORIHEL, T.C. – *Cryptosporidium parvum*. In: _____ - **Atlas of human parasitology**. 4th ed. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1997. p.124-125.
- BARD, D.G. & WARD, B.B. - Species-specific bacterial productivity method using immunomagnetic separation and radiotracer experiments. **Journal Microbiology Methods**, **28**:207-219, 1997.
- BODLEY-TICKELL, A.T.; KITCHEN, S.E.; STURDEE, A.P. – Occurrence of *Cryptosporidium* in agricultural surface waters during an annual farming cycle in lowland, UK. **Water Research**, **36**: 1880–1886, 2002.
- BONNET, B.R.P.; LARA, A.I.; DOMASZAK, S.C. – Indicadores biológicos de qualidade sanitária do lodo de esgoto. In: ANDREOLI, C.V. & BONNET, B.R.P. - **Manual de métodos para análises microbiológicas e parasitológicas em reciclagem agrícola de lodo ativado**. Curitiba: Sanepar, 1998. 80p.
- BRANDONISIO, O.; PORTINCASA, F.; TORCHETTI, G.; LACARPIA, N.; RIZZI, A.; FUMAROLA, L.; DANADIO, F.; CARMINEO, D. – *Giardia* and *Cryptosporidium* in water: evaluation of two concentration methods and occurrence in wastewater. **Parasitologia**, **42**: 205-209, 2000.
- BUKHARI, Z. & SMITH, H.V. – Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. **Journal of Clinical Microbiology**, **33(10)**: 2592-2595, 1995.

- 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 Science Technology**, **35(11)**: 385-390, 1997.
- CALL, J.L.; ARROWOOD, M.; XIE, L.; HANCOCK, K.; TSANG, C.W. – Immunoassay for viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in turbid environmental water samples. **Journal Parasitology**, **87(1)**: 203-210, 2001.
- CARRARO, E.; FEA, E.; SALVA, S.; GILLI, G. – Impact of a wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in a surface water. **Water Science and Technology**, **41(7)**: 31 – 37, 2000.
- CARVALHO, P. C. T. – Compostagem. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. – **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001. p. 181-208.
- CASAN – **COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO**. Disponível em: http://www.casan.com.br/saude_ete.htm
- CENTENO, A.J. – **Curso de estatística aplicada à biologia**. 2.ed. Goiânia: UFG, 1999. 234p.
- CHAPMAN, P.A.; MALO, A.C.T.; SIDONS, C.A.; HARKIN, M. - Use of commercial enzyme immunoassays and immunomagnetic separation systems for detectig *Escherichia coli* O157 in bovine fecal samples. **Applied Environmental Microbiology**, **63**: 2549-2553, 1997.
- CHÁVEZ, G.M.; TOSCANO, C.F.; MÁRQUEZ, R.L. – Aplicación del procesamiento termico y alcalino para la desinfeccion de lodos residuales primarios: um estudio comparativo. In: CONGRESO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27, Porto Alegre, 2000. **Anais**. I-169.
- CHERNICHARO, C.A.L. – Biomassa nos sistemas anaeróbios. In: _____ - **Reatores anaeróbios. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: SEGRAC, 1997. v.5. p.79.
- CIMERMAN, B. & CIMERMAN, S. – Importância da Parasitologia. In: _____ - **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 3-4.
- COSTA, A.N.; RODRIGUES, C.; TELES, C.R.; KROHLING, B. – Reciclagem agrícola do lodo de lagoas de estabilização. In: GONÇALVES, R.F. –

Gerenciamento do lodo de lagoas de estabilização não mecanizadas.
Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 69-76.

- CURRENT, W.L. – *Cryptosporidium parvum*: household transmission. **Annals International Medical**, **120**: 518-519, 1994.
- DE CARLI, G.A. – Parasitos emergentes e oportunistas: métodos de coloração para coccídios intestinais. In: _____. ed. – **Parasitologia clínica. Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas.** São Paulo: Atheneu, 2001. p. 211-288.
- DE CARLI, G.A. & SARAIVA, P.J. – Diagnóstico de laboratório da criptosporidiose humana. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, **23(2)**: 26-30, 1991.
- DENG, M.Q.; CLIVER, D.O.; MARIAM, T. W. - Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. **Applied Environmental Microbiology**, **63**: 3134-3138, 1997.
- DENG, M.Q.; DAY, S.P.; CLIVER, D.O. - Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. **Applied Environmental Microbiology**, **60**: 1927-1933, 1994.
- DI GIOVANNI, G.D.; HASHEMI, F.H.; SHAW, 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. **Applied and Environmental Microbiology**, **65(8)**: 3427-3432, 1999.
- DU PONT, H.L.; CHAPPEL, C.L.; STERLING, C.R.; OKHUYSEN, P.C.; ROSE, J.B.; JAKUBOWSKI, W. – The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. **New England Medicine**, **332**: 855-859, 1995.
- ENROTH, H. & ENGSTRAND, L. - Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. **Journal Clinical Microbiology**, **33**: 2162-2165, 1995.
- FARTHING, M.J.G.; CEVALLOS, A .M.; KELLY, P. – Intestinal protozoa. In: COOK, G.C., ed. – **Manson's tropical diases.** 18.ed. London: WB Saunders Company, 1996. p.1255-1297.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. – Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, **30**: 1305-1322, 2000.
- 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, A.C.; ANDREOLI, C.V.; JÜRGENSEN, D. – Destino final do lodo. In: ANDREOLI, C.V. – **Uso e manejo de esgotos na agricultura**. Rio de Janeiro: ABES, 1999a. p. 26-28.
- FERREIRA, A.C.; ANDREOLI, C.V.; JÜRGENSEN, D. – Produção e características dos biossólidos. In: ANDREOLI, C.V. – **Uso e manejo de esgotos na agricultura**. Rio de Janeiro: ABES, 1999b. p. 17-25.
- FERREIRA, M.S. & NISHIOKA, S.A. – Criptosporidiose. In: CIMERMAN, B. & CIMERMAN, S. - **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 186-189.
- GARCIA, L.S. & BRUCKNER, D.A. – **Diagnostic Medical Parasitology**. 3.ed. Washington: ASM, 1997.
- GARCIA, L.S. & SHIMIZU, R.Y. – Diagnostic parasitology: parasitic infections and the compromised host. **Lab. Med.**, **24**: 205-215, 1993.
- GASPARD, P.; WIART, J.; SCHWARTZBROD, J. – Parasitological contamination of urban sludge used for agricultural purposes. **Waste Management & Research**, **15**: 429-436, 1997.
- GONÇALVES, R.F. – Formação de lodos em lagoas de estabilização anaeróbias ou facultativas primárias. In: GONÇALVES, R.F. – **Gerenciamento do lodo de lagoas de estabilização não mecanizadas**. Rio de Janeiro: ABES, 1999a. p. 7-24.
- GONÇALVES, R.F. – Introdução ao gerenciamento do lodo das lagoas de estabilização. In: GONÇALVES, R.F. – **Gerenciamento do lodo de lagoas de estabilização não mecanizadas**. Rio de Janeiro: ABES, 1999b. p. 2-5.
- GONÇALVES, R.F.; LIMA, M.R.P.; PASSAMANI, F.R.F. – Características físico-químicas e microbiológicas do lodo de lagoas. In: GONÇALVES, R.F. – **Gerenciamento do lodo de lagoas de estabilização não mecanizadas**. Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 25-37.
- GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; FAYER, R. – Recovery of waterborne oocysts of *Cryptosporidium* from water samples by membrane-filter dissolution method. **Parasitology Research**, **83**: 121-125, 1999.
- GREINERT, J.A. – Avaliação de técnicas para detecção e quantificação de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de piscina. Florianópolis, 2002. (Dissertação – Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina).

- HEYNEMAN, D. – Parasitologia médica. In: BROOKS, G.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L.N.; JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. – **Microbiologia médica**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- HEYWORT, M.F. – Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **Journal Infections Disease**, **66**: 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. **Parasitology Research**, **87**: 472-474, 2001.
- IBGE – **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>
- ILHENFELD, R.G.K.; ANDREOLI, C.V.; LARA, A.I. – Higienização do lodo de esgoto. In: ANDREOLI, C.V. – **Uso e manejo de esgotos na agricultura**. Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 34-45.
- ILHENFELD, R.G.K.; PEGORINI, E.S.; ANDREOLI, C.V. – Fatores limitantes. In: ANDREOLI, C.V. – **Uso e manejo de esgotos na agricultura**. Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 46-63.
- IMHOFF, R & IMHOFF, R. – Dimensionamento e planejamento das estações de tratamento de esgotos. In: _____ - **Manual de tratamento de águas residuárias**. 26.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1986. p. 22.
- KELLNER, K. & PIRES, E.C. ed. – **Lagoas de estabilização: projeto e operação**. Rio de Janeiro: ABES, 1998. 244p.
- 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. **Journal Clinical Microbiology**, **32**: 3072-3074, 1994.
- KUCZYNSKA, E.; SHELTON, D.R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Feces, Manures, and Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, **65(7)**: 2820-2826, 1999.
- LARA, I.A. – Antecedentes, In: ANDREOLI, C.V.; LARA, A.I.; FERNANDES, F. – **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções**. Curitiba: Sanepar, 1999.
- LIMA, D.J. – *Sarcocystis*, *Isospora* e *Cryptosporidium*. In: NEVES, D.P., ed. – **Parasitologia humana**. 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 157-163.
- LLOYD, B.J. & FREDERICK, G. L. – Parasite removal by waste stabilisation pond systems and the relation ship between concentrations in sewage and prevalence in the community. **Water Science and Technology**, **42(10)**: 375–386, 2000.

- MARSHAL, M.M.; NAUMOVITZ, D.; ORTEGA, T.; STERLING, C.R. – Waterborne protozoan pathogens. **Clinical Microbiology Ver.**, **10**: 67-85, 1997.
- MAVRIDOU, A.; KOULOUBIS, P.; VASSALOU, E.; RIGAS, F.; VAKALIS, N. – Microbiological quality of sewage sludge in Greece disposed for agricultural use. **International Journal of Environmental Health Research**, **11**: 275-279, 2001.
- McCUIN, R.M.; BUKHARI, Z.; SOBRINHO, J.; CLANCY, J.L. – Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water concentrates using immunomagnetic separation. **Journal Microbiology Methods**, **45**: 69-76, 2001.
- MEDEIROS, M.L.B.; SOCCOL, V.T.; CASTRO, E. A.; TOLEDO, E.B.S.; BORGES, J.C.; PAULINO, R.C.; SILVA, S.M.C.P.; ANDRAUS, S. – aspectos sanitários. In: ANDREOLI, C.V.; LARA, A.I.; FERNANDES, F. – **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções**. Curitiba: Sanepar, 1999. p. 120-179.
- MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; MELO, V.P. – O uso agrícola do biossólido e as propriedades do solo. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. – **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001. p. 289-363.
- MIKI, M.K.; ANDRIGUETI, E.J.; SOBRINHO, P.A. Tratamento da fase sólida em estações de tratamento de esgotos. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. – **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001. p. 41-87.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; LOBAYASHI, G.S.; PZALLER, M.A. – **Microbiologia médica**. – In: _____. – 3.ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 513.
- NETO, J.L.A. & ASSEF, M.C.V. – Critosporidiose e microsporidiose. In: VERONESI, R. & FOCACCIA, R., ed. – **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1170-1173.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SLUD – **Las condiciones de la salud en las américas**. Washington: OPAS, 1994. v.1.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Atenção primária ambiental. (APA). Washington: OPAS, 2000.
- PASSAMANI, F.R.F.; TAVEIRA, E.J.A.; FIGUEIREDO, R.F.; MOTTA, J.S.; GONÇALVES, R.F. – Presença e viabilidade de ovos de helmintos em

- lodo de lagoa de estabilização anaeróbia. In: IX Silubesa – Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto Seguro, Bahia, 9 a 14 de abril de 2000.
- PASSAMINI, F.R.F. & GONÇALVES, R.F. – Higienização de lodos de esgotos. In: GONÇALVES, R.F. – **Gerenciamento do lodo de lagoas de estabilização não mecanizadas**. Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 64-67.
- PAULINO, R.C.; CASTRO, E.A.; THOMAZ-SOCCOL, V. – Tratamento anaeróbio de esgoto e sua eficiência na redução da viabilidade de ovos de helmintos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. **34(15)**: 421-428, 2001.
- PEREIRA, M.G.G.; 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* oocysts in adult bovine feces. **Applied and Environmental Microbiology**, **65(7)**: 3236-3239, 1999.
- REIS, M.F.P.; BIDONE, F.R.A.; GEHLING, G.R. - Produção de macro e micro nutrientes através da compostagem de resíduos orgânicos provenientes das podas urbanas codispostos com resíduos da Ceasa e lodo de estação de tratamento de esgotos. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27, Porto Alegre, 2000. **Anais**. III-070.
- RENDÓN, C.M.; VELÁSQUEZ, G.S.; CISNEROS, B.E.J. – Frecuencia e variación estacional de los géneros de huevos de helmintos más comúnmente encontrados en aguas residuales de México. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27, Porto Alegre, 2000. **Anais**. I-097.
- REY, L. – Os esporozoários e as coccidioses. In: _____. ed. – **Parasitologia. Parasitas e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.311-320.
- RIMHANEN-FINNE, R.; RONKAINEN, P.; HÄNNINEN, M.L. – Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage ludge by IC-PCR. **Journal of Applied Microbiology**, **91**: 1030-1035, 2001.
- ROBERTSON, L. J. & GJERDE, B. – Isolation and enumeration of *Giardia*, cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *Ascaris* eggs from fruits and vegetables. **Journal of Food Protection**, **63(6)**: 775-778, 2000.
- ROBERTSON, L.J. & GJERDE, B. – Factores Affecting recovery efficiency in isolation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from vegetables for standard method development journal of food protection. **Journal of Food Protection**, **64(11)**: 1799-1805, 2001.

- ROBERTSON, L.J.; PATON, C.A.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, P.G.; JACKSON, M.H.; GILMOUR, R.A.; BLACK, S.E.; STEVENSON, D.A.; SMITH, H.V. – *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. **Water Research**, **34(8)**: 2310-2322, 2000.
- ROBERTSON, L.J.; SMITH, P.G.; GRIMASON, A.T.; SMITH, H.V. – Removal and destruction of intestinal parasitic protozoans by sewage treatment processes. **International Journal of Environmental Health Research**, **9**: 85-96, 1999.
- ROCHELLE, P.A.; DE LEON, R.; JOHNSON, A.; STEWART, M.H.; WOLFE, R. L. - Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, **65(2)**: 841-845, 1999.
- 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. **Applied Environmental Microbiology**, **65(2)**: 841-845, 1999.
- 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. **Applied Environmental Microbiology**, **55(12)**: 3189-3196, 1989.
- ROTARIU, O.; STRACHAN, N.J.C.; BADESCU, V. – Some aspects concerning the design of an immunomagnetic separation process. **Czechoslovak Journal of Physics**, **52(5)**: 719-724, 2002a.
- ROTARIU, O.; STRACHAN, N.J.C.; BADESCU, V. – Modelling of microorganisms capture on magnetic carrier particles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, **252**: 390-392, 2002b.
- SAFARÍK, I. & SAFARIKOVÁ, M. – Use of magnetic techniques for the isolation of cells. **Journal Chromatography**, **722**: 33-53, 1999.
- SANTOS, A.C.P. & KRESPKY, K. ed – **Saneamento básico**. Gazeta Mercantil, 1998.
- SCHWAB, K.J.; DE LEON, R.; SOBSEY, M.D. - Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. **Applied Environmental Microbiology**, **62**: 2086-2094, 1996.
- SEMENAS, L.; BRUGNI, N.; VIOZZI, G.; KREITER, A. – Control of parasites in domestic sewage. **Journal of Public Health**, **33(4)**: 379-384, 1999.

- SILVA, S.A. & MARA, D.D. ed. – **Tratamentos biológicos de águas residuárias: lagoas de estabilização**. Rio de Janeiro: ABES, 1979. 138p.
- SILVA, T.C.R. & Da-RIN, B.P. – Caracterização da biota de uma estação experimental de tratamento de esgotos em diferentes idades do lodo. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27, Porto Alegre, 2000. **Anais**. I-093.
- SOBRINHO, P.A. – Tratamento de esgoto e geração de lodo. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P.C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. – **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001. p. 7-40.
- SOCOL, V.T.; PAULINO, R.C.; CASTRO, E.A. – Metodologia de análise parasitológica em lodo de esgoto. In: ANDREOLI, C.V. & BONNET, B.R.P. – **Manual de métodos para análises microbiológicas e parasitológicas em reciclagem agrícola de lodo de esgoto**. Curitiba: Sanepar, 1998. p.27-35.
- SOCOL, V.T.; PAULINO, R.C.; CASTRO, E.A. – Agentes patogênicos: helmintos e protozoários. In: ANDREOLI, C.V.; LARA, A.I.; FERNANDES, F. – **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções**. Curitiba: Sanepar, 1999. p. 156-175
- SODRÉ, F.C. & FRANCO, R.M.B. – Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. **33(2)**: 97-107,2001.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. – **Biometry**. 3. ed. New York: W . H. Freeman, 1995. 850p.
- SOUZA D.S.M. – Avaliação de técnicas de diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia* em fezes humanas. Florianópolis, 2002. (Dissertação – Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina).
- SOUZA, D.S.M.; STEINDEL, M.; BARARDI, C.R.M. - Padronização da metodologia da imunoseparação magnética acoplada à imunofluorescência na detecção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE INFECTOLOGIA**, 12, Rio de Janeiro, 2001.
- SPERLING, V.M., ed. – **Lodos ativados: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: UFMG, 1997. 416p.
- TELES, C. R.; COSTA, A. N.; GONÇALVES. R. F. – Produção de lodo em lagoas de estabilização e o seu uso no cultivo de espécies florestais na região sudoeste do Brasil. **Revista Técnica da Sanepar**, **12**: 854-864,

2002.

- TSUTIYA, M.T. – Alternativas de disposição final de bioossólidos. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. – **Bioossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001b. p. 133-180.
- TSUTIYA, M.T. – Características de bioossólidos gerados em estações de tratamento de esgotos. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. – **Bioossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001a. p. 89-131.
- TZIPORI, S. – Criptosporiosis in perspective. **Advanced Parasitology**, **27**: 63-129, 1998.
- UEHARA, M.Y. & VIDAL, W.L., ed. – **Operação e manutenção de lagoas anaeróbias e facultativas**. São Paulo: CETESB, 1989. 91p.
- USEPA – **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/IFA**. EPA/821-R-99/001. USEPA, Office Of Ground Water and Drinking Water, Washington, 1999.
- VANZO, J.E. – Horizonte histórico da reciclagem. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P.C. T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. – **Bioossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001. p. 1-5.
- VANZO, J.E.; MACEDO, L.S.; TSUTIYA, M.J. – Registros de produção de bioossólidos. O caso da ETE Franca. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. – **Bioossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001. p. 227-242.
- VANZO, J.E.; MACEDO, L.S.; TSUTIYA, M.T. - ETE-Franca uma estação que além de tratar os esgotos, produz insumos agrícolas. In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais**. Porto Alegre, 3 a 8 dezembro de 2000.
- 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, 1994. v.42. p. 489-522.
- 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. **Journal Applied Bacteriology**, **75**: 87-90, 1993.

- XIAO, L.; SING, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T.K.; GRADUS, S.; LAL, A. - Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, **67(3)**: 1097–110, 2001.
- XIAO, L.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; A LAL, A. – Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. – **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, **93(5)**: 687-692, 1998.
- YAKUB, G.P.; STADTERMAN-KNAUER, K.L. - Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, **66(8)**: 3628-3631, 2000.
- ZERBINI, A.M. & CHERNICHARO, C.A.L. – Metodologias para quantificação, identificação e análise de viabilidade de ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados. In: _____. ed.- **Pós tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. Aspectos metodológicos**. Belo Horizonte: Prosab, 2001. p.71–107.
- 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. **Journal Clinical Microbiology**, **34**: 1903-1907, 1996.
- ZUCKERMAN, U.; GOLD, D.; SHELEF, G.; ARMON, R.; The presence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in surface waters and effluents in Israel. – **Water Science Technology**, **11-12**: 381-384, 1997.