Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Genotipagem de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras de águas superficiais e recreacionais como fonte de informação da dispersão de espécies no ambiente

Ronalda Silva de Araújo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública
Orientador (a): Profa. Associada Maria Helena Matté

São Paulo
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Ronalda Silva de Araújo

Genotipagem de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras de águas superficiais e recreacionais como fonte de informação da dispersão de espécies no ambiente

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública
Orientador (a): Profa. Associada Maria Helena Matté

São Paulo
2008

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Victor Hugo, pela minha ausência durante a realização deste trabalho e por ser minha fonte de inspiração e vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu pai, que com sua simplicidade me ensinou algo valioso, determinação.

Ao meu marido, pelo inestimável apoio, paciência e incentivo constante em minha realização profissional.

Ao meu amigo Adriano, pelo carinho, dedicação e apoio intelectual.

As minhas amigas, Milena, Martha e Lívia (Xungão) pela amizade, orientação, trabalho em equipe, por tudo que vivemos juntas nos últimos 3 anos e principalmente por saber que sempre posso contar com vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga, Profa. Maria Helena Matté por me propor o desafio de realizar este trabalho, pela paciência, confiança e oportunidade de amadurecimento intelectual.

Ao Prof. Glavur Rogério Matté, pelas sugestões durante desenvolvimento deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação pelo suporte financeiro no início deste estudo.

À Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), pelo fornecimento das amostras e interesse na realização deste trabalho.

À Dra. Maria Inês Zanoli Sato, Gerente do Departamento de Análises Ambientais da CETESB pelas valiosas sugestões e utilização de dados dados referentes as amostras de águas superficiais, contribuindo com o desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela orientação e contribuição dispensada durante os estudos de análises filogenética.

A Profa. Dra. Maria Tereza Pepe Zanolli do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela atenção e orientação durante finalização deste trabalho.

À Dra. Therezinha Travassos Ribeiro de Carvalho, pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Miriam Lopes da Silva e Lícia Fernades Natal, do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP, que gentilmente e pacientemente colaboraram com este projeto.

À minha querida amiga Dra. Elenice Messias Gonçalves, pelo carinho e atenção e por abrir as portas do Laboratório de Parasitologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, permitindo o aprimoramento dos meus estudos em parasitologia.

Á Solange Martone Rocha e Maria do Carmo de Oliveira Dória do Laboratório de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela colaboração na realização das coletas de água em São Sebastião.

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-06/ 01532-2).

RESUMO

Araújo S. R. **Genotipagem de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras de águas superficiais e recreacionais como fonte de informação da dispersão de espécies no ambiente, 2006-2008. São Paulo; 2008.** [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

As doenças causadas por patógenos emergentes e oportunistas são uma grande preocupação para os profissionais de Saúde Pública. A criptosporidiose é uma doença cosmopolita, cujo agente etiológico é o protozoário coccídia *Cryptosporidium.* Este parasita emergiu como um importante patógeno de veiculação hídrica, responsável por surtos em diferentes países e atualmente é considerado um problema para indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes. A taxonomia do gênero, baseada em aspectos morfológicos, é de difícil realização devido ao reduzido tamanho dos oocistos e também devido à perda de suas características morfológicas, principalmente em amostras ambientais. Essa limitação estimulou a aplicação de métodos moleculares na identificação das espécies destes microrganismos. Neste estudo, amostras de águas superficiais foram submetidas à *nested*-PCR para detecção de *Cryptosporidium*. No total 30 amostras de águas de 10 pontos de coleta situados no estado de São Paulo foram analisadas. *Cryptosporidium* foi detectado em 30% das amostras analisadas e a genotipagem permitiu a identificação de *C. hominis*, *C. meleagridis* e *C. andersoni.* Embora a identificação de *Cryptosporidium* em amostras ambientais seja uma tarefa complexa, os métodos moleculares são essenciais para determinação de espécies, ajudando a elucidar a epidemiologia deste protozoário em nosso país.

Palavras-chave: Biologia Molecular; *Cryptosporidium*; Genotipagem; Protozoários Emergentes; saúde pública.

ABSTRACT

Araújo S. R. **Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from superficial and recreational waters samples as source of information of species dispersion in the environment, 2006-2008. São Paulo; 2008.** [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

The illnesses caused by emerging and opportunist pathogens are a great concern for Public Health professionals. Criptosporidiosis is a cosmopolitan disease, whose etiologic agent is the coccidian protozoan *Cryptosporidium*. This parasite has emerged as an important waterborne pathogen, responsible for outbreaks in different countries, and it is currently considered a problem for immunocompromised and immunocompetent patients. The taxonomy of the genus, based on morphologic aspects, is of difficult accomplishment due to the small size of the oocysts, and also due to loss of its characteristics, mainly in environmental samples. This limitation has estimulated the application of molecular methods for species identification of these microorganisms. In this study, superficial water samples were submitted to nested-PCR to detect the presence of *Cryptosporidium.* A total of 30 water samples, from 10 points located in the state of São Paulo, were analyzed. *Cryptosporidium* was detected in 30% of the studied samples and genotyping allowed the identification of *C. hominis, C. meleagridis* and *C. andersoni*. Although the identification of *Cryptosporidium* in environmental samples is a complex task, molecular methods are essential for the species determination, helping to elucidate the epidemiology of this protozoan in our country.

Key words: Molecular Biology; *Cryptosporidium*; Genotyping; Emerging Protozoan; Public Health.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 16

1.1 *Cryptosporidium* spp 16

1.2 Taxonomia 20

1.3 Mecanismos de transmissão e biologia do parasita 24

1.4 Manifestações clínicas 26

1.5 Diagnósticos laboratoriais da criptosporidioses 29

1.6 Epidemiologia 31

1.7 Ocorrência e Detecção de *Cryptosporidium* no meio ambiente 38

1.8 Ferramentas moleculares aplicadas em estudos de identificação de *Cryptosporidium* 43

2. OBJETIVOS 48

2.1 Objetivo geral 48

2.2 Objetivos específicos 48

3. MATERIAL E METODOS 49

3.1 Amostragem 49

3.1.1 Locais e periodicidade das coletas 49

3.1.2 UGRHI 02 – Bacia do Rio Paraíba do Sul 52

3.1.3 UGRHI 05 – Bacia do Rio Piracicaba, Capivari e Jundiaí 53

3.1.4 UGRHI 06 – Bacia do Alto do Tietê 54

3.1.5 UGRHI 07 – Baixada Santista 54

3.2 Procedimento para concentração das amostras 56

3.3 Métodos moleculares 57

3.3.1 Extração do DNA genômico de *Cryptosporidium* 57

3.3.2 Amplificação do DNA pela reação em cadeia pela polimerase dupla (*Nested*) 58

3.3.3 Eletroforese em gel de agarose 62

3.4 Genotipagem dos isolados nas amostras ambientais 63

3.4.1 Clonagem do fragmento amplificado 63

3.4.2 Seqüenciamento do fragmento clonado 64

4. RESULTADOS 66

4.1 Detecção de *Cryptosporidium* nas amostras de águas superficiais e recreacionais. 66

4.2 Resultados da otimização das técnicas de concentração e extração do DNA de *Cryptosporidium.* 68

4.3 Caracterização de *Cryptosporidium* por métodos moleculares 69

5. DISCUSSÃO 76

6. CONCLUSÃO 94

7. RECOMENDAÇÕES 95

8. BIBLIOGRAFIA 96

9. ANEXOS 118

Anexo 1 - Esquema do protocolo de filtração em membranas (ARAUJO et. al., 2006).

Anexo 2 - Esquema do protocolo de extração de DNA (ARAUJO et. al., 2006).

Anexo 3 - Parecer da Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBIO).

Anexo 4 - GONÇALVES, E.M.N.; ARAÚJO, R.S.; ORBAN, M.; MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H.; CORBETT, C.E. Protocolo for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples**. Inst. Med. Trop. S. Paulo,** v. 50, n. 3, p. 165 – 167, 2008.

Anexo 5 - ARAÚJO, R.S.; CARVALHO, R.T.T.; MATTE, G.R.; FERNANDES, L.N.; BALSALOBRE, L.C.; MATTÉ, M.H. Modified method for detection of *Cryptosporidium* oocysts using DNA templates extracted from envinmental samples. **Rev. Vigil. San.,** v. 3, p.3-4, 2006.

Anexo 6 - ARAUJO, R.S.; CARVALHO-ALMEIDA, T.T.; MATTÉ. G.R.; ROJAS, M.V.R.; PEREIRA, A.; MATTÉ, M.H. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água salobra. **Bial.,** v.15, n.2, p. 31-32, 2005.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do *Cryptosporidium* com os estágios reprodutivos. 26

Figura 2. Vista parcial do ponto de coleta das amostras localizado sob a ponte do Pontal da Cruz, São Sebastião, São Paulo. 50

Figura 3. Vista panorâmica do ponto de coleta das amostras sob a influência de águas salinas. 50

Figura 4. Unidades de gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) do estado de São Paulo. 51

Figura 5. Esquema representativo das regiões variáveis e posição dos iniciadores dentro do gene *18S rRNA* para identificação de *Cryptosporidium.* 59

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos purificados após amplificação pela nested-PCR para a seqüência 214 pb. M, peso molecular (50pb), canaleta 1,2,3,4,6,7,8,9,10 amostras negativas referentes ao Ribeirão da Fazenda, canaleta 5 amostra positiva do Ribeirão da Fazenda. 69

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos amplificados pela *nested*-PCR para a seqüência 826pb. M, Peso molecular; Controle positivo; Canaleta 1, amostra Ribeirão da fazenda, positiva; Canaleta 2, amostra Ribeirão da fazenda, negativa. 70

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos amplificados nas reações de *nested*-PCR para o fragmento de 214pb. M, Peso molecular; Canaleta 1, R. Piracicaba captação Piracicaba; Canaleta 2, R. Cotia capitação ETA do Baixo Cotia; Canaleta 3: R.

Piracicaba captação Americana; Canaleta 4, R. Paraíba captação Aparecida; Canaleta 5, R. Piracicaba Americana-Cariobá; Canaleta 6, R. Atibaia captação Atibaia; Canaleta 7, Rio Atibaia captação Campinas; Canaleta 8, R. Capivari Campinas; Canaleta 9, Represa de Guarapiranga; Canaleta 10, Canal de FugaII Usina H. Borden. 71

Figura 9. Colônias contendo clones positivos e negativos na reação. 72

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto amplificado com iniciadores M13 pela PCR. M, Peso molecular, Canaletas 1,2,3,4,6, amostras clonadas da Represa de Guarapiranga negativas para presença do inserto; Canaleta 5, amostra clonada da represa de Guarapiranga positiva contendo o inserto. 73

Figura 11. Esquema da posição dos iniciadores 214pb : SL2 F e SCR2 R destacados em preto e as regiões polimórficas utilizadas para comparação das seqüências obtidas com as seqüências disponíveis no GenBank destacadas na textura. 74

Figura 12. Árvore filogenética baseada no método neighbor-joining, utilizando a seqüência parcial do gene *18S rRNA* (186 pb) de diferentes espécies de *Cryptosporidium* e valores de Bootstrap após 1000 simulações. As seqüências das diferentes espécies são originárias do banco de dados GenBank e as demais denominadas clones 13-9, 14-13 e 31-24 são oriundas de banco de dados do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de amostras apresentando valores de turbidez, DBO, DQO, OD, CTt, segundo os pontos de coleta e condições do tempo. 55

Tabela 2- Resultados obtidos contendo reações positivas e negativas para a genotipagem de *Cryptosporidium* nas amostras estudadas. 67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Nomeclatura das espécies de *Cryptosporidium* nomeadas de acordo com hospedeiro em que foram isoladas. 22

Quadro 2- Lista de iniciadores empregados para amplificação do fragmento *18S rRNA* de *Cryptosporidium*. 60

Quadro 3- Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de águas superficiais em diferentes países disponíveis na literatura consultada. 88

1. INTRODUÇÃO

1.1 – *Cryptosporidium* spp.

O parasita *Cryptosporidium* é um protozoário intracelular obrigatório que se desenvolve preferencialmente nas microvilosidades de células epiteliais do trato gastrintestinal, respiratório e urinário podendo atingir uma variedade de hospedeiros, inclusive o homem. Esse protozoário tem sido responsável por um crescente número de surtos de doença gastrintestinal em todo mundo (FERREIRA & BORGES, 2002; CAREY et al., 2004).

Sua primeira descrição ocorreu em 1907 por Ernest Edward Tyzzer, após observar esse organismo presente em glândulas gástricas de camundongos assintomáticos. Em 1910, Tyzzer propôs o gênero *Cryptosporidium* e denominou a primeira espécie encontrada de *C. muris.* Dois anos depois uma nova espécie o *C. parvum* com tamanho inferior a primeira foi identificada pelo mesmo autor, localizada em células intestinais de camundongos de laboratório (TYZZER, 1910; FAYER et al., 2000).

Outra espécie importante *C. meleagridis* foi primeiramente demonstrada como o agente responsável por quadros diarréicos em aves domésticas, nesta ocasião sua função patogênica não estava bem elucidada, hoje em dia sabe-se que essa é a terceira espécie mais comum identificada no homem (SLAVIM, 1955; XIAO et al., 2004).

Desde sua primeira descrição, o *C. parvum* foi considerado por várias

décadas um patógeno raro e oportunista. Em 1971 ele despertou o interesse veterinário após ser identificado como agente associado a surtos de diarréia em bezerros. Desde então, inúmeros casos em diferentes animais estão sendo identificados e novas espécies e genótipos têm sido descobertos e descritos tanto no homem como em diversos animais (CURRENT & GARCIA, 1991; FAYER et al., 2000; XIAO et al., 2004).

O caráter zoonótico das espécies de *Cryptosporidium* foi constatado a partir de experimentos de transmissão cruzada. Assim, naquela ocasião foi observado que não havia diferença morfológica entre oocistos eliminados pelo homem e pelos bovinos e esses oocistos eram infectantes para outros bovinos e também para camundongos (LALLO, 1993).

Os primeiros relatos de infecção humana foram descritos em 1976 nos Estados Unidos e alguns anos depois mais onze casos foram identificados em diferentes países. Nos anos 80 o *Cryptosporidium* foi reconhecido como emergente e oportunista devido a um aumento significante de casos em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), causando graves quadros de diarréia crônica e de difícil tratamento (GUIZELINI, 1991; FAYER et al., 2000).

Acreditava-se que a criptosporidiose ocorresse somente em indivíduos com algum tipo de imunodepressão, contudo nos últimos anos estudos demonstram que a doença é relativamente freqüente em indivíduos imunocompetentes. Assim como ocorre com outras doenças diarréicas, as infecções causadas por *Cryptosporidium* podem ser auto-limitadas e com sintomas brandos. Esta característica desfavorece a busca por atendimento

médico e conseqüentemente leva a ausência de diagnóstico, gerando sub-notificação da doença e falta de informação quanto à ocorrência de surtos (PENG et al., 2003).

No Brasil, à semelhança de outros países, as pesquisas relacionadas ao parasita *Cryptosporidium* iniciaram-se por volta de 1980 após o diagnóstico da infecção em pacientes HIV positivos, transplantados renais e com desnutrição grave, devido ao comprometimento imunológico desses pacientes (CARVALHO-ALMEIDA, 2004; GOMES et al., 2004; BACHUR et al., 2008).

Contudo, existem muitas dúvidas a respeito da epidemiologia da criptosporidiose, visto que os animais infectados são potenciais fontes de transmissão e disseminação no ambiente e que o agente possui baixa especificidade hospedeira tornando difícil estabelecer realmente os elos da cadeia de transmissão da doença (TZIPORI, 2002; FAYER, 2004).

Na década de 90, o parasita emergiu como um importante agente de surtos de veiculação hídrica, particularmente nos Estados Unidos e Reino Unido, desde então, muitos casos têm sido relatados tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Deste modo, estudos epidemiológicos sugerem que a contaminação dos recursos hídricos com oocistos representa um importante fator para o desenvolvimento e transmissão da criptosporidiose (FAYER, 2004; FAYER et al., 2005; DAWSON, 2005).

Características próprias do parasita *Cryptosporidium* reforçam seu potencial para transmissão através da água. Seu ciclo biológico é

desenvolvido em um único hospedeiro, podendo atingir um número significante de reservatórios que podem eliminar grande quantidade de oocistos infectantes através das fezes; a transmissão zoonótica aumenta o potencial para ocorrência de infecção no homem e conseqüentemente, sua eliminação no ambiente. Os oocistos são resistentes às barreiras químicas e pequenos suficientes para ultrapassa-las quando utilizadas no tratamento da água dificultando sua remoção (KARANIS et al., 2007).

Nos Estados Unidos o sistema de vigilância ativa de doenças de origem alimentar (FoodNet) incluiu desde 1997, dentre outros microrganismos, a coleta de dados de casos de criptosporidiose. No Brasil, a Portaria n° 518/2004 do Ministério da Saúde, substituiu a Portaria n°1469/2000, que já recomendava a inclusão da pesquisa de organismos patogênicos em águas de consumo humano, entre eles oocistos de *Cryptosporidium* spp. visando padrões de potabilidade (BRASIL, 2004).

O estudo da extensão da contaminação de águas superficiais com espécies de *Cryptosporidium*, bem como a determinação das diferentes espécies que possam contaminar o homem está descrita na literatura que aborda o tema das protozoonoses emergentes (CHALMERS et al., 2005).

Entretanto, as técnicas moleculares têm comprovado a freqüência de infecção pelo *C. hominis* e *C. parvum* no homem, porém outras espécies e novos genótipos têm sido identificados na população humana sugerindo que a dinâmica de transmissão da criptosporidiose pode ser mais complexa do que se tem relatado na literatura (KATSUMATA et al., 2000; GIBBONS-

MATTHEWS & PRESCOTT, 2003; KASSA et al., 2004; CHALMERS et al., 2005).

De um modo geral, a transmissão entre pessoas infectadas pode ser facilitada nos grandes centros urbanos onde a densidade populacional é maior. Entretanto, existe uma dificuldade para se distinguir entre os casos de infecção primária como, por exemplo, através da água contaminada ou secundária pelo contato com fômites e pessoas contaminadas (EPA, 2005).

Além disso, a real distribuição do parasita na população mundial ainda está pouco elucidada, a distribuição de *C. homins* e *C. parvum* no homem em diferentes regiões geográficas, provavelmente ocorre devido a diferentes rotas de transmissão. Em países como Estados Unidos da América e na Austrália o *C. hominis* é a espécie mais associada a casos de criptosporidiose humana, já na Europa ocorre uma maior prevalência de *C. parvum* (genótipo bovino) (XIAO & RYAN, 2004; WHO, 2006).

Contudo, novos métodos de detecção de *Cryptosporidium* spp. têm sido desenvolvidos e padronizados com aplicação em estudos epidemiológicos, afim de esclaracer os mecanismos de transmissão e as fontes de contaminação de *Cryptosporidium* ao homem (XIAO & RYAN, 2004).

1.2 – Taxonomia

Taxonomicamente, esse parasita pertence ao Phylum Apicomplexa (protozoário que possui complexo apical); Classe Sporozoasida (ciclo

reprodutivo exibindo fase assexuada e sexuada com formação de oocistos); Sub-classe Coccidiasina (ciclo de vida envolvendo merogonia, gametogonia e esporogonia); Ordem Eucoccidioridia (com merogonia presente); Sub-ordem Eimeriorina (com desenvolvimento independente de micro e macrogametas); Família Cryptosporidiidae (oocistos apresentando 4 esporozoítas e ausência de esporocistos) e Gênero *Cryptosporidium* (SODRÉ & FRANCO, 2001; FAYER, 2004).

A posição taxonômica do parasita *Cryptosporidium* apresenta grande complexidade e múltiplos parâmetros são necessários para estabelecer a identificação correta das espécies. Pesquisas moleculares utilizadas para estabelecer bases genéticas que fazem distição entre as espécies e subtipos favoreceu a compreensão de características importates do paratisita *Cryptosporidium* (WU et al., 2003; RAMIREZ et al., 2004).

O *C. parvum* apresenta um enorme potencial reprodutivo o que resulta em organismos geneticamente semelhantes, tornando sua taxonomia confusa e difícil. Nos últimos anos a caracterização molecular tem ajudado a validar várias espécies dentro do gênero *Cryptosporidium* evitando assim uma classificação errônea (XIAO et al., 2004).

A ausência de dados biológicos e pequenas diferenças genéticas analisadas do *Cryptospordium* em diversos hospedeiros, levou a denominação de um complexo que inclui diferentes subespécies denominado Complexo *C. parvum* (WIDMER et al., 2002; XIAO et al., 2004).

Atualmente 22 espécies e mais de 40 genótipos do gênero *Cryptosporidium* foram descritos, mas apenas 15 espécies são reconhecidas

como patógenos por diversos pesquisadores, sendo classificadas de acordo com alguns componentes básicos como, hospedeiro natural, morfologia dos oocistos, caracterização genotípica e conformidade com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (XIAO et al., 2004; RYAN et al., 2005; FERGUSON et al., 2006). As espécies consideradas válidas estão descritas de acordo com os hospedeiros em que foram isoladas e podem ser observadas no Quadro1.

Quadro1- Nomeclatura das espécies de *Cryptosporidium* nomeadas de acordo com hospedeiro em que foram isoladas.

Nome das espécies	**Tipo de hospedeiro**	**Referências**
C. hominis	Humano (*Homo sapiens*)	Morgan-Ryan et al.(2002)
*C. parvum**	Camundongo (*Mus musculus*)	Tyzzer (1912)
C. meleagridis	Perus (*Meleagris gallopavo*)	Slavin (1955)
C. andersoni	Bovino (*Bos taurus*)	Lindsay et al. (2000)
C. baileyi	Galinha (*Gallus gallus*)	Current et al. (1986)
C. canis	Cachorro (*Canis familiaris*)	Fayer et al. (2001)
C. felis	Gato (*Felis catis*)	Iseki (1979)
C. galli	Pássaros (*Spermestidae, Fringillidae*, *G. gallus, T. urogallus*)	Revisado por Ryan et al.(2003)
C. molnari	Peixe (*Sparus aurata, Dicentrarchus labrax*)	Alvarez-Pellitero e Sitja-Bobadilla (2002)
C. muris	Camundongo (*Mus musculus*)	Tyzzer (1910)
C. saurophilum	Lagartos	Koudela e Modry (1998)
C. serpentis	Cobras (*Elaphe guttata, E. subocularlis*, *Sanzinia madagascarensis*)	Levine (1980)
C. wrairi	Porquinho da Índia (*Cavia porcellus*)	Vetterling et al. (1971)
C. suis	Suínos (*Sus scrofa*)	Ryan et al. (2004)
C. bovis	Bezzeros (*Bos taurus*)	Fayer et al. (2005)

Fonte: FAYER et al., 2005; XIAO et al., 2004; CACCIÒ & POZIO, 2006. * inclui"*cryptic species*".

Cryptosporidium hominis e *Cryptosporidium parvum* são as espécies patogênicasmais freqüentemente encontradas no homem, no entanto casos de infecções humanas por *C. meleagridis, C. felis, C. canis, C. muris e C. suis,* além de alguns genótipos de *C. parvum* têm sido relatado na literatura atual (KATSUMATA et al., 2002; CAMA et al., 2003; GIBBONS-MATTHEWS e PRESCOTT, 2003; KASSA et al., 2004; RYAN et al., 2005; HASHIMOTO et al., 2006).

SLAPETA (2006) propôs uma nova denominação para o genótipo conhecido originalmente como *C. parvum* genótipo bovino. Essa espécie denominada por ele como *Cryptosporidium pestis* está freqüentemente associada com infecções bovinas e pode também infectar o homem e outros mamíferos.

Recentemente, RYAN et al. (2008) descreveram com base em dados biológicos e molecular, uma nova espécie *Cryptosporidium fayeri* n. sp. Essa espécie tem sido associada a infecção assintomática em cangurus (*Macropus rufus)*.

BARTA & THOMPSON (2006) alertam para a necessidade de reavaliar as espécies de *Cryptosporidium* dentro do filo dos Aplicomplexas. Há evidências de que o parasita deve ser colocado em um grupo taxonômico próximo das *Gregarines* (parasitas de invertebrados). Aspectos como, infecção restrita a região apical de células epiteliais, tamanho dos oocistos, insensibilidade a agentes "*anti-coccidias",* bem como, reações cruzadas com anticorpos de *Cryptosporidium* e *Gregarinas* revelam seu comportamento atípico em relação à classe dos coccídeas.

1.3 – Mecanismos de transmissão e biologia do parasita

A transmissão da criptosporidiose ocorre pela ingestão de oocistos infectantes eliminados nas fezes de um hospedeiro infectado por um hospedeiro suscetível por via fecal-oral, a possibilidade de inalação de oocistos de *Cryptosporidium* tem sido estudada. O parasita pode desenvolver-se em um período de 12 a 14 horas em média, e o período entre a ingestão dos oocistos e a excreção destes nas fezes pode variar de acordo com a espécie de *Cryptosporidium* e a suscetibilidade do hospedeiro infectado (FAYER et al., 2000; FAYER et al., 2005; CACCIÒ & POZIO, 2006.).

Durante a fase aguda da doença o hospedeiro infectado pode eliminar grandes quantidades de oocistos, chegando a mais de 10^9 oocistos/g de fezes (TZIPORI & WARD, 2002; XIAO et al., 2004).

A princípio acreditou-se que a criptosporidiose fosse predominantemente uma zoonose, atualmente sabe-se que também são veículos de transmissão ao homem a contaminação de alimentos, a água utilizada para o consumo e recreativa e o contato com pessoas infectadas. Os oocistos ubíquos, infecciosos e extremamente resistentes a várias condições ambientais, podem permanecer viáveis no solo ou na água por vários meses (FAYER et al., 2000; CHALMERS et al., 2005).

O ciclo biológico do *Cryptosporidium* é monoxênico, característico dos coccídeas. As espécies se desenvolvem rapidamente, porém o ciclo é complexo com estágios auto-infectivos e dois processos de multiplicação,

assexuado e sexuado que culminam com a formação de oocistos esporulados que são eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados. (FAYER et al., 2000; CAREY et al., 2004).

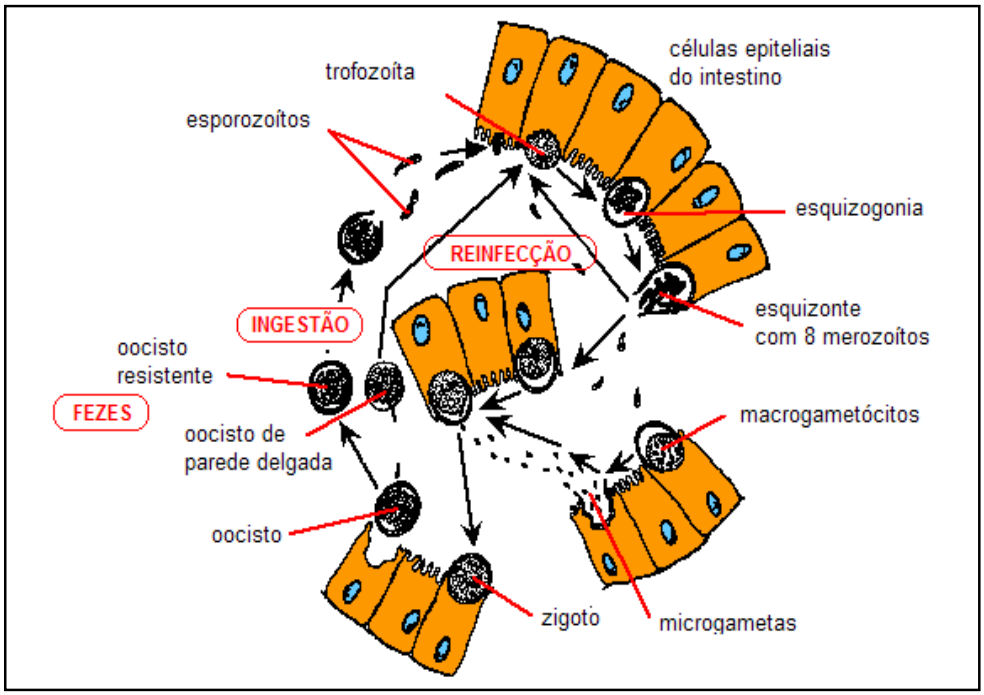
No intestino delgado sob a ação de enzimas digestivas e sais biliares os oocistos fofrem o desencistamento e liberam quatro esporozoítos que invadem as células epiteliais, são englobados pelas microvilosidades e fixados dentro de um vacúolo citoplasmático, responsável pela nutrição e fixação do parasita. Apesar de ser considerado um parasito intracelular obrigatório, na verdade, ele se localiza na parte externa do citoplasma dentro de uma membrana formada pelo parasita e pela membrana citoplasmática da célula epitelial, dando a impressão de estar aderido à célula onde se inicia a merogonia (SMITH & ROSE, 1998; UNGAR, 2000; CAREY et al., 2004).

Dois tipos de merontes são formados, o tipo I com 6 a 8 merozoítos capazes de multiplicar-se no interior da célula ou então, invadir outras células e se reciclar indefinidamente. Essa fase é conhecida como fase assexuada. O tipo II contém 4 merozoítos que culminam na formação dos microgametócitos e macrogametócitos dando inicio a fase sexuada. Após a fecundação ocorre a formação do zigoto (esporogonia), esse se reveste de parede resistente formando oocistos esporulados que são eliminados com as fezes no meio ambiente (SMITH & ROSE, 1998; UNGAR, 2000; CAREY et al., 2004).

Aproximadamente, 20% dos oocistos produzidos apresentam características especificas na constituição da parede e são chamados de

oocistos de parede delgada que podem romper-se ainda no intestino e causar a auto-infecção do hospedeiro (UNGAR, 2000; SODRE & FRANCO, 2001).

Na figura 1 pode ser observado o esquema representativo do ciclo de vida contendo os dois estágios reprodutivos do parasita *Cryptosporidium*.



Fonte: SMITH & ROSE (1998).

Figura 1- Ciclo de vida do *Cryptosporidium* com estágios reprodutivos.

1.4 – Manifestações clínicas

O sintoma mais comum da doença tanto em indivíduos imunodeficientes como em imunocompetentes é a diarréia aquosa e

abundante podendo apresentar muco e raramente a presença de sangue que geralmente ocorre quando há diminuição na absorção intestinal ou aumento de produção de secreções reguladas pelos enterócitos (GONÇALVES, 2007).

Os indivíduos imunocompetentes também apresentam sintomas como cólicas abdominais, perda de apetite, náuseas, vômitos, febre, cefaléia e a diarréia dura em média de uma a duas semanas e é autolimitante. Em imunodeficientes, principalmente os indivíduos infectados cronicamente pelo vírus HIV, a gravidade do quadro depende do grau de imunodepressão do paciente, os sintomas geralmente são crônicos e a diarréia é severa podendo levar ao desequilíbrio hidroeletrolítico, desidratação, perda de peso, má absorção de nutrientes e conseqüentemente à morte (FERREIRA & BORGES, 2002).

O parasita *Cryptosporidium* já foi encontrado na faringe, esôfago , estomago, duodeno, jejuno, íleo, apêndice colon, reto, vesícula biliar, pâncreas e ductos pancreáticos e tecido hepático, assim como, escarro, aspirados traqueais, lavados brôquicos e tecidos pulmonares, supondo a infecção inalatória de oocistos (FERREIRA & BORGES, 2002)

Dentre as complicações da doença a infecção extra-intestinal mais comum é a do trato biliar que se manifesta por colicistite acalculosa, colangite esclerosante e estenose da papila. O trato respiratório também pode ser atingido acometendo desde a faringe até os bronquíolos respiratórios, incluindo sintomas como tosse e dispnéia (CLARK, 1999).

Até o momento não há tratamento efetivo para doença, em indivíduos

imunocompetentes a cura é espontânea e os tratamentos são essencialmente aplicados aos sintomas relacionados a grastinterites e sem a utilização de antiparasitários específicos, pois nenhum quimioterápico demonstrou real eficiência na eliminação ou prevenção do parasita (FERREIRA & BORGES, 2002).

Em relação aos indivíduos que fazem uso de terapia anti-retrovirais (HAARTs) suas funções imunológicas tendem a melhorar podendo cessar o quadro diarréico e diminuir os sintomas em indivíduos com contagem de linfócitos T CD4+ acima de 200 células/mm^3 (CIMERMAN et al., 2002; BACHUR et al., 2008).

Há evidências de que a virulência e a resposta ao tratamento dependem do estado imunológico do hospedeiro e da espécie ou do genótipo infectante (OKHUYSEN et al., 2002).

Quanto à virulência das espécies, EGYED et al. (2003) classificam *C. hominis* e *C. parvum* como organismos de alta virulência, *C. meleagridis* e *C. muris* de baixa virulência e *C. felis e C. canis* com virulência ainda não elucidada. Citam ainda que para diferentes isolados da espécie *C. parvum* têm sido demonstrada diversidade na virulência, patogênese, infectividade, sensibilidade a quimioterápicos e perfis antigênicos.

1.5 – Diagnósticos laboratoriais da criptosporidiose

A investigação laboratorial da criptosporidiose é realizada pela pesquisa de oocistos nas fezes ou em outros materiais biológicos, como aspirado duodenal e/ou jejunal, escarro e lavado bronco-alveolar, utilizando simultaneamente um método de concentração e um de coloração especial, sendo os procedimentos álcool-ácido resistentes os mais conhecidos. Entretanto, os oocistos de *Cryptosporidium* estão entre os menores estágios exógenos dos apicomplexos e as diferenças morfológicas não são visíveis na microscopia óptica e solicitação do exame para o diagnóstico é sugerido apenas quando há suspeita clínica (CARVALHO-ALMEIDA, 2004; XIAO et al., 2004).

GREENBERG et al.(1996) após compararem o método parasitológico de fezes utilizando colorações especificas como a de Kinyoun modificado, com o diagnóstico realizado por endoscopia seguida de biopsia do trato gastrintestinal, concluíram que embora a análise das fezes seja um método não invasivo ela é menos sensível que a biópsia do trato gastrintestinal e a análise por microscopia óptica necessita de técnicos bem treinados na identificação dos oocistos.

Ao microscópio óptico, os oocistos são esféricos podendo variar de 3 a 6 µm de tamanho e se coram em vermelho heterogêneo ou com falhas sobre um fundo contra corado normalmente com azul de metileno em sua superfície e um halo hialino diferenciado. A parede é espessa e o citoplasma é finamente granulado ou com uma zona central mais clara. Mesmo com

colorações mais específicas os oocistos podem ser confundidos com fungos também álcool-ácido resistente ou com artefatos presentes nas fezes (GUIZELINI, 1991).

Outros métodos como, teste imunológico por ELISA (*Enzime Linked Immuno Sorbent Assay*) para a pesquisa de antígenos fecais e circulantes e Imunofluorescência direta utilizando anticorpos monoclonais, podem ser úteis para *screening* rápido de *Cryptosporidium*. Como desvantagem esses testes apresentam baixa especificidade em se tratando de portadores assintomáticos, assim pode ocorrer a necessidade de repetição e associação com a sintomatologia dos pacientes e geralmente têm custo elevado (GONÇALVES, 2007).

Apesar dos métodos moleculares serem cada vez mais indispensáveis na detecção e diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* que possam infectar o homem, sua aplicação em amostras clínicas, nos laboratórios de rotina, ainda constitui um desafio (BIALEK et al., 2002; CAREY et al., 2004; FERGUSON et al., 2006).

Muito embora a técnica de PCR (reação em cadeia pela polimerase) seja considerada sensível e específica, a escolha do conjunto de oligonucleotídeos (iniciadores) adequados, adicionada á falta de padronização dos métodos de extração de DNA e aos componentes presentes nas amostras de fezes que possam inibir a reação tornaram esse procedimento complexo e de difícil execução para os analistas clínicos (BIALEK et al., 2002; FERGUSON et al., 2006).

1.6 – Epidemiologia

A criptosporidiose é cosmopolita, já relatada em 95 países e representa atualmente um grande problema de saúde pública. Estudos demonstraram que a doença é endêmica na maioria das regiões tropicais e que o *Cryptosporidium* é um dos três principais agentes de diarréia infecciosa que constitui importante causa de morbimortalidade em crianças de 0 a 5 anos de idade (CARVALHO-ALMEIDA, 2004; FRANCO, 2007).

A investigação de casos de pacientes com infecção intestinal por criptosporidiose demonstra uma prevalência de 1 a 4% nos Estados Unidos e na Europa e 3 a 20% na África, Ásia, Austrália, América Central e América do Sul. Nos países desenvolvidos a infecção é mais comum entre crianças com até 01 ano de idade (WHO, 2006).

A soroprevalência nos grandes centros industrializados é de 25 a 35%, na Rússia de 68 a 88% e a America do Sul apresenta uma taxa em torno de 95% podendo ter seu valor alterado de acordo com a idade e condições sociais,observando-se um aumento em trabalhadores residentes em áreas rurais e crianças freqüentadoras de creches públicas (WHO, 2006).

Considerável atenção e recursos têm sido direcionados para esclarecer a epidemiologia dessa doença e limitar a propagação desse microrganismo. Os pacientes imunodeficientes pelo vírus HIV são particularmente suscetíveis à infecção por coccídeas entre eles o *Cryptosporidium* que é reconhecido mundialmente como parasita emergente

e oportunista (CIMERMAN et al., 2002; LEBBAD et al., 2001; ADJEI et al., 2004; WHO, 2006).

Em países Africanos infecções por *C. parvum*, *Isospora belli* e microsporídios têm sido freqüentemente associadas a diarréias crônicas em pacientes infectados pelo vírus HIV-1 e HIV-2. A ocorrência de *C. parvum* em 52 pacientes com o vírus HIV-2 em Guiné-Bissau foi avaliada com 25% de positividade nas amostras analisadas (LEBBAD et al., 2001).

Um estudo realizado no Hospital Universitário de Lusaka, Zâmbia no período de março de 1998 a maio de 2000, avaliou a ocorrência de infecções intestinais em crianças soropositivas e soronegativas para HIV que apresentaram quadro de diarréia persistente e desnutrição. O *Cryptosporidium* foi identificado em 26% dos casos diagnosticados. A criptosporidiose e estado nutricional foram associados a uma taxa elevada de mortalidade entre as crianças estudadas (AMADI et al., 2001).

GATEI et al. (2003) detectaram a presença de *Cryptosporidium* em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes pelo vírus HIV no Quênia, Malawi, Brasil, Reino Unido e Vietnã. Foram analisadas 63 amostras e 75% das amostras foram positivas para *C. parvum* genótipo Humano, 21,7% para *C. parvum* genótipo bovino, 1,6% para *C. meleagridis* e a mesma taxa de ocorrência para *C. muris.*

ADJEI et al. (2004) conduziram uma pesquisa no hospital pediátrico Korle-Bu Teaching em Gana na África com 227 crianças que apresentavam quadros de diarréia persistente e 77 sem diarréia e obtiveram uma prevalência de *Cryptosporidium* de 27,8% e 15,6% respectivamente nos

casos analisados.

Ainda que existam vários trabalhos destacando a importância do *Cryptosporidium* como agente etiológico responsável por quadros de diarréia prolongada e ocasionando morbidade e mortalidade em crianças desnutridas e nos indivíduos com imunodeficiência com ou sem infecção pelo vírus HIV, a freqüência desta protozoonose no Brasil entre indivíduos imunocompetentes é pouco conhecida (CIMERMAN et al., 2002; OLIVEIRA-SILVA et al., 2007; ARAUJO et al., 2008; BACHUR et al., 2008).

Em relação aos pacientes infectados pelo vírus HIV é possível encontrar trabalhos com índices variados de positividade para *Cryptosporidium*. Na cidade de São Paulo o índice encontrado é de 6,4%, Ribeirão Preto 6,4%, em Santos 19,1%, em Campinas 18%, no Rio de Janeiro 9,3% e no Triângulo Mineiro 8,6% (BARALDI et al., 1999; RODRIGUES, 1991; SAUDA, 1993; CAPUANO et al., 2001; CIMERMAN et al., 2002; RIBEIRO et al.,2004; OLIVEIRA-SILVA et al., 2007).

GUIZELINE & AMATO NETO (1992) observaram a prevalência de 21% de *Cryptosporidium* em pacientes HIV positivos, 12% em crianças de uma creche pública e 3,6% em indivíduos imunocompetentes na cidade de São Paulo.

Outros trabalhos relatam a presença de *Cryptosporidium* em surtos de diarréia ocorridos entre crianças.

FRANCO & CORDEIRO (1996) estudaram a ocorrência de *Cryptosporidium* em crianças freqüentadoras de creches no município de

Campinas e encontraram 6,4% de amostras positivas para *C. parvum* e 13,5% para *G. duodenalis* nas amostras analisadas.

Em Fortaleza, foi identificada a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em 7,4% das fezes analisadas de crianças que apresentavam o sintoma da doença e também em crianças assintomáticas (NEWMAN et al., 1999).

CARVALHO ALMEIDA et al. (2006) investigaram a ocorrência de um surto de criptosporidiose em uma escola de educação infantil na cidade de São Paulo em crianças de 0 a 6 anos de idade que apresentaram fezes não diarréicas. Foram analisadas 64 amostras coletadas no período de 30 de Agosto a 26 de Setembro de 2001, com 20,3% de positividade para oocistos de *Cryptosporidium*.

GONÇALVES et al. (2006) identificaram a presença do protozoário em amostras de fezes diarréicas de crianças freqüentadoras da creche pública do Hospital das Clínicas de São Paulo. Foram investigadas, 224 amostras e *C. hominis* foi identificado em 12,9% das amostras.

BUSHEN et al. (2007) publicaram dados de uma pesquisa realizada em crianças residentes de uma favela na cidade de Fortaleza, no Ceará. Das 42 amostras analisadas para presença do protozoário, 57% foram positivas para *C. hominis* e 43% positivas para *C. parvum*.

SUZUKI (2007) realizou um estudo de caracterização epidemiológica e etiológica das doenças diarréicas em adultos no município de Itapevi e constatou a presença de *Cryptosporidium* em 60% das amostras analisadas.

Com relação à ocorrência de *Cryptosporidium* em animais pelo menos

170 espécies de animais em grande parte os mamíferos têm sido infectados por esse protozoário, em diversas partes do mundo (FAYER, 2004).

Algumas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* têm sido associados à infecção humana e por meio de estudos moleculares é possível avaliar o papel do homem e dos animais domésticos e silvestres, como reservatórios desse parasita (GÓMEZ-COUSO et al., 2005).

Especial atenção é direcionada à presença do parasita em animais domésticos ou de estimação. FIGUEIREDO et al. (2004) avaliaram amostras de fezes de cães saudáveis nas cidades de Lavras e Viçosa, Minas Gerais. Das 269 amostras analisadas 1,85% foram positivas para excreção de oocistos de *C. parvum.*

LALLO & BONDAN (2006) também investigaram a presença do parasita em cães na cidade de São Paulo entre 2003 e 2004, revelando uma prevalência de 9,5% de *C. parvum* nos animais examinados.

HUBER et al. (2007) identificou por meio de caracterização molecular a presença de *C. bailey, C. meleagridis, C. felis, C. canis e C. parvum* em amostras de fezes de galinhas, patos, codornas, cobaias, bezerros, cães e gatos no Estado do Rio de Janeiro.

Todavia, os animais de áreas rurais e o homem são os principais responsáveis pela contaminação dos mananciais, porém, os animais silvestres também representam fontes importantes de disseminação e contaminação dos cursos d'água. Assim, o monitoramento e o controle em atividades agrícolas e nos esgotos domésticos tornaram-se importantes para a proteção dos mananciais (XIAO et al., 2001; JIANG et al., 2005b).

RYAN et al. (2005) realizaram em Sydney na Austrália um estudo de caracterização molecular para identificar fontes de contaminação por *Cryptosporidium* em área escolar e hospitais entre os achados foram identificados *C. parvum* (genótipo bovino), *C. suis* (genótipo II), genótipo cervo e genótipo cabra em água superficiais e fezes de animais.

Segundo o Centro de Controle das Doenças Infecciosas (CDC), após o primeiro surto descrito em 1984 relacionado à água contaminada nos Estados Unidos, o *Cryptosporidium* foi apontado com o agente causal de 33% dos surtos de gastrienterites (63/189) associados a águas recreacionais e 5,5% (12/219) relacionados à água potável durante o período de 1988 a 2004 (CDC, 2007).

Em Milwaukee, nos Estados Unidos, a contaminação do sistema de distribuição de água com esgoto ocasionou um surto em 1993 e tornou-se um marco na história da doença atingindo 403.000 pessoas, que resultou em mais de 1.000 internações hospitalares, culminando com o óbito de cerca de 100 pacientes imunodeprimidos (CORSO et al., 2003; ZHOU et al,. 2003).

Desde então, diversos trabalhos têm registrado a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em águas superficiais e subterrâneas e também em águas tratadas devido a sua característica de resistência aos métodos de tratamento convencionais utilizados (SIMMONS et al., 2001; LUNA et al., 2002; BETANCOURT & ROSE, 2004).

KARANIS et al. (2007) publicaram um levantamento de casos de surtos de veiculação hídrica notificados até o ano 2002. Aproximadamente 325 surtos associados à água contaminada por protozoários foram relatados

em diferentes países. O *C. parvum* e a *G. duodenalis* apresentaram o maior índice de detecção entre os casos levantados 50,8% e 40,6% respectivamente.

A contaminação de águas recreacionais tem sido divulgada como um importante fator de risco na disseminação da doença uma vez que o uso de cloro para o tratamento de água em piscinas não é suficiente para eliminação do parasita *Cryptosporidium* (EPA, 2005).

De acordo com o programa de vigilância nos Estados Unidos, houve um aumento no número de casos de criptosporidiose notificados em 2005. Análises de dados epidemiológicos revelaram que a maioria dos casos ocorreu durante o verão, período em que existe uma grande freqüência de pessoas que fazem uso de águas recreacionais como parques, lagos e rios (CDC, 2007).

No Reino Unido, em 2001, aproximadamente 358 pessoas atendidas em um hospital local foram diagnosticadas com criptosporidiose. Uma fonte de água recreacional foi apontada como o principal fator de risco para origem desse surto uma vez que todas as pessoas contaminadas haviam freqüentado o mesmo parque aquático local (CAUSER et al., 2006).

A presença de oocistos de *C. hominis* e *C. parvum* e cistos de *Giardia* sp. foi identificada em concentrações de 9 oocistos/10L e 165 cistos/10L respectivamente em águas de lagos e rios utilizadas para recreação em Paris na França (COUPE et al., 2006).

1.7 – Ocorrência e detecção de *Cryptosporidium* no meio ambiente

A transmissão do protozoário *Cryptosporidium* no ambiente aquático vem ganhando atenção dos pesquisadores devido a diversos surtos associados à água contaminada. Alguns fatores biológicos e características próprias do parasita facilitam a transmissão da doença, entretanto outros fatores como distribuição geográfica, econômicos, culturais e de saneamento básico estão relacionados com a dispersão do parasita no meio ambiente (FAYER et al., 2000; HACHICH, 2000; SMITH et al., 2006; FRANCO, 2007).

O parasita se encontra no ambiente sob a forma de oocistos esporulados que lhe confere a capacidade de sobrevivência sob as mais variadas condições ambientais. A identificação e diferenciação dos oocistos são elementos valiosos já que várias espécies podem ocorrer simultaneamente no meio ambiente (WARD & WANG, 2001).

Os oocistos de *Cryptosporidium* uma vez eliminados no ambiente podem permanecer viáveis na água por mais de 140 dias e aproximadamente 30 dias em condições de salinidade. No solo sua permanência pode variar em torno de 120 dias, deste modo, a viabilidade e a infectividade dos oocistos tornam-se fator importante a ser considerado. (KATO et al., 2004; CHALMERS et al., 2005).

As águas captadas para o abastecimento nas Estações de Tratamento de Água (ETA) apresentam características diferenciadas quanto

a sua proteção, ou seja, quanto mais protegido for um manancial, mais simples e menos oneroso torna-se esse tratamento (GARRIDO, 2004).

A ocorrência do *Cryptosporidium* em água utilizada para consumo humano é avaliada por meio de sua detecção em fontes d´água e pela eficiência de remoção do parasita nos processos de tratamento. Em alguns países o monitoramento tem sido realizado por meio da estimativa de índices de contaminação fecal ou nos períodos de chuva com aumento na concentração de oocistos de 10 a 100 vezes (WHO, 2006).

Basicamente, o sistema de tratamento convencional de água captada para consumo humano, utiliza uma série de processos como coagulação, floculação, decantação, filtração e desinfecção. As concentrações de cloro usualmente utilizadas e o tamanho dos oocistos, de aproximadamente 4 a 6 µm, tornam ineficiente os processos de remoção do parasita *Cryptosporidium* pelo sistema de tratamento de água (BETANCOURT & ROSE, 2004).

Diferentes métodos para o isolamento e detecção dos oocistos em amostras de água têm sido desenvolvidos e avaliados quanto à aplicabilidade e custos, entre eles, os processos de filtração em membranas e cartuchos apropriados têm sido amplamente utilizados seguidos de métodos de concentração por centrifugação. Ainda é possível lançar mão de técnicas de floculação e precipitação com carbonato de cálcio que podem remover resíduos presentes nas amostras, indicado como um método eficiente e barato (VESEY et al., 1993).

A técnica de filtração em membrana foi originalmente descrita para ser aplicada em águas tratadas, no entanto ela é particularmente útil para uma rápida determinação de oocistos em água não-tratadas (LIMA & STAMFORD, 2003).

Uma metodologia preconizada pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) é recomendada para detecção e recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água. Com base no método 1622: "*Cryptosporidium* in Water by Filtration/IMS/FA" desenvolvido em 1997 pela EPA, foi criado o método 1623 que utiliza anticorpos magnetizados para detecção simultânea de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Os cartuchos de filtração "Cryp Test – Whatman", o sistema "Filta-Max - IDEXX e cápsulas "Envirocheck HV-Pall Gelman" também foram adicionados pelo sistema de validação do método (MCCUIN & CLEANCY, 2003; EPA, 2005).

Além da análise por imunofluorescência com a detecção de anticorpos específicos, as características morfológicas podem ser avaliadas por contraste diferencial interferencial (DIC) e pela utilização de DAPI (4,6-didiamidino-2-phenylidone) que tem como objetivo corar as estruturas internas do oocisto (EPA, 2005).

A transmissão veiculada por fontes de água tornou-se uma rota importante devido ao comprometimento dos recursos hídricos. Entretanto, as metodologias aplicadas para tal diagnóstico, devem estar associadas a técnicas que detectem variações genéticas existentes entre esses organismos, uma vez que a microscopia já não pode ser considerada específica o suficiente para dar suporte às investigações epidemiológicas e

ambientais em se tratando de *Cryptosporidium* spp. (XIAO et al., 2004; CDC, 2004; CHALMERS et al., 2005).

As pesquisas de *Cryptosporidium* em amostras ambientais realizadas no Brasil são recentes. Um relato de grande valia para saúde pública refere-se à falta de dados sobre a ocorrência desse agente em mananciais aquáticos e a inexistência de surtos documentados em nosso país, tornando-se um dos principais problemas para o controle da infecção (FRANCO, 2007).

MULLER (1999) realizou um estudo em mananciais que abastecem duas estações de tratamento de água na região metropolitana de São Paulo. A presença de oocistos foi detectada em 75% das amostras de águas brutas coletadas e em 12,5% de água tratada com densidades que variavam de 0 a 236 oocistos/L.

A presença do parasita também foi avaliada com 58,4% de positividade para oocistos em águas superficiais e 100% de presença de *Cryptosporidium* nas amostras de água de esgoto analisadas na cidade de Araras em São Paulo (DIAS JUNIOR, 1999).

GAMBA et al. (2000) conduziram um estudo no município de Itaquaquecetuba no estado de São Paulo e descreveram a ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas de poços utilizadas para consumo, com percentual de 22,2% e 100% respectivamente nas amostras analisadas.

FRANCO et al. (2001) identificaram a presença de 60,8% oocistos de *Cryptosporidium* em uma concentração de 0,5 oocistos/L nas amostras de água coletadas no rio Atibaia, localizado no estado de São Paulo.

FRANCO & CANTUSIO (2002) detectaram a presença de oocistos do *Cryptosporidium* em água mineral comercializadas na cidade de Campinas, no estado de São paulo.

A ocorrência de *Cryptosporidium* foi avaliada em amostras de águas coletadas de córregos e de esgotos na cidade de São Paulo. No total 24 amostras foram analisadas e todas as amostras foram positivas, sendo que a concentração de oocistos recuperados variou entre 80 a 912 oocistos/L para as amostras de esgoto e 65 a 760/L para amostras do córrego (FARIAS et al., 2002).

A ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em efluentes de quatro estações de tratamento de esgoto na cidade de Porto Alegre/RS também foi avaliada. Entre os isolados a densidade média ficou entrorno de 1042 oocistos de *Cryptosporidium*/100L e 431 cistos de *Giardia*/100L (CARDOSO et al., 2003).

Uma investigação quanto à presença de oocistos de *Cryptosporidium e* cistos de *Giardia* em amostras de lodo ativado foi realizado na cidade de Campinas. Os parasitas foram detectados em 9,6% e 54,5% respectivamente entre os isolados. O estudo adverte sobre a importância de se analisar essas amostras antes da sua utilização para fins agrícolas (SANTOS et al., 2004).

HACHICH et al. (2004) relataram, por meio de estudos de monitoramento em águas superficiais captadas para consumo humano no Estado de São Paulo a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia*, detectando

positividade de 2,5% de *Cryptosporidium* e concentrações máximas de 20 oocistos/L e 27% de *Giardia* com 521 cistos/L nas amostras analisadas.

ARAUJO et al. (2006) detectaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras de água salobra na cidade de São Sebastião em São Paulo. Nesse estudo o parasita foi identificado em 45% das amostras analisadas.

CANTUSIO NETO et al. (2006) verificaram no sistema de tratamento de esgoto na cidade de Campinas/SP, a eficiência na remoção de cistos e oocistos em processo de lodo ativado e reator Ultra Violeta. A remoção por lodo ativado ficou entorno de 98,9% cistos de *Giardia* e 99,7% de oocistos de *Cryptosporidium.* Análise de infectividade revelou a ineficiência no processo de inativação dos cistos de *Giardia* por tratamento UV.

COUTINHO (2007) investigou a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em duas estações de tratamento de esgoto (ETE) no estado de São Paulo. Foram coletadas 58 amostras em diferentes pontos dos sistemas redutores de cargas poluidoras (lagoas de estabilização) das duas estações, apresentando 86,2% de positividade para oocistos nas amostras analisadas.

1.8 – Ferramentas moleculares aplicadas em estudos de identificação de *Cryptosporidium*

Estudos empregando métodos moleculares têm contribuído para o entendimento da epidemiologia dos patógenos emergentes, uma vez que os

métodos fenotípicos clássicos não fornecem informações suficientes para identificar a ocorrência desses parasitas na população, tornando-se necessários estudos genotípicos. A aplicação de ferramentas moleculares no estudo de diferentes agentes patogênicos vem ganhando a atenção dos pesquisadores num esforço de esclarecer a taxonomia e a relação parasita - hospedeiro que envolve esses organismos (MATTÉ, 2004).

A identificação correta das espécies de *Cryptosporidium* tem ajudado a determinar a fonte de infecção e a entender melhor a dinâmica da transmissão da doença em vários surtos pelo mundo. No entanto, uma variedade de ferramentas tem sido aplicada para detectar as variações genéticas entre as espécies (KATO et al., 2003; CHALMERS et al., 2005).

Métodos moleculares como a Reação em cadeia pela polimerase (PCR), permite a síntese de uma pequena quantidade de DNA em poucas horas de reação *in vitro.* Esta sensibilidade estimulou a padronização da reação para detecção de pequenos números de oocistos presentes em amostras clínicas e ambientais. Assim, através da biologia molecular, os pesquisadores podem obter informações muito além das oferecidas pela microscopia convencional e testes sorológicos, auxiliando na vigilância dos agentes infecciosos e na determinação da fonte de infecção (CAREY, 2004).

As técnicas de amplificação de genes e regiões não codificadoras do genoma do *Cryptosporidium* vêm sendo amplamente aplicadas para estudos taxonômicos. Os genes *18S rRNA, HSP70* (*heat shock protein*), *COWP* (Cryptosporidium oocyst wall protein), *CPR1* (*Cryptosporidium repetitive wall protein),* o gene *TRAPC-1 e TRAPC-2* (*thrombospondin-related adhesive*

proteins), *GP60 DNA (*60-*kDa glycoprotein*), *ITS2 rRNA (second internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal*) entre outros, já foram propostos no estudo destes organismos, mas o *18S rRNA* é a região mais utilizada pelos pesquisadores (CAREY et al., 2004; CARVALHO-ALMEIDA, 2004; RAMIREZ et al., 2004; XIAO et al., 2004; CHALMERS et al., 2005; FERGUSON et al., 2006).

O DNA codificador do RNA ribossomal consiste em múltiplas cópias de um conjunto de segmentos de genes que são transcritos para originar as moléculas estruturais do ribossomo denominadas 18*S*, 5,8*S* e 28*S* que são intercalados por dois segmentos espaçador *ITS1* e *ITS2*. De maneira geral o *locus* 18*S* é utilizado em estudos de organismos estreitamente relacionados (HILLIS & DIXON, 1991).

Entretanto, a reação de PCR pode ser inibida por várias substâncias normalmente encontradas em amostras de fezes e amostras ambientais podendo interferir na atuação das enzimas DNA polimerases durante a amplificação dos fragmentos (CLARK 1999).

Várias metodologias para extração de DNA de *Cryptosporidium* tanto em amostras de fezes como ambientais, têm sido descritas e a utilização de produtos que auxiliam na diminuição de inibidores durante a reação PCR como, por exemplo, polivinilpirrolidona (PVP) e a albumina sérica bovina (BSA), indicada em diferentes protocolos (KOONJUL et al.,1999; HIGGINS et al., 2001; CARVALHO -ALMEIDA, 2004; COUPE et al., 2005; ARAUJO et al., 2006).

Para aumentar a sensibilidade do método é possível lançar mão de técnicas como a *nested*-PCR que é um método de PCR no qual o produto amplificado (*amplicon*) é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando um conjunto de iniciadores homólogos às seqüências internas do segmento já amplificado. Este procedimento torna a reação de PCR mais específica e sensível. Geralmente, na primeira PCR é utilizado um iniciador gênero-específico, e na segunda PCR um iniciador espécie-específico do organismo em estudo.

A técnica de clonagem de fragmentos específicos amplificados pela PCR também é indicada para identificação e diferenciação de espécies que podem ocorrer simultaneamente em amostras ambientais. Os fragmentos amplificados são ligados a um vetor apropriado na presença de uma enzima DNA ligase e usualmente replicado em células bacterianas, normalmente, *Escherichia coli*, assim o inserto pode ser posteriormente submetido a caracterização molecular para identificação das espécies isoladas (JELLISON et al., 2002; COUPE et al., 2005; COUPE et al., 2006).

De forma geral, os estudos utilizam os diferentes fragmentos amplificados para posterior genotipagem do *Cryptosporidium* detectado, empregando técnicas de digestão com enzimas de restrição (RFLP) ou ainda o seqüenciamento do fragmento em questão para estudar o posicionamento taxonômico desses organismos (CARVALHO-ALMEIDA, 2004; XIAO et al., 2004; CHALMERS et al., 2005).

Baseado no fato de que o seqüenciamento do fragmento *18S rRNA* de *Cryptosporidium* é o mais utilizado para elucidação da taxonomia desses

organismos e que os resultados disponíveis nos bancos de dados especializados (GenBank) representam todas as espécies atualmente válidas e ainda uma ampla variedade de isolados clínicos e ambientais, o seqüenciamento do gene amplificado torna-se importante para complementação de informações epidemiológicas.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo detectar por métodos moleculares e genotipar o protozoário *Cryptosporidium* isolado em amostras de águas superficiais e águas recreacionais.

2.2 – Objetivos específicos

1- Detectar a presença de *Cryptosporidium* em amostras de águas superficiais e recreacional por meio da PCR utilizando o fragmento do gene 18*S rRNA* e seqüenciar o fragmento amplificado para identificação das espécies encontradas.

2- Determinar a posição taxonômica de acordo com as seqüências homólogas disponíveis no banco de dados especializado – GenBank.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Amostragem

3.1.1 – Locais e periodicidade das coletas

Foram utilizadas para análise dois tipos de água, amostras de água recreacional coletadas na cidade de São Sebastião, pelo Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, e amostras de águas superficiais, obtidas em colaboração com a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB).

O rio Ribeirão da Fazenda, está localizado na cidade de São Sebastião, São Paulo. O ponto utilizados nas coleta situa-se sob a Ponte do Pontal da Cruz, próximo a um emissário de esgoto doméstico, e sofre influência da água do mar sendo consideradas água salobra. De acordo com o Decreto 10.755 de 22/11/1977, as águas do Ribeirão da Fazenda são clessificadas como Classe 2. Foram realizadas doze coletas manualmente com intervalo mensal, utilizando frascos de polietileno previamente esterilizados. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas para o laboratório, onde foram processadas. As figuras 2 e 3 apresentam o local de coleta dessas amostras.

Fonte: Laboratório de Saúde Pública da USP .

Figura 2 - Vista parcial do ponto de coleta das amostras, localizado sob a ponte do Pontal da Cruz, São Sebastião, São Paulo.

Fonte: Laboratório de Saúde Pública da USP.

Figura 3 - Vista panorâmica do ponto de coleta das amostras sob a influência de águas salinas.

As amostras coletadas pela CETESB fazem parte do projeto da Rede de Avaliação da Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo que se iniciou em 1974 e tem como principal objetivo avaliar a qualidade das águas de rios e reservatórios do Estado utilizados para abastecimento público (CETESB, 2006).

Fazem parte dessa rede de monitoramento 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHIs), em que se divide o Estado de São Paulo de acordo com a Lei Estadual n.º 9.034 de 27 de dezembro de 1994. A figura 4 representa a localização das 22 UGRHIs do Estado de São Paulo e em destaque as UGRHIs utilizadas nas coletas.

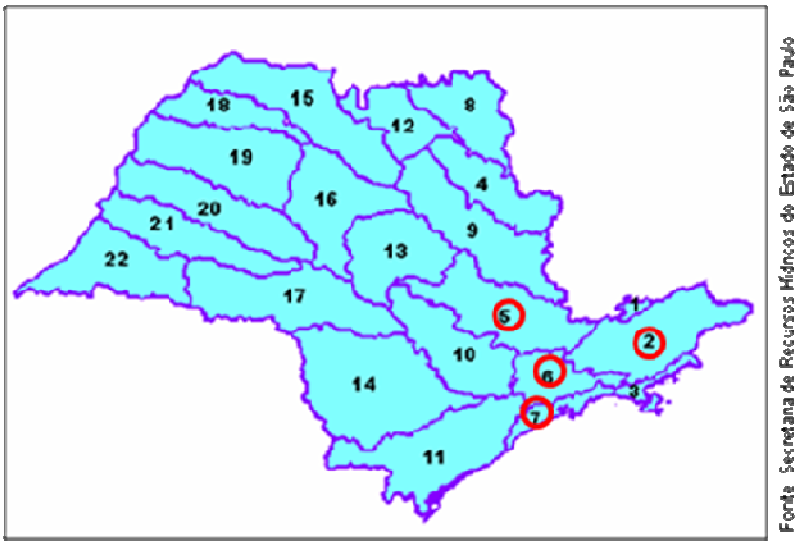


Figura 4 - Unidades de gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) do Estado de São Paulo.

A coleta das amostras foi realizada em locais e datas programados pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) de acordo com os procedimentos descritos no "*Standard Methods*" (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1998), entre os meses de maio e dezembro de 2006 nas seguintes unidades: UGRHI-02, UGRHI-05, UGRHI-06 e UGRHI-07.

No total, 10 litros de água por amostra foram coletados em dois frascos de polietileno de 5 litros estéreis. As amostras foram identificadas com data e hora da coleta, e encaminhadas em caixas isotérmicas com gelo ao Laboratório de Saúde Pública para serem processadas até 24 horas após a coleta.

3.1.2 UGRHI 02 – Bacia do Rio Paraíba do Sul

A bacia do rio Paraíba é uma unidade composta pelos rios, Paraibuna e Paraitinga, formadores do rio Paraíba do Sul e rios Parateí, Jaguari e Una. A água desses rios é utilizada para o abastecimento público e industrial, geração de energia elétrica, afastamento de efluentes domésticos e industriais e para irrigação de plantações (CETESB, 2006).

Nessa Bacia, foram coletadas para análise molecular de *Cryptosporidium* duas amostras do rio Paraíba do Sul na captação de Aparecida (PARB 02600).

3.1.3 UGRHI 05 – Bacia do Rio Piracicaba, Capivari e Jundiaí

A Bacia do rio Piracicaba, Capivari e Jundiaí é composta pelos rios Capivari e Capivari-Mirim, rio Jundiaí, que nasce na Serra da Pedra Vermelha, no município de Mairiporã e deságua na margem direita do rio Tietê, no reservatório da Usina de Porto Góes, no município de Salto, rios Jundiaí-Mirim, Piraí, rios Atibaia, Corumbataí, Jaguari, Camanducaia, Pirapitingui, Jaraceí e Piracicaba, que tem sua foz no reservatório de Barra Bonita (CETESB, 2006).

Nessa bacia, foram coletadas uma amostra do rio Piracicaba, na margem esquerda a 2,5 Km a jusante da foz do rio Piracicaba Mirim na captação de Piracicaba (PCAB 02220); três amostras do rio Piracicaba junto à captação de águas de Americana na localidade de Cariobá (PCAB02100); três amostras do rio Atibaia junto à captação no município de Atibaia (ATIB 02010); três amostras do rio Atibaia na captação de Campinas divisa entre os municípios de Campinas e Valinhos (ATIB02065) e duas amostras do rio Capivari na captação de Campinas, ETA Capivari, Rodovia dos Bandeirantes (CPIV 02130).

3.1.4 UGRHI 06 – Bacia do Alto do Tietê

A Bacia do alto do Tietê é composta pelos rios Tietê, Claro, Paraitinga, Biritiba-Mirim, Jundiaí e Taiaçupeba-Mirim, rios Embu-Guaçu e Embu-Mirim, rio Cotia, rios Baquirivu-Guaçu, Tamanduateí, Pinheiros e Juqueri, e Córregos Aricanduva e Cabuçu de Baixo. Entre outros reservatórios, se encontra o reservatório da represa de Guarapiranga (CETESB, 2006). Nesta unidade foram coletadas duas amostras no rio Cotia junto a captação de águas para ETA do Baixo Cotia (COTI 03900) e uma amostra da Represa de Guarapiranga na captação da SABESP junto à casa de bombas (GUAR 00900).

3.1.5 UGRHI 07 – Baixada Santista

Entre os constituintes principais dessa Unidade estão os rios Cubatão, Moji, Branco e Quilombo, que deságuam no estuário de Santos, os rios Itatinga, Itapanhaú, Capivari e Monos e os rios que deságuam no mar entre Bertioga e Iguape. O rio Cubatão recebe as águas advindas do Reservatório Billings, por meio do Canal de Fuga da Usina Hidroelétrica de Henry Borden, que está localizada na Baixada Santista (CETESB, 2006). Em relação a essa unidade, foi utilizada nesse estudo uma amostra coletada no Canal de Fuga II, Usina de H. Borden na saída da usina externa (CFUG 02900). Na tabela 1 pode-se observar os dados relativos aos pontos e o período de cada coleta.

Tabela 1 - Relação de amostras apresentando valores de turbidez, DBO, DQO, OD, CTt, segundo os pontos de coleta e condições do tempo.

Nº Amostra	UGRHI	PONTOS DE COLETA	DATA COLETA	TURBIDEZ UNT	DBO (5,20) mg/L	DQO mg/L	OD mg/L	CTt UFC/100 mL
294	5-PCJ	Rio Piracicaba captação Piracicaba	9/5/2006	7,2	3	<50	*2,6	$1,3 \times 10^4$
295	6-AT	Rio Cotia (capt. ETA do Cotia baixo)	10/5/2006	3,7	11	<50	3,8	$8,8 \times 10^4$
296	5-PCJ	Rio Piracicaba captação Americana	16/5/2006	7,3	2	<50	7,5	21
297	2-PS	Rio Paraíba captação Aparecida	21/6/2006	16	2	<4	7,6	$3,3 \times 10^3$
298	6-AT	Reservatório de Guarapiranga – SABESP	13/7/2006	1,6	<3	<50	10,9	4
299	5-PCJ	Rio Atibaia captação de Atibaia	17/7/2006	26	2	<50	5	48
300	5-PCJ	Rio Atibaia captação de Campinas	17/7/2006	33	7	<50	7,7	$7,9 \times 10^3$
301	5-PCJ	Rio Piracicaba Americana – Cariobá	25/7/2006	6	3	<50	5,7	20
302	5-PCJ	Rio Atibaia- Atibaia	18/9/2006	32	<2	<50	3,2	$1,3 \times 10^3$
303	5-PCJ	Rio Atibaia captação Campinas-Valinhos	18/9/2006	117	6	<50	6,6	$4,9 \times 10^4$
304	5-PCJ	Rio Piracicaba Americana-Cariobá	20/9/2006	7	3	<50	4,4	230
305	5-PCJ	Rio Capivarí Campinas	2/10/2006	19	7	<50	5,2	$3,5 \times 10^4$
306	5-PCJ	Rio Atibaia – Atibaia	6/11/2006	15	<2	<50	4,9	$1,1 \times 10^3$
307	5-PCJ	Rio Atibaia captação Campinas-Valinhos	6/11/2006	30	3	<50	6,2	$3,3 \times 10^3$
308	6-AT	Rio Cotia captação ETA Baixo Cotia	21/11/2006	28	10	<50	8,6	$2,4 \times 10^5$
309	2-PS	Rio Paraíba captação Aparecida	6/12/2006	44	2,6	<50	3,6	$4,9 \times 10^4$
310	5-PCJ	Rio Paraíba captação Aparecida	11/12/2006	53	5	<50	5,6	$1,7 \times 10^4$
311	7-BS	Canal de fuga II Usina H. Borden	13/12/2006	4,1	4	<50	7,4	45

Fonte: CETESB (2007). **Legenda:** 2PS – Paraíba do Sul; 5PCJ – Piracicaba, Capivari, Jundiaí; 6AT – Alto Tietê; 7BS – Baixada Santista. DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio; DQO- Demanda Química de Oxigênio; OD - Oxigênio Dissolvido; CTt- Coliformes Termotolerantes.

3.2- Procedimentos para concentração das amostras

Após homogeneização, 10L de água foram transferidos para o vasilhame de pressão (Millipore® Brasil), para serem concentradas em membranas de éster de celulose com 142 mm de diâmetro e 0,45 um (Millipore® Brasil).

As membranas foram então retiradas e acondicionadas em sacos plásticos tipo “zip” devidamente identificados, contendo 200 mL de água da amostra e 200µl de solução de Tween 80 a 0,1%, sendo submetidos ao banho ultra-sônico para facilitar a retirada dos oocistos retidos na membrana. Todo o conteúdo líquido foi transferido para 4 tubos cônicos de centrífuga de 50 mL e centrifugados a 5.000 rpm, por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi transferido para um único tubo de centrífuga de 50 mL ressuspenso em 25 ml de água da própria amostra e submetido à centrifugação a 5.000 rpm (7.428 x g) por 30 minutos a 4°C. Na etapa final esse sedimento foi armazenado em tubos tipo Eppendorf® de 2,0 mL com 1,0 mL de água ultra pura estéril (MilliQ®) mantidos a – 20°C para posterior extração do DNA genômico.

3.3- Métodos Moleculares

3.3.1- Extração do DNA genômico de *Cryptosporidium*

A extração do DNA genômico do oocisto de *Cryptosporidium* sp. foi realizada pelo método de Fenol/Clorofórmio/Álcool-isoamílico, com base na metodologia proposta por CARVALHO ALMEIDA et al. (2005) no protocolo descrito a seguir:

- Em um volume de 200 µl da amostra foi acrescentado 500 µL da solução de lise {50 µl de100mM Tris – HCl (pH=8,0) + 50 µl de 50 mM EDTA (pH=8,0) + 50 µl de SDS 10% + 3,5 µl de 70 mM β mercaptoetanol + 346,5 µl de H_2O MQ;
- Esta solução foi homogeneizada vigorosamente e levada ao banho-maria 65° por 1 h e 30 minutos;
- 20 µL de Proteinase K (20mg/ml) foram acrescentados e incubados novamente em banho-maria a 65°C por 2 h e 30 minutos;
- As amostras foram colocadas em banho de gelo por 15 minutos e após o período de incubação foi acrescentada a solução de extração do DNA, 500 µL de Fenol-Clorofórmio-Isoamilico {250 µl de fenol + 240 µl de clorofórmio + 10 µL de álcool isoamílico (25:24:1)}, homogenizada vigorosamente para separação da fase líquida contendo o DNA de interesse;
- Após centrifugação a 12.000 rpm (17.828 x g) por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante era transferido cuidadosamente com

auxilio de uma pipeta automática para um novo tubo de 2 mL e acrescentado 500 µL de clorofórmio. Essa mistura foi centrifugada novamente a 12.000 rpm (17.828 x g) por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para tubos novos de 2,0 mL e acrescidos de 500 µL de isopropanol gelado utilizado para precipitar o DNA de interesse;

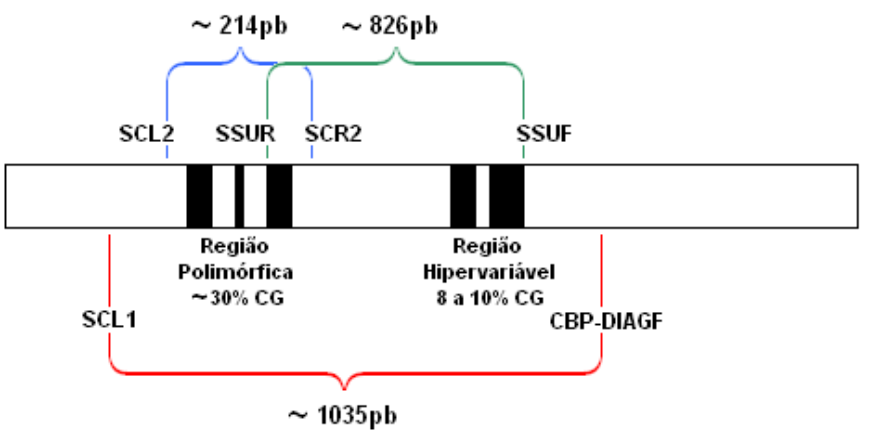
- Após a precipitação os tubos contendo o DNA foram então centrifugados a 12.000 rpm (17.828 x g) por 3 minutos a 4° C e o sobrenadante desprezado cuidadosamente; 500 µL de álcool etílico 70% gelado foi acrescentado para lavar o DNA;
- Esta solução foi centrifugada novamente a 12.000 rpm (17.828 x g) por 3 minutos a 4° C, desprezando o sobrenadante com cuidado; Os tubos foram mantidos abertos sob vácuo por um período12 horas para secagem do DNA;
- O DNA foi reidratado com 50 µL de tampão TE II {10mM Tris (pH = 8,0) + 1mM EDTA (pH = 8,0)} e armazenado a 4°C, até ser utilizado para amplificação por PCR.

3.3.2- Amplificação do DNA pela reação em cadeia pela polimerase dupla (*Nested*)

Para a detecção molecular da presença de *Cryptosporidium* spp. nas amostras ambientais foram realizadas amplificações do gene da região *18S*

rRNA comum a todas as espécies utilizando os iniciadores descritos previamente por COUPE et al. (2005).

Na primeira reação de PCR foram utilizados os iniciadores externos, SCL1- direto (5'- CTG.GTT.GAT.CCT.GCC.AGT.AG - 3') e o CPB-DIAGR - reverso (5'- TAA.GGT.GCT.GAA.GGA.GTA.AGG - 3') amplificando um fragmento de aproximadamente 1035 pares de bases. A região amplificada e os iniciadores utilizados na reação de PCR estão representados esquematicamente na Figura 5.



Fonte: Adaptado de COUPE et al. (2005)

Figura 5 - Esquema representativo das regiões variáveis e posição dos iniciadores dentro do gene *18S rRNA* para identificação do *Cryptosporidium*.

Os iniciadores utilizados na reação de *nested*-PCR estão representados no quadro 2.

Quadro 2 – Lista de iniciadores empregados para amplificação do fragmento *18S rRNA* de *Cryptosporidium*.

Primers	Seqüência	Posição	Banda
SCL1**F**	5'- CTG.GTT.GAT.CCT.GCC.AGT.AG - 3'	4 - 23	~1035 pb Coupeet al., 2005
CPB-DIAG**R**	5'- TAA.GGT.GCT.GAA.GGA.GTA.AGG - 3'	1016-1036	
SSU **F**	5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG -3'	171 - 196	~826 - 864 bp Xiao et al., 2000
SSU **R**	5'- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A - 3'	1006- 985	
SCL2 **F**	5'- CAG.TTA.TAG.TTT.ACT.TGA.TAA.TC - 3'	106 - 128	~214 pb Coupe et al., 2005
SCR2**R**	5'- CAA.TAC.CCT.ACC.GTC.TAA.AG - 3'	299 - 318	

A reação de PCR foi realizada em cinco réplicas para cada amostra padronizada durante o presente estudo, contendo 5 µL de DNA, com volume final de 25 µL cada, contendo: 5 µl de DNA, 12,55 µl de água ultra pura, 2,5 µl de tampão 10X (contendo 2,5 mM de $MgCl_2$), 1,0 µl de PVP 1%, 0,15 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (AmResco), 0,3 µM de cada iniciador (Bioneer Oligo Synthesis Report) e 1,25 U de *Tth* DNA polimerase termoestável (Biotools® Madrid Spain).

As reações foram incubadas em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf ®), como segue: 1 ciclo para desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 40 ciclos compostos de desnaturação a 95°C por 2 minutos;

emparelhamento a 60°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 90 segundos e finalmente 1 ciclo para extensão final 72°C por 10 minutos. Após a reação as amostras eram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador.

Os produtos da primeira reação de PCR (as cinco réplicas) foram então transferidos para um único tubo novo e purificado utilizando o kit Ilustra ™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE® Health care, UK) seguindo as instruções do fabricante.

Para a segunda etapa da PCR utilizou-se cinco réplicas do produto amplificado após purificação com os seguintes iniciadores internos: 826 *SSU* direto e reverso descritos por XIAO et al. (2000) amplificando um fragmento de 826pb aproximadamente e os iniciadores SCL2 - direto e SCR2 - reverso descritos por COUPE et al. (2005), amplificando um fragmento de aproximadamente 214pb.

Para esta reação foi realizada uma mistura de PCR ("master mix") com volume final de 50 µl contendo 5 µl de produto amplificado (amplicon), 37,89 µl de água ultra pura Milli Q ,2,5 µl de tampão 10X (contendo 2,5 mM de $MgCl_2$), 0,15 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,4 µM de cada iniciador, 1,25 U de *Tth* DNA polimerase termoestável (Biotools® Madrid Spain).

As condições para amplificação final do produto são as mesmas da anterior à exceção da desnaturação a 95°C por 30 segundos e emparelhamento a 58°C por 45 segundos. Os produtos da segunda reação

de PCR (*Nested*), foram purificados com o kit Ilustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE® Health care, UK).

3.3.3- Eletroforese em gel de agarose

A cada tubo contendo o produto amplificado foi adicionado 5 µl de tampão carregador de amostra (glicerina + azul de bromofenol). Dez microlitros desta mistura foram aplicados em cada poço do gel de agarose 2% (Amersham Biosciences) corado com 5,0 µl de Brometo de etídio e imerso em Tampão Tris – Acetato - EDTA (TAE) 1X. Dois microlitros de marcador de peso molecular (1 Kb DNA "ladder": 1 µg/ µl. Invitrogen. USA) foi utilizado. A corrida padronizada em uma hora a 6 v/cm.

O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta de 302 nm em transiluminador e fotodocumentado. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP).

3.4- Genotipagem dos isolados nas amostras ambientais

3.4.1- Clonagem do fragmento amplificado

Uma alíquota de 3 µL do produto contendo 214 pb do *18S rRNA* purificado foi transferida para um microtubo de polipropileno e adicionado 5µL de tampão de reação 2X, 1µL do vetor plasmidial comercial e 1µL de enzima T4 DNA ligase. Após a mistura dos reagentes, o tubo foi incubado por um período de 18 horas a uma temperatura de 10°C para a ligação do fragmento de interesse com o vetor plasmidial. O produto de ligação foi então transformado em células competentes de *E. coli* – JM109 com a adição de 50µL da referida célula na concentração de 10^{8} células por mL, mantido em gelo por 20 minutos e em seguida levado ao banho de água por 50 segundos a 42°C e mais 2 minutos em banho de gelo (choque térmico). A esse tubo foi adicionado 950µL de caldo Luria suplementado com (50 µg/mL de amplicilina), sendo então incubado à 37°C por 2 horas em estufa com agitação. Duzentos microlitros do caldo de cultura foram transferidos para uma placa de Petri contendo ágar Lúria adicionado de 50 µg/mL de amplicilina, 0,5 mM de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) e 80 µg/mL de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) e incubado por 24 horas à 37° C para observação de colônias brancas

representantes de clones contendo vetor plasmidial inserido com o fragmento em estudo.

Colônias brancas de tamanho maior que a média das colônias azuis foram selecionadas para verificação da presença do fragmento. Essas colônias foram cultivadas em 3 mL de caldo Lúria com amplicilina 50 µg/mL por 18 horas à 37°C e submetidas a uma extração de plasmídios utilizando *kit* Ilustra™ Plasmidprep Mini Spin (GE® Health care, UK) conforme instruções do fabricante.

Para a verificação da inserção, foi realizada uma reação de PCR utilizando os iniciadores M13 - direto (5'-TGT.AAA.ACG.ACG.GCC.AGT-3') e M13- reverso (5'-CAG.GAA.ACA.GCT.ATG.ACC-3'), correspondentes às regiões de flanco do vetor plasmidial. O resultado foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, 6 v/cm por 1 hora. Após confirmação da presença do inserto, os clones foram enviados para seqüenciamento.

3.4.2- Seqüenciamento do fragmento clonado

As amostras foram encaminhadas para seqüenciamento utilizando os iniciadores M13 - direto e M13- reverso. Todas as amostras foram seqüenciadas pela empresa Genomic (Engenharia Molecular).

As seqüências obtidas foram alinhadas e submetidas ao sistema BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) para comparação com seqüências homologas disponíveis de *Cryptosporidium* no banco de dados

GenBank (http://www.ncbi-nml.nih.gov/genbank/) e comparadas com seqüências disponíveis que foram alinhadas manualmente utilizando o programa BioEdit (Biological sequence alignment editor). A Análise filogenética foi realizada através do programa Mega 4.1 (http://www.megasoftware.net/m_test_reliab.html).

4. RESULTADOS

4.1 - Detecção de *Cryptosporidium* nas amostras de águas superficiais e recreacionais

Foram avaliadas 12 amostras de águas recreacionais coletadas no rio Ribeirão da Fazenda e 18 amostras de águas superficiais em diferentes pontos de captação. No total 30 amostras foram coletadas entre os anos de 2005 e 2006. A ocorrência do parasita *Cryptosporidium* foi detectada em 9 (30%) do total de amostras analisadas. No Ribeirão da Fazenda das doze amostras avaliadas, cinco foram positivas pela *Nested*-PCR, por meio de análises das seqüências genéticas obtidas, foi possível a caracterização de duas amostras. No Ribeirão da Fazenda foram identificadas as espécies *C. hominis* e *C. andersoni.* Nas amostras de águas superficiais analisadas, quatro foram positivas pela *Nested*-PCR, sendo essas pertencentes ao R. Piracicaba na captação Piracicaba, Piracicaba na capitação Americana, Represa de Guarapiranga e Atibaia na capitação Campinas. As análises das seqüências obtidas na amostra da Represa de Guarapiranga revelou a presença de *C. meleagridis*. Na tabela 2 é possível observar os resultados obtidos na *Nested*-PCR e a caracterização taxonômica dos fragmentos amplificados condizentes com *Cryptosporidium*.

Tabela 2- Resultados obtidos contendo reações positivas e negativas para a genotipagem de *Cryptosporidium* nas amostras estudadas.

Amostras	PONTOS DE COLETA	Nº CLONES	ESPÉCIES	PCR
200	Canal do Ribeirão da Fazenda S. Sebastião/SP	-	-	+
201	Canal do Ribeirão da Fazenda S. Sebastião/SP	-	-	+
204	Canal do Ribeirão da Fazenda S. Sebastião/SP	C1, C3, C5, C13	*C. hominis*	+
210	Canal do Ribeirão da Fazenda S. Sebastião/SP	-	-	+
215	Canal do Ribeirão da Fazenda S. Sebastião/SP	C14, C16, C17,C18	*C. andersoni*	+
294	Rio Piracicaba captação Piracicaba	C26	-	+
295	Rio Cotia captação ETA do Cotia baixo	C27	-	-
296	Rio Piracicaba captação Americana	C28-C29	-	+
297	Rio Paraíba captação Aparecida	C30	-	-
298	Reservatório de Guarapiranga – SABESP	C31	*C. meleagridis*	+
299	Rio Atibaia captação de Atibaia	C33	-	-
300	Rio Atibaia captação de Campinas	C34	-	+
301	Rio Piracicaba Americana – Cariobá	C35	-	-
302	Rio Atibaia- Atibaia	C36	-	-
303	Rio Atibaia captação Campinas-Valinhos	C37	-	-
304	Rio Piracicaba Americana-Cariobá	C39	-	-
305	Rio Capivarí Campinas	C40	-	-
306	Rio Atibaia – Atibaia	C41	-	-
307	Rio Atibaia captação Campinas-Valinhos	C42	-	-
308	Rio Cotia captação ETA Baixo Cotia	C43	-	-
309	Rio Paraíba captação Aparecida	C44	-	-
310	Rio Paraíba captação Aparecida	C45	-	-
311	Canal de fuga II Usina H. Borden	C46	-	-

(+)/(-) reações positivas e negativas para presença de *Cryptosporidium*. As amostras negativas referente ao R. Ribeirão da Fazenda não costam na tabela acima, apenas amostras positivas e clonadas.

4.2 - Resultados da otimização das técnicas de concentração e extração do DNA de *Cryptosporidium*

Devido ao baixo número de oocistos presentes em amostras de água, principalmente nas amostras principalmente nas águas superficiais, o método de filtração em membranas foi modificado no decorrer do presente estudo com a finalidade de aumentar a recuperação de oocistos durante o processo de concentração e evitar a manipulação excessiva para garantir uma quantidade maior e uma qualidade melhor do DNA isolado nas amostras que serviram como molde para amplificação pela PCR .

No procedimento de extração do DNA genômico foi realizada modificações com base na metodologia desenvolvida por CARVALHO-ALMEIDA et al. (2005), com ajustes na redução no tempo de realização e diminuição de substâncias inibidoras assegurando uma melhor qualidade do DNA extraído, devido as características ambientais dessas amostras.

Em suma, foram acrescidos no tampão de lise 1µl of polyvinilpyrrolidone (PVP)(Sigma®) 1% e houve uma alteração no tempo de incubação por 90 minutos em banho-maria e após a adição de proteinase K, a amostra foi novamente incubada por um período de 120 minutos. Para extração do DNA com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico foi utilizados os tubos Phase Lock Gel Heavy (Eppendorf®, Germany) para separação da fase aquosa que contem o DNA de interesse, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 4°C, assim a fase aquosa contendo o DNA extraído pode ser

removida por inversão sem ocorrer a contaminação com fenol. Após a precipitação o DNA foi conservado a 4° C até a utilização.

4.3- Caracterização de *Cryptosporidium* por métodos moleculares

Todas as amostras foram submetidas à reação de *nested*-PCR utilizando o set de iniciadores correspondente a subunidade menor do gene 18*S rRNA* amplificando aproximadamente 1035 pb e 214 bp descritos por COUPE et al. (2005) para detecção do gênero. Na figura 6 é possível observar alguns dos resultados obtidos na reação de *Nested*-PCR .

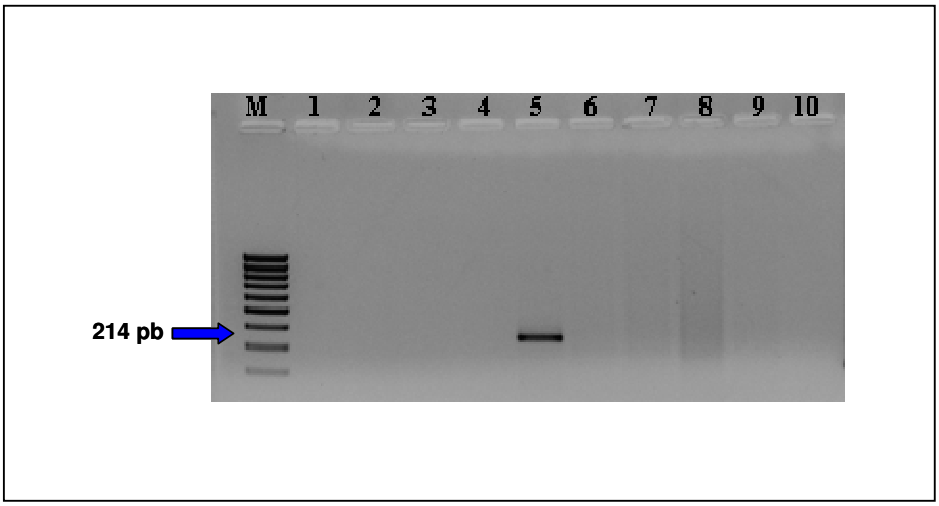


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos purificados após amplificação pela *nested*-PCR para a seqüência 214 pb. M, peso molecular (50pb); Canaleta 1,2,3,4,6,7,8,9,10 amostras negativas referentes ao Ribeirão da Fazenda; Canaleta 5, amostra positiva do Ribeirão da Fazenda.

Foi realizada uma reação de *nested*-PCR utilizando-se os iniciadores de COUPE et al.(2005) na primeira reação e os iniciadores propostos por XIAO et al. (2000) na segunda reação. Em relação a essa amplificação em apenas uma amostra foi possível obter a revelação de banda em gel de agarose. A figura 7 representa a amplificação pela PCR com a banda de 826pb na amostra do rio Ribeirão da Fazenda.

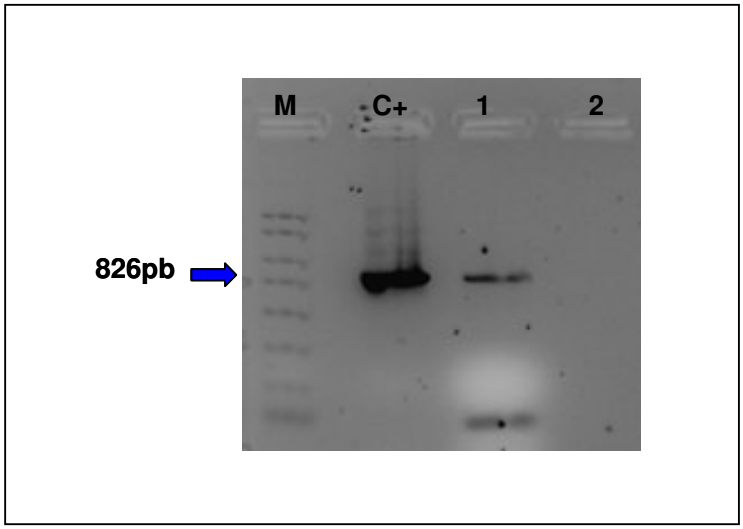


Figura 7- Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos amplificados pela *nested*-PCR para a seqüência 826pb. M, Peso molecular; Controle positivo; Canaleta 1, amostra Ribeirão da fazenda, positiva; Canaleta 2, amostra Ribeirão da fazenda, negativa.

Na figura 8 é possível ver os resultados obtidos na reação de PCR com iniciadores 214pb nos Rios Piracicaba na capitação de Piracicaba,

Piracicaba na capitação de Americana, Represa de Guarapiranga e Rio Atibaia na captação de Campinas.

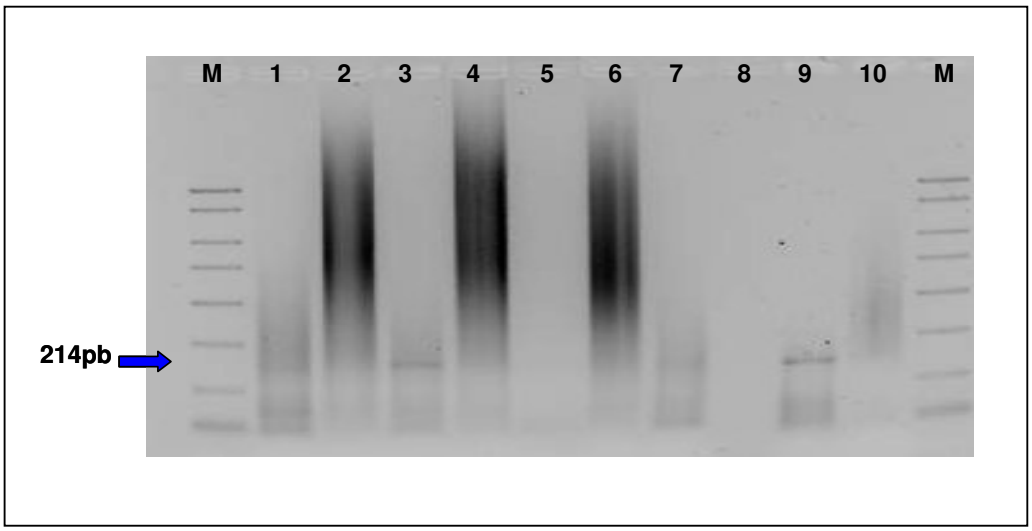


Figura 8- Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos amplificados nas reações de *nested*-PCR para o fragmento de 214pb. M, Peso molecular; Canaleta 1, R. Piracicaba captação Piracicaba; Canaleta 2, R. Cotia capitação ETA do Baixo Cotia; Canaleta 3: R. Piracicaba captação Americana; Canaleta 4, R. Paraíba captação Aparecida; Canaleta 5, R. Piracicaba Americana-Cariobá; Canaleta 6, R. Atibaia captação Atibaia; Canaleta 7, Rio Atibaia captação Campinas; Canaleta 8, R. Capivari Campinas; Canaleta 9, Represa de Guarapiranga; Canaleta 10, Canal de FugaII Usina H. Borden.

Com intuito de genotipar as reações positivas no PCR e as reações negativas que poderiam conter uma quantidade baixa de *amplicon,* dificultando sua visualização no gel de agarose, todas às amostras foram submetidas à clonagem. Cerca de 50 colônias por amostra foram selecionados para triagem da presença do inserto e foi observado durante a seleção uma grande quantidade de colônias azuis com o dobro do tamanho das colônias normais que também foram selecionadas para triagem e poucas colônias brancas referentes a amostras clonadas. Na figura 9, pode-se observar o controle positivo com presença de colônias brancas clonadas (A) e a presença de colônias azuis clonadas a partir das amostras amplificadas (B).

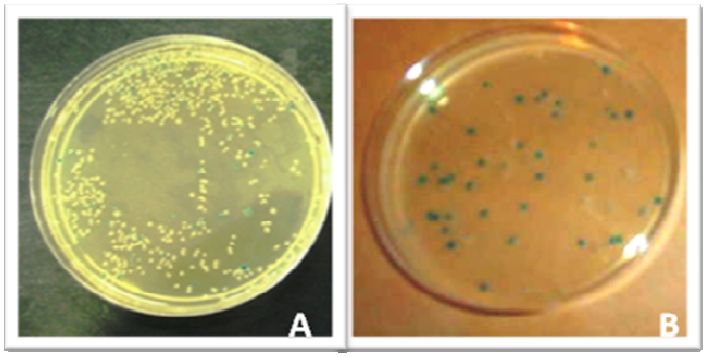


Figura 9- Colônias contendo clones positivos e negativos na reação.

A partir dos clones obtidos, foram realizadas extrações de plasmídio e o vetor contendo o fragmento de interesse foi submetido à preparação para o seqüenciamento, com realização de uma reação de PCR com os iniciadores M13 direto e reverso correspondentes às regiões de flanco do

vetor plasmidial. A figura 10 revela a presença de banda em gel de agarose, positiva para presença do inserto nas amostras clonadas.

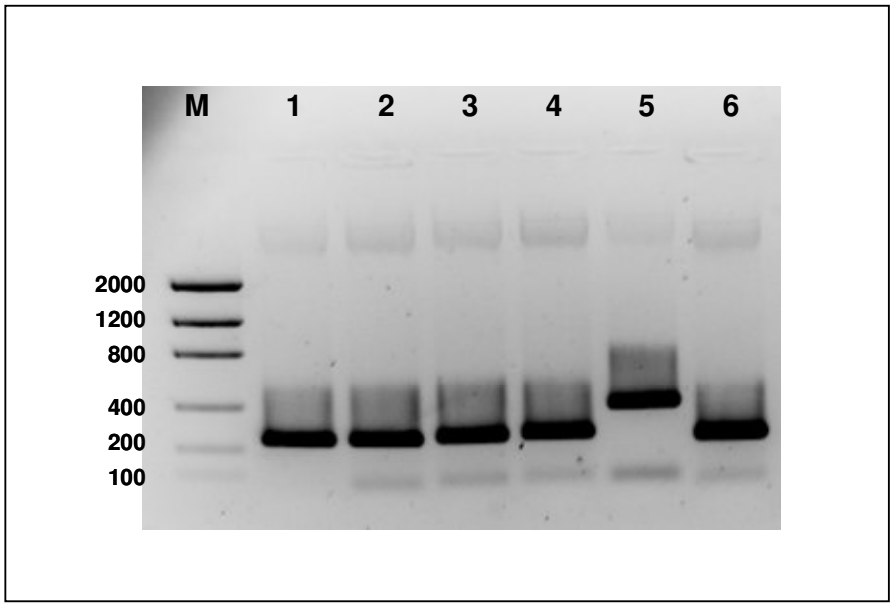


Figura 10- Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto amplificado com iniciadores M13 pela PCR. M, Peso molecular, Canaletas 1,2,3,4,6, amostras clonadas da Represa de Guarapiranga negativas para presença do inserto; Canaleta 5, amostra clonada da represa de Guarapiranga positiva contendo o inserto.

Após o seqüenciamento foi realizada as análises das seqüências genéticas obtidas. Na figura 11 é possível verificar os resultados obtidos no seqüenciamento com alinhamento das seqüências no BioEdit e na Figura 12 a relação filogenética entre os isolados nas amostras ambientais e seqüências conhecidas do GenBank.

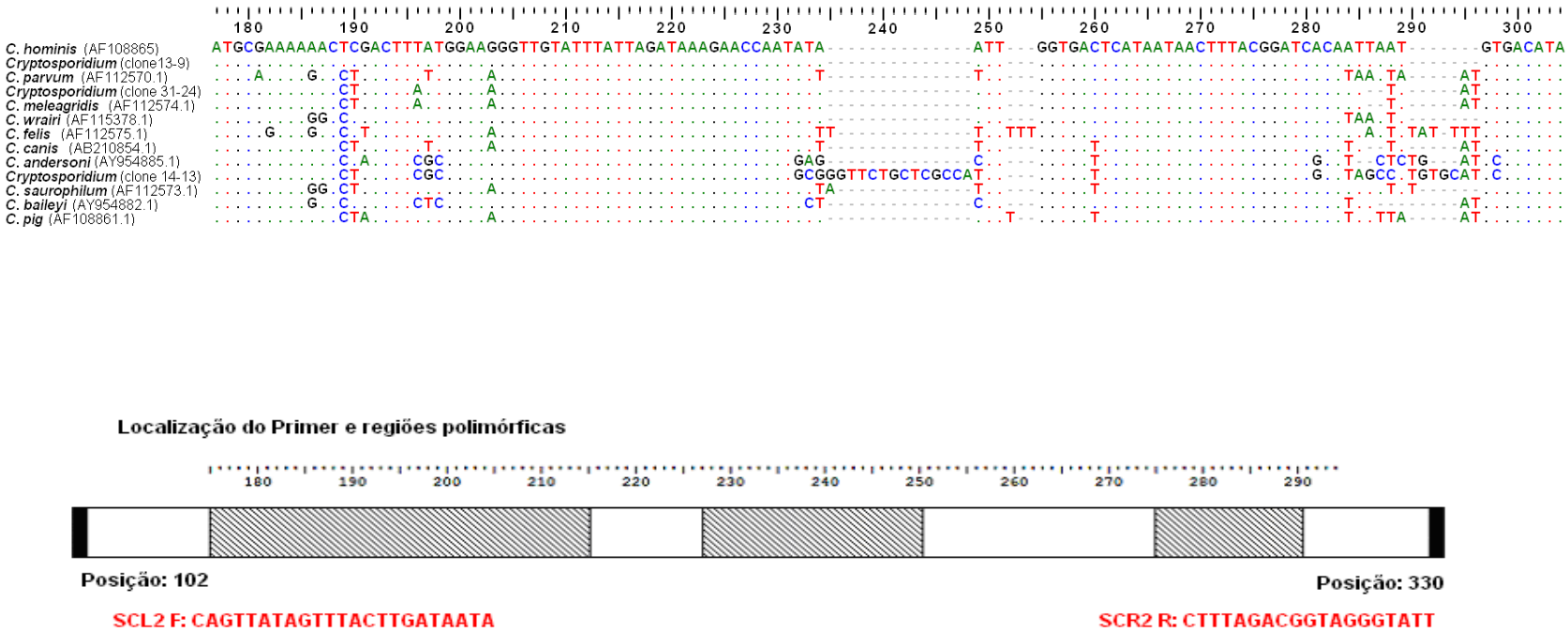


Figura 11- Esquema da posição dos iniciadores 214pb : SCL2 F e SCR2 R destacados em vermelho e as regiões polimórficas utilizadas para comparação das seqüências obtidas com as seqüências disponíveis no GenBank destacadas na textura.

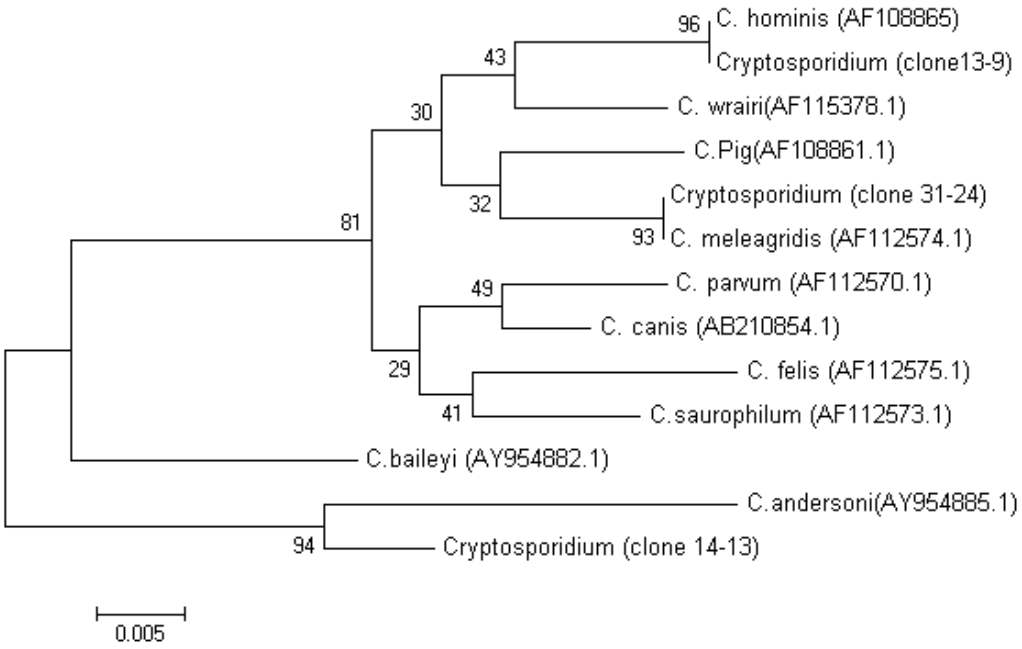


Figura 12 - Árvore filogenética baseada no método neighbor-joining, utilizando a seqüência parcial do gene *18S rRNA* (186 pb) de diferentes espécies de *Cryptosporidium* e valores de Bootstrap após 1000 simulações. As seqüências das diferentes espécies são originárias do banco de dados GenBank e as demais denominadas clones 13-9, 14-13 e 31-24 são oriundas de banco de dados do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP.

5. DISCUSSÃO

O crescente número de patógenos que podem ser carreados através das águas utilizadas para o consumo humano é considerado um fator preocupante para a saúde pública. Deste modo, tem se tornado necessário o monitoramento de certos organismos patogênicos para o homem, a fim de entender sua disseminação no meio ambiente, seus ciclos epidemiológicos e planejar programas de vigilância à saúde da população.

O parasita *Cryptosporidium* representa hoje o terceiro mais importante agente causador de diarréia no mundo. A transmissão hídrica passou a ser um veículo importante na disseminação de oocistos infectantes que são eliminados no ambiente por diferentes hospedeiros, sendo a criptosporidiose uma zoonose, os animais domésticos e selvagens constituem reservatórios importantes na transmissão dessa doença para o homem (FAYER et al., 2004).

Técnicas moleculares que detectam polimorfismos ao nível de ácidos nucléicos ou mesmo variações alélicas ao nível enzimático têm surgido nos últimos tempos como ferramentas importantes no conhecimento da estrutura genética, diferenciação e classificação das espécies de *Cryptosporidium* (XIAO et al., 2002).

A identificação correta desse patógeno é de extrema importância não só sobre o aspecto clínico, mas também em estudos epidemiológicos. Muito embora os métodos convencionais aplicados na identificação de agentes parasitários em amostras clínicas apresentem boa aplicabilidade esse

processo pode se mostrar mais complexo em se tratando de amostras ambientais.

LEE et al. (2004), discorreram sobre a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em águas superficiais e a aplicação de técnicas eficientes, reprodutíveis e relativamente simples para que essas metodologias não fiquem restritas apenas a centros de pesquisas.

Reuniões internacionais e testes interlaboratoriais que avaliem a aplicação, comparabilidade e reprodutibilidade de ferramentas moleculares padronizadas têm sido realizados. Segundo o Workshop intitulado, "*Application of Genotyping Methods to Assess Pathogen Risks from Cryptosporidium in Drinking Water Catchments*", realizado em Marrocos em 23 de setembro de 2004, um dos principais objetivos desses eventos é propor um consenso internacional na utilização de ferramentas genotípicas que possam auxiliar na determinação do significado para saúde pública dos oocistos isolados em amostras clínicas que são encontrados em corpos d' água (FERGUSON et al., 2006).

Devido ao baixo número de oocistos presentes em amostras de água, principalmente em amostras de água de superfície nas quais os oocistos estão mais diluídos, volumes entre 10 a 100L tem sido necessário para essa avaliação. Além da metodologia 1623 ("Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA" 1999) recomendada pela EPA, outros métodos como, ASTM - American Society for Testing and Materials, SMEWW - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater e o AM - Alternate method têm sido utilizado em alguns trabalhos

internacionais. Essas técnicas geralmente envolvem filtração por membranas ou cartuchos de polipropileno e purificação das amostras, entretanto, a técnica de visualização dos oocistos é realizada por imunofluorescência com anticorpos específicos (LEE et al., 2004).

Dentro desse contexto, há um esforço por parte dos pesquisadores em desenvolver técnicas confiáveis para a detecção e identificação de espécies que possam infectar o homem. Entretanto, é importante que esses métodos também apresentem baixos custos e que sejam de fácil execução, pois, os procedimentos utilizadas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras ambientais normalmente requerem a filtração de grandes volumes de água, equipamentos e materiais de alto custo, tornando a investigação deste agente inviável para a maioria dos laboratórios brasileiros.

De acordo com o projeto inicial, as primeiras amostras de água coletadas no rio Ribeirão da Fazenda em 2004, foram processadas pela técnica de filtração em membranas padronizada por FRANCO et al. (2001). Nesse protocolo foram utilizadas membranas menores de 47 mm de diâmetro e 0,22 µm e a remoção dos oocistos era realizada por raspagem das membranas. Respeitando o princípio da técnica, o processo de concentração em membranas foi modificado e a filtração das amostras foi realizada em membranas de éster de celulose com diâmetro maior, de 142 mm, e 0,45 µm em vasilhames de pressão de 10 litros. O aumento na porosidade reduziu a saturação permitindo a utilização de menor número de membranas. A solução de Tween 80 a 0,1% e um banho ultra-sônico foram

utilizados na remoção dos oocistos presentes na membrana favorecendo o descolamento dos oocistos. Na etapa de centrifugação, as amostras foram distribuídas em tubos maiores, de 50 ml, para evitar perdas durante a concentração do sedimento. Essa metodologia reduziu o tempo e favoreceu todo processo durante a concentração e remoção dos oocistos das membranas, facilitando o processamento das amostras dentro do prazo estabelecido de no máximo 24 horas após a coleta.

Nas amostras de água com aspecto mais turvo e com maior presença de sedimentos, foi possível observar uma saturação maior das membranas, principalmente, nas amostras do rio Ribeirão da Fazenda que, segundo o projeto de Avaliação Ecológico-sanitária da Qualidade das Águas do Município de São Sebastião, o local onde foram realizadas as coletas poderia estar sofrendo a influência de esgotos não pontuais. Em algumas amostras houve a necessidade do uso de pré-filtros que conseqüentemente demandou maior tempo na eluição das membranas.

Normalmente, pode-se observar uma grande quantidade de partículas presentes nas membranas após a filtração, tais como matérias orgânicas e inorgânicas. Como as metodologias de concentração por membranas são baseadas quase que exclusivamente no tamanho do organismo em estudo, o processo de saturação das membranas nesse tipo de amostra se torna mais rápido e a filtração mais lenta.

MULLER, (1999) constatou que a técnica de dissolução em membranas permite a análise de um volume maior de água, porém, esta se mostrou mais adequada em amostras de água após tratamento

convencional. Não obstante, a prática de precipitação química apesar de ser considerada uma metodologia de baixo custo e de fácil realização é indicada em casos de manipulação de amostras com alta turbidez e aplicada a amostras com volumes menores.

Segundo FARIAS et al. (2002) a desagregação de partículas presentes em amostras com alta concentração de sedimentos das membrana é de difícil excisão, entretanto, o uso de gradientes de densidades específicos para clarificação das amostras contendo oocistos de *Cryptosporidium* podem ocasionar perdas e interferir na recuperação dos oocistos mesmo durante a concentração por centrifugação.

DILLINGHAM et al. (2002) também advertiram para os cuidados durante os processos de concentração e centrifugação na pesquisa de *Cryptosporidium* podendo ocorrer perdas consideráveis ou até mesmo a destruição dos oocistos presentes no material. E, conseqüentemente, esses métodos tendem a aglomerar partículas que se fixam nos oocistos dificultando a etapa de detecção quando realizada por imunofluorescência.

Discrepâncias significativas são observadas entre os resultados de amostras detectadas pela microscopia e os métodos moleculares. As técnicas moleculares apresentam sensibilidade maior em relação à detecção por imunofluorescência, além disso, os kits comerciais utilizados não identificam todas as espécies nem genótipos e a exposição dos oocistos às pressões ambientais favorece a perda de antígenos de superfície importantes para revelação por imunofluorescência (JIANG et al., 2005; XIAO et al., 2006).

É possível encontrar na literatura, diferentes metodologias com base na detecção por anticorpos monoclonais e microscopia de epifluorescência, aplicadas com sucesso em diversos trabalhos associadas a técnicas de filtração em membranas, floculação com carbonato de cálcio e ultra-filtração adicionados ou não de métodos de purificação. (VERSEY et al., 1993; GRACZYK et al., 1997; MULLER, 1999; DIAS JUNIOR, 1999; FRANCO et al., 2001; SIMMONS et al., 2001; FARIAS et al., 2002; HACHICH et al., 2004).

Entretanto, seja qual for o método empregado na detecção, especial atenção deve ser dada a etapa de concentração em amostras ambientais, pois o sucesso da identificação é dependente de uma boa recuperação dos oocistos (LEE et al., 2004; BETANCOURT & ROSE, 2004).

Outra etapa não menos importante que a concentração dos oocistos para aplicação de métodos moleculares em amostras ambientais é a extração do DNA genômico que será utilizado para identificação das espécies de interesse.

A sensibilidade de diferentes métodos de extração de DNA genômico de *Cryptosporidium* tem sido avaliada tanto em amostras clínicas como em amostras ambientais. Sabe-se que a eficiência dos protocolos depende da eliminação de inibidores presentes nas amostras, da metodologia utilizada na lise celular e da escolha de iniciadores adequados para reação de amplificação do fragmento de interesse (CHALMERS et al., 2005).

No protocolo de extração de DNA proposto por CARVALHO ALMEIDA et al. (2005), a amostra é incubada em solução de lise contendo β-

mercaptoetanol para rompimento da parede celular e proteinase K para digestão de proteínas presentes na parede celular. A etapa de extração por fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico (25: 24:1) se torna uma etapa crítica no processo onde ocorre um interfaceamento entre a fase aquosa e orgânica e durante a remoção da fase aquosa onde se encontra o DNA extraído pode ocorrer contaminação.

Nesse estudo, foram sugeridas modificações no protocolo para extração de DNA de *Cryptosporidium* das amostras ambientais. O emprego do PVP durante o processo de extração assegura uma remoção mais eficiente de inibidores que podem co-precipitar com o DNA e foi extremamente útil na aplicação dessas amostras. No entanto, deve se tomar cuidado em relação às concentrações de PVP utilizadas durante a extração ou na própria reação de PCR. Concentrações ideais ficam entorno de 0,5 a 2%, evitando que ocorra uma interação do produto com a DNA polimerase, o que pode favorecer uma ação inversa ao esperado (KOONJUL, et al., 1999).

A introdução de tubos Phase Lock Gel Heavy (Eppendorf®, Germany) favoreceu a remoção da fase aquosa durante a extração do DNA evitando a contaminação por compostos orgânicos utilizados no procedimento. Em todo método houve também uma redução no tempo de extração de DNA de aproximadamente 1 hora contribuindo para um melhor desempenho na execução do protocolo.

A eficácia deste protocolo de extração de DNA para *Cryptosporidium* tem sido avaliada em estudos de genotipagem de amostras clínicas preservadas a -20°C. De acordo com os ensaios os baixos números de

oocistos presentes nas amostras podem ser contornados utilizando-se réplicas de amostras na extração de DNA (GONÇALVES et al., 2008).

Frente às dificuldades de obtenção de um DNA de qualidade, livre de inibidores e com quantidade suficiente para amplificação pela PCR, é possível encontrar vários protocolos de extração DNA que normalmente utilizam princípios químicos como fenol-clorofórmio, digestão alcalina ou físicos com uso de pérolas de vidro e choque térmico ou ainda o uso de *kits* de extração vendidos comercialmente (LAXER et al., 1991; AWAD-EL-KARIEM et al., 1994; WU et al., 2000; HIGGINS et al., 2001; WARD & WANG, 2001; XIAO et al., 2002; JELLISON et al., 2002; GATEI et al., 2003; CARVALHO ALMEIDA et al., 2005; COUPE et al., 2005; HUBER et al., 2007).

COUPE et al. (2005) empregaram métodos de extração de DNA de fezes utilizando lise alcalina, Chelex-100 e PVP para remoção de inibidores e verificaram a amplificação do gene *18S rRNA* pela *nested*-PCR associada a RFLP para identificação de espécies *de Cryptosporidium,* em amostras com um único oocisto.

WARD & WANG (2001), avaliando os métodos de extração por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, observaram que são necessários 10^4 oocistos para obter um sinal de amplificação, já quando a extração foi realizada com kit comercial foi possível obter amplificação com apenas 100 oocistos.

Alguns estudos de genotipagem de *Cryptosporidium* em amostras de reservatórios de água utilizam a metodologia 1623 (EPA) com o intuito de se

obter uma concentração dos oocistos mais pura e de se avaliar a reprodutibilidade das duas técnicas associadas (JIANG et al., 2005; XIAO et al., 2006; RUECKER et al., 2007).

A PCR é extremamente eficiente e sensível, isso comparado a soluções puras de ácidos nucléicos, entretanto, esse método pode ter sua capacidade de amplificação reduzida na presença de componentes inibidores normalmente encontrados em amostras de fezes ou em amostras ambientais.

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, mesmo utilizando um *set* de iniciadores mais sensível, foi possível obter uma pequena quantidade de *amplicon* (214bp), que foi suficiente para constatar a presença de *Cryptosporidium* em algumas amostras, porém não suficiente para dar andamento ao processo de digestão do fragmento com enzima de restrição, e seqüenciamento. Dessa forma foi realizado o processo com cinco réplicas para cada reação de PCR e cada etapa foi concentrada com a utilização de *kit* comercial para purificação Ilustra ™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE® Health care, UK), o material era armazenado a – 20°C até o momento do uso. A etapa de purificação se torna necessária para remoção dos interferentes presentes nas amostras a cada amplificação, esses interferentes são visíveis quando submetidos à corrida de eletroforese em gel de agarose dificultando a identificação do fragmento esperado quando presente na amostra.

O uso de réplicas na amplificação pela PCR em análise de amostras de água tem sido uma prática comum, pois o número de oocistos é baixo e

uma pequena concentração de DNA é extraída, além disso, a amplificação múltipla pode favorecer a identificação de populações mistas presentes nessas amostras (ZHOU et al., 2003; JIANG et al., 2005a; XIAO et al., 2006; RUECKER et al., 2007).

Uma reação de *nested*-PCR utilizando os iniciadores propostos por XIAO et al. (2000), foi realizada. Na primeira amplificação foi mantida a seqüência anterior de 1035pb descrita por COUPE et al. (2005) e na segunda reação foi utilizado os iniciadores correspondente a seqüência de 826pb. O objetivo dessa amplificação era obter um fragmento maior e mais completo para a clonagem e o seqüenciamento das amostras que seriam submetidas ao banco de dados GENBANK. Porém, esse resultado só foi obtido em uma das amostras do Ribeirão da Fazenda que já havia sido amplificada pelo *set* de iniciadores correspondente ao 214pb na *nested* PCR.

A primeira enzima polimerase utilizada nesse estudo foi retirada do mercado por problemas técnicos segundo o fabricante. Outras enzimas DNA polimerases foram então testadas até a padronização com a enzima *Tth* DNA Polimerase termoestável utilizada na técnica atual.

A *Taq* DNA polimerase apresenta índice de erro de incorporação de 10^{-4} a 10^{-5} por nucleotídeo, sendo amplamente afetada pelas condições da reação (concentração de cloreto de magnésio, dNTPs, pH e temperatura). Dependendo do método utilizado, os erros da DNA polimerase podem reduzir a especificidade da reação de PCR.

A enzima *Tth* DNA polimerase e a *Pwo* polimerase, têm sido utilizadas em protocolos para pesquisa de enterovírus e bactérias entéricas. Esses trabalhos sugerem uma melhor resistência e maior sensibilidade dessas enzimas em relação às *Taq* DNA Polimerase para amostras de fezes (SHAMES et al., 1995; RADSTRÖM et al., 2004).

Conforme observado nos resultados apresentados não houve a amplificação da seqüência esperada pela reação de PCR em algumas amostras estudadas e conseqüentemente a concentração do produto amplificado não foi suficiente para obter a caracterização molecular nestas amostras. Esses resultados eram esperados para as amostras ambientais uma vez que a concentração de oocistos nas amostras de água presente no meio ambiente pode variar , inclusive, de acordo com o volume de amostra concentrado, confirmando os dados relatados por CAREY et al. (2004).

Os resultados de amplificação positiva pela *nested*-PCR com iniciadores 214pb foram obtidos em nove amostras sendo estas referentes aos rios Ribeirão da Fazenda, Piracicaba na capitação de Piracicaba, Piracicaba na captação de Americana, Represa de Guarapiranga e Rio Atibaia na captação de Campinas.

Os produtos amplificados pela *nested*-PCR que não apresentaram bandas visíveis em gel de agarose (com baixa concentração ou com concentração adequada) tanto nas águas superficiais como recreacionais, foram então submetidos a clonagem e posteriormente ao seqüenciamento para a separação de espécies diferentes que poderiam estar presentes nas amostras.

Embora os resultados de detecção pela *nested*-PCR, apresentaram baixa positividade esses resultados corroboram com os valores encontrados por JELLISON et al. (2002), que pesquisaram a ocorrência do parasita em 34 amostras de águas superficiais com 15% de positividade para *Cryptosporidium* pela *nested*-PCR.

De acordo com o Programa de Monitoramento de Àguas de Superficiais conduzido pela CETESB no Estado de São Paulo, oito Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHIs), incluindo as unidades utilizadas como pontos de coletas neste estudo, têm sido avaliadas quanto a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia*. As UGRHIs 2,5,6 e 7 estão localizadas em uma região do Estado de São Paulo onde se encontra uma grande concentração populacional e centros industriais incluindo a cidade de São Paulo.

Na avaliação das oito UGRHIs, foram coletados 207 amostras de água, sendo 50,7% positivas para *Giardia* sp. com concentrações de 97 cistos/L e 8,7% das amostras foram positivas para *Cryptosporidium* sp. com concentrações de 6 oocistos/L de água (SATO et al., no prelo).

Estudos realizados em diversas regiões no mundo demonstraram que as concentrações de oocistos encontadas em águas superficiais é geralmente baixa. O quadro 3 apresenta alguns estudos realizados com a concentração de oocistos encontrada nas amostras de águas superficiais em diferentes regiões.

Quadro 3- Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de águas superficiais em diferentes países disponíveis na literatura consultada.

Local de ocorrência	Concentração de oocistos/L*	Fontes
Washington, Califórnia	2 a 112	Ongerth & Stibbs (1987)
Arizona - EUA	5800	Madore et al. (1987)
EUA e Alberta-Canadá	2,7	Lechevallier et al. (1991)
Yukon-Canadá	0,003	Roach et al. (1993)
Canadá	0,005	Wallis et al. (1996)
British Columbia-Canadá	0,006 a 1,5	Ong et al. (1996)
San Pedro-Honduras	0,58 a 2,6	Solo-gabriele (1998)
São Paulo-Brasil	236	Muller (1999)
Santa Fe- Argentina	0,2 a 5,39	Abramovich et al. (2001)
São Paulo-Brasil	0,5	Franco et al. (2001)
São Paulo-Brasil	65 a 760	Farias et al. (2002)
Grécia	0.002 a 0.004	Karanis et al.(2002)
Japão	40	Hashimoto et al.(2002)
Taiwan-China	0,3 a 0,56	Hsu &yeh (2003)
São Paulo-Brasil	20	Hachich et al. (2004)
México	17 a 200	Chaidez et al.(2005)
Itália	5,0	Briancesco & Bonadonna (2005)
Bogotá - Colômbia	100 a 10000	Alarcon et al.(2005)
Rússia e Bulgária	2 a 46	Karanis et al. (2006)
Paris	0,09	Coupe et al. (2006)
Alava - Espanha	0,078	Carmena et al.(2007)
Ontário - Canadá	0,04 a 1,50	Ruecker et al. (2007)
Oklahoma-EUA	0,2 a 182	Keeley & Faulkner (2008)
São Paulo	6,0	Sato et al. (no prelo)

*Os valores de concentração foram transformados para oocistos/L.

A metodologia de clonagem foi realizada segundo HANAHAN (1983) e de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial utilizado (Promega®Corporation), porém, algumas modificações na técnica foram necessárias devido à complexidade do produto utilizado para ligação.

Na primeira etapa do desenvolvimento da técnica de clonagem houve a necessidade de padronizar os reagentes utilizados na técnica de PCR. Para tornar melhor e mais específica a ligação do produto amplificado no vetor plasmidial, além de possuir alta termoestabilidade, a enzima deve ser livre de atividades inespecíficas de endo e exonuclease, bem como da atividade de corte conhecida como função *blunt end*.

O sequenciamento das amostras resultou em perfis compatíveis com as espécies *C. hominis, C. meleagridis e C. andersoni,* quando comparadas a seqüências homólogas disponíveis no banco de dados GENBANK. Entre as espécies identificadas o *C. hominis* apresentou seqüência idêntica às seqüências de *C. hominis* alinhadas do banco de dados. Este é o primeiro relato em amostras de água superficial no Brasil. Algumas características do ponto onde foram realizadas as coletas podem ter favorecido a presença dessa espécie nessas amostras. O rio Ribeirão da Fazenda, onde essa espécie foi identificada, tem sido avaliado quanto à presença de microrganismos patogênicos, pois vem sofrendo degradação decorrente de ação antroponótica, que interfererepresenta um fator de risco para ocorrência de doenças entéricas interferindo assim na qualidade dessas águas.

Segundo MORGAN-RYAN et al. (2002) os oocistos de *C. hominis* foram isolados a partir de fezes de humanos confirmando sua origem antropogênica e foi primeiramente identificado como *C. parvum* genótipo I ou genótipo H. Os oocistos medem em torno de 4,8 a 5,2 µm por 1,07µm de largura sendo impossível de se diferenciar morfologicamente dos oocistos de *C. parvum C. meleagridis*, *C. saurophilum, C. suis* e o genótipo I do gambá, que são espécies de caráter zoonótico.

Em relação ao *C. andersoni,* foi encontrado um padrão de similaridade compatível com essa espécie em uma das amostras coletadas no Ribeirão da Fazenda. A presença de *C. andersoni* é relacionada à contaminação por fezes bovina, uma vez que o bovino adulto é mais suscetível a infecção por essa espécie e sua ocorrência tem sido constatada em reservatórios de água localizados próximos a criações de gado. Esses oocistos são semelhantes ao *C. muris* e apresentam seu desenvolvimento biológico em células gástricas. Taxonomicamente o *C. andersoni* já foi confundido com *C. muris* frente à dificuldade de se obter informações completas do gene *18S rRNA* nos bancos de dados (JELLISON et al., 2002).

O *C. meleagridis* foi identificado em dois clones correspondentes as águas da Represa de Guarapiranga. *C. meleagridis* foi primeiramente identificado como agente etiológico de diarréia em aves domésticas e seu caráter zoonótico já está bem elucidado. Entretanto, essa espécie hoje é reconhecida como a terceira mais encontrada no homem, portanto, essa é uma informação epidemiológica importante, pois a presença dessa espécie

já foi constatada em indivíduos imunocomprometidos e animais domésticos no Brasil (ARAÚJO et al., 2007; HUBER et al., 2007).

No Brasil os dados sobre identificação genotípica em amostras ambientais são escassos. Assim, pouco se sabe sobre a ocorrência de espécies que possam estar circulando no ambiente em nosso país.

Nos trabalhos encontrados apenas é possível identificar a presença de oocistos em concentrações variadas em amostras de águas superficiais e tratadas, esgotos, córregos e água mineral. As amostras são processadas por técnicas que utilizam purificação por separação imunomagnética (IMS), Percoll ou sacarose e identificação por imunofluorescência (IF) visualizados em microscopia de contraste de fase ou epifluorescência. (MULLER, 1999; DIAS JUNIOR, (1999); FRANCO et al., 2001; FRANCO & CANTUSIO, 2002; FARIAS et al., 2002; SANTOS et al., 2004; NETO et. al., 2006; HELLER et al., 2006).

HACHICH et al. (2004) realizou um trabalho pioneiro de avaliação da distribuição dos protozoários *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. em diferentes Bacias Hidrográficas no estado de São Paulo. O índice de positividade encontrado foi de 2,5% de oocisto de *Cryptosporidium* e 27% de cistos de *Giardia* em amostras de água captadas para tratamento e consumo humano.

Teste de sensibilidade analítica da PCR para detecção de *Cryptosporidium* em amostras ambientais tem sido realizado apenas em escala laboratorial (PEREIRA, 2007).

COUTINHO (2007) identificou a presença de *C. hominis* e *C. parvum* por métodos genotípicos baseados na amplificação pela PCR seguida de RFLP em amostras de lagoas de estabilização em São Paulo, revelando a necessidade de técnicas de clonagem para diferenciação de espécies identificadas como *não C. hominis e não C. parvum* em sua pesquisa.

Recentemente, as espécies *C. meleagridis, C. bailey, C. felis, C. canis e C. parvum* foram identificadas por métodos de genotipagem aplicados em amostras de fezes de diferentes animais domésticos no Rio de Janeiro. Essa é uma informação importante para saúde pública, uma vez que esses animais podem atuar como reservatório da doença (HUBER et al. 2007).

Já em estudos de caracterização genotípica em isolados clínicos tem-se verificado a ocorrência de *C. hominis* em crianças e adultos imunocompetentes e imunodeficientes e a identificação de *C. meleagridis* em indivíduo HIV positivo (GATEI et al., 2003; BRANTLEY et al., 2003; BUSHEN et al.,2006; GONÇALVES et al., 2006; ARAUJO et al., 2007; GONÇALVES, 2007).

Com base na literatura avaliada, é possível observar a importância da contaminação e transmissão desses organismos para saúde pública. Vários fatores estão relacionados tanto com o parasita como o ambiente e todos desempenham um papel importante para a contaminação e disseminação. Estudos realizados na cidade de Fortaleza revelou a presença de *C. hominis, C. parvum* e não-C. *meleagridis* em amostras de fezes de pacientes HIV positivo. No Estado de São Paulo foram encontrados *C. hominis, C. parvum, C. meleagridis e Cryptospordium sp.,* em amostras de pacientes

com diarréia (GONÇALVES, 2002; CARVALHO ALMEIDA et al., 2006; ARAÚJO et al., 2007; ARAÚJO et al., 2007; GONÇALVES et al., 2008). Esses dados ressaltam a necessidade de mais estudos moleculares e epidemiológicos sob a real dispersão desse parasita em nosso país.

6. CONCLUSÃO

- De acordo com os resultados obtidos neste estudo o protozoário *Cryptosporidium* foi detectado em 30% das amostras analisadas e o seqüenciamento permitiu a identificação de *C. hominis* e *C. andersoni* nas águas recreacionais *e C. meleagridis* na amostra de água superficial.

- Os resultados demonstraram a utilidade do ensaio da *nested*-PCR em detectar DNA de *Cryptosporidium* em corpos d'água, uma vez que este protocolo pode incrementar significativamente a quantidade de *amplicon* obtido, mesmo com baixas concentrações de oocistos em amostras de água.

- O método utilizado na concentração dos oocistos evitou a manipulação excessiva da amostra reduzindo perdas durante o processo de concentração do sedimento.

- A metodologia utilizada na extração de DNA de *Cryptosporidium* com adição de 1% de PVP no tampão de lise e extração orgânica realizada em tubos Phase Lock Gel Heavy® se mostrou útil para remoção de interferentes nas amostras ambientais e ainda pode ser considerada de baixo custo.

7. RECOMENDAÇÕES

A disponibilidade de água potável e o saneamento básico adequado são elementos essenciais para manutenção da saúde humana e ambiental. Considerando, entretanto a importância do parasita *Cryptosporidium* como agente de veiculação hídrica, e a baixa dose de infecção (1 a 100 oocistos), torna-se importante não só a proteção das fontes de água utilizadas para consumo, como o tratamento adequado dessas águas. Os resultados de detecção de oocistos em corpos d´água devem ser avaliados com cuidado frente as limitações das técnicas utilizadas e dificuldade de padronização de métodos mais.eficientes para detecção desses microorganismos patogênicos, principalmente em amostras ambientais. Respeitando as dificuldades encontradas, mais esforços devem ser aplicados no desenvolvimento de metodologias avançadas que forneçam informações sobre a ocorrência e transmissão do *Cryptosporidium* através da água.

8. BIBLIOGRAFIA

1. ABE, N. & ISEKI, M. Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR – amplified small subunit ribosomal RNA gene. **Parasitol. Res.,** vol. 92, p. 523-526, 2004.

2. ADJEI, A.A.; ARMAH, H.; RODRIGUES, O.; RENNER, L.; BORKETEY, P.; AYEH-KUM, I. P.; ADIKU, T.; SIFAH, E.; LARTEY, M. *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea among at the Korle-Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana**. Jpn. J. Infect. Dis.,** v. 57, p. 216 – 219, 2004.

3. AMADI, B.; KELLY, P.; MWIYA, M.; MULWAZI, E.; SIANOMONGO, S.; CHANGWE, F.; THOMSON, M.; HACHUNGULA, J.; WATUKA, A.; WALKER-SMITH, J.; CHINTU, C. Intestinal and systemic infection, HIV, and mortality in Zambian children with persistent diarrhea and malnutrition. **J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.,** v. 32, p. 550 – 554, 2001.

4. ARAUJO,R.S. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em fezes de animais silvestres capturados nas áreas de inundação e entorno dos reservatórios de Paraitinga e Biritiba-Mirim.** 2004. 35 p.(Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo.

5. ARAUJO, R.S.; CARVALHO-ALMEIDA, T.T.; MATTÉ. G.R.; ROJAS, M.V.R.; PEREIRA, A.; MATTÉ, M.H. Detecção de oocistos de Cryptosporidium spp. em amostras de água salobra. **Bial.,** v.15, n.2, p. 31-32, 2005.

6. ARAÚJO, R.S.; CARVALHO, R.T.T.; MATTE, G.R.; FERNANDES, L.N.; BALSALOBRE, L.C.; MATTÉ, M.H. Modified method for detection of

Cryptosporidium oocysts using DNA templates extracted from environmental samples. **Rev. Vigil.San.,** v. 3, p.3-4, 2006.

7. ARAUJO, A.J.U.S.; GOMES, A.H.S.; ALMEIDA, M.E.; KANAMURA, H.Y. Detecção de *Cryptosporidium meleagridis* em amostras fecais de pacientes HIV positivos no Brasil. **Ver. Panam. Infectol.,** v.9, n.2, p. 38 – 40, 2007.

8. ARAUJO, A.J.U.S.; KANAMURA, H.Y.; ALMEIDA, M.E.; GOMES, A.S.; PINTO, T.H.L.; DA SILVA, A.J. Genotypic indentification of Cryptosporidium spp. isolated from HIV-Infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Rev.Inst. Med. Trop. S. Paulo.,** v.50, n. 3, p. 139 – 143, 2008.

9. AWAD-EL-KARIEM, F.M.; WARHURST, D.C.; MCDONALD, V. Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction. **Parasitolol.,** v. 109, p. 19-22, 1994.

10. BACHUR, T.P.R.; VALE, J.M.; COELHO, I.C.B.; QUEIROZ, T.R.B.S.; CHAVES, C.S. Enteric parasitic infections in HIV/AIDS patients before and after the highly active antiretroviral therapy. **Braz.J. Infect. Dis.,** v.12, n.2, p. 115-122, 2008.

11. BARALDI, S.R.; MARQUES, E.G.L.; DIAS, R.M.D.S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas, SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.,** v. 58, p.97 – 103, 1999.

12. BARTA, J.R. & THOMPSON, A.R.C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Tren. Parasitol.,** v. 22, n. 10, p. 463- 468, 2006.

13. BETANCOURT, W.Q.; ROSE, J.B. Drinkinq water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia.* **Vet. Parasitol.,** v. 126, n.1-2, p. 219 – 234, 2004.

14. BIALEK. R.; BINDER, N.; DIETZ, K.; JOACHIM, A.; KNOBLOCH, J.; ZELCK, U.E. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assay to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,** v. 43, p. 283 – 288, 2002.

15. BUSHEN, O.Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R.C.; DUPNIK, K.; NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; FAYER, R.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum.* **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,** v. 101, n.4, p. 378 – 384, 2007.

16. BRANTLEY, R.K.; WILLIAMS, K.R.; SILVA, T.M.J.; THIELMAN, N.M.; WARD, H.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. AIDS-associated diarrhea and wasting in northeast Brazil is associated with subtherapeutic palsma levels of antiretroviral medications and with bovine and human subtypes of *Cryptosporidium parvum.* **Braz. J. Infect. Dis.,** v. 7, n.1, p.16-22, 2003.

17. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria N°518/GM de 25 de março de 2004, **Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano.**

18. CACCIÒ, S.M. & POZIO, E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther .,** v. 4, n.3, p. 429 – 443, 2006.

19. CAMA, V.A.; BERN, C.; SULAIMAN, I.M.; GILMAN, R.H.; TICONA, E.; VIVAR, A.; KAWAI, V.; VARGAS, D.; ZHOU, L.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV – positive patientes in lima, Peru. **J. Eukaryot. Microbiol.,** v.50, p. 531 – 533, 2003.

20. CANTUSIO NETO, R.; SANTOS, J.U.; FRANCO, R.M.B. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. **Water Sci Technol.,** v.54, n. 3, p. 89 – 94, 2006.

21. CAPUANO, D.M.; OKINO, M.H.T.; BETTINI, M.J.C.B. Freqüência de *Cryptosporidium* sp. e *Isospora belli* em pacientes soro positivos para HIV na região de Ribeirão Preto, SP – Brasil. **Rev. do Inst. Adolfo Lutz.,** v. 60, n.1, p. 11 – 15, 2001.

22. CARDOSO, L.S.; CARLI, G.A.; LUCA, S.J. Cryptosporidium e Giárdia em efluentes biologicamente tratados e desinfectados. **Rev. Eng. San. Amb.,** v.8, n. 4, p. 285 – 290, 2003.

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

24. CARVALHO ALMEIDA, T.T. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporridae) em amostras fecais, extração do DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase)**. 2004. 131 p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.

25. CARVALHO ALMEIDA, T.T. CASSIMIRO AM, MATTÉ GR, MATTÉ MH. An improved method for extracting *Cryptosporidium* sp. DNA from preserved faeces and potential application for cryptosporidiosis surveillance. **Rev. Vigil. San.,** v.1, n.3, p. 208 – 21, 2005.

26. CARVALHO ALMEIDA, T.T. PINTO, P.L.S. QUADROS CMS, TORRES DMAGV, KANAMURA HY, CASIMIRO AM. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.,** v.48, n.3, p. 27- 32, 2006.

27. CAUSER, L.M.; HANDZEL, T.; WELCH, P.; CARR, M.; CULP, D.; LUCHT, R.; MUDAHAR, K.; ROBINSON, D.; NEAVEAR, E.; FENTON, S.; ROSE, C.; CRAIG, L.; ARROWOOD, M. WAHLQUIST, S.; XIAO, L.; LEE, Y.M.; MIREL, L.; LEVY, D.; BEACH, M.J.; POQUETTE, G.; DWORKIN, M.S. An outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection at an Illinois recreational waterpark. **Epidemiol. Infect**. v.134, n.1, p.147 – 156, 2006.

28. CENTER FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION (CDC). Preliminary food net data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 sites US. **MMWR. Morb. Mortal Wkly. Rep.,** v.54, p. 352 – 356, 2004.

29. CENTER FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION (CDC); TODER, J.S.; BEACH, M.J. Cryptosporidosis surveillance-United States, 2003-2005. **MMWR. Surveill. Summ.,** v.56, n.7, p. 1- 10, 2007.

30. CENTER FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION. DPDx. Identification and diagnosis of parasites of Public Health concern. In: *Cryptosporidium*. 2005. Disponível em: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx. Acesso em 13 fev 2006.

31. CHALMERS, R.M.; FERGUSON, C.; CACCIO, S.; GASSER, R.B.; EL-OSTA, Y.G.A.; HEIJNEN, L.; XIAO, L.; HADFIELD, S.; SINCLAIR, M.; STEVENS, M. Direct comparison of selected methods for genetic characterization of *Cryptosporidium parvum*. **Inter. J. for Parasitol.,** v. 35, p. 397 – 410, 2005.

32. CHUNG, E.; ALDOM, J.E.; CARRENO, R.A.; CHAGLA, A.H.; KOSTRZYNSKA, .; LEE, H.; PALMATEER, G.; TREVORS, J.T.; UNGER, S. XU, R.; DE GRANDIS, S.A. PCR-based quantitation of *Cryptosporidium parvum* in municipal water samples. **J. Microbiol. Methods.,** v. 38, p. 119 – 130, 1999.

33. CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LEWI, D.S. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. **J. Infect. Dis.,** v.3, n. 4, p. 203 – 206, 1999.

34. CIMERMAN, S.; CASTANEDO, C.G.; LULIANO, W.A.; PALACIOS, R. Profile of intestinal parasitosis diagnosed in HIV infected patients in the HAART era at a reference center in São Paulo, **Braz. Parasitol. Latinoam.**, v.57, n.3-4, p.111 – 119, 2002.

35. CLARCK, D.P. New insights into human cryptosporidiosis. **Clinic Microbiol. Rev.,** v. 12, p. 554 – 563, 1999.

36. COUPE, S.; SARFATI, C.; HAMANE, S.; DEROUIN, F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the Species Level by Nested PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism. **J. Clin. Microbiol.,** v. 43, n.3, p.1017 – 1023, 2005.

37. COUPE, S.; DELABRE, K.; POUILLOT, R.; HOUDART, S.; SANTILLANA-HAYAT, M.; DEROUIN, F. Detection of *Cryptosporidium, Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in surface water, incluiding recreational areas: a one-year prospective study. Immunol. Med. Microbiol. v. 47, n.3, p. 351 – 359, 2006.

38. COUTINHO, M.F.O. **Ocorrência e caracterização de *Cryptosporidium* sp. em lagoas de estabilização no Estado de São Paulo.** 2007. 117 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

39. CORSO, P.S.; KRAMER, M.H.; BLAIR, K.A.; ADDISS, D.G.; DAVIS, J.P.; HADDIX, A.C. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerg. Infect. Dis.,** v.9, n.4, p. 426 – 43, 2003.

40. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2006. Disponível em:< http://www.cetesb.sp.gov.br> Acesso em 28 abr. 2008.

41. CURRENT, W.L. & GARCIA, L. Cryptosporidiosis. **Clin. Microbiol. Rev.,** v.4, n.3, p. 325 – 358, 1991.

42. DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **Inter. J. of Food Microbiol.,** v. 103, p. 207 – 227, 2005.

43. DIAS JUNIOR. **Ocorrência de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais e esgoto no município de Araras – SP**. 1999. Dissertação (Mestrado) – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo.

44. DILLINGHAM, R.A.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microb. and infec.,** v.4, p. 1059 – 1066, 2002.

45. EGYED, Z.; SRÉTER, T.; SZÉLL VARGA, I. Characterization of *Cryptosporidium* spp. – recent developments and future needs. **Vet. Parasitol.,** v. 111, p. 103 – 114, 2003.

46. EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY UNITED STATES. Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in water by Filtration/IMS/FA. 2005. Disponível em < http://www.epa.gov/microbes/ > Acesso em 4 fev 2008.

47. FARIAS, E. W.C.; GAMBA, R.C.; PELLIZARI, V.H. Detection of Cryptosporidium spp oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.,** v.33, p. 41- 43, 2002.

48. FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification**. Int. J. for Parasitol.,** v. 30, n.12-13, p. 1305 – 1322, 2000.

49. FAYER , R.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **TRENDS Parasitol.,** v.20, p.531 – 536, 2004.

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

51. FAYER, R.; SANTÍN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Aplicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). **J. Parasitol.,** v. 91, n.3, p. 624 – 629, 2005.

52. FERGUSON, C.; DEERE, D.; SINCLAIR, M.; CHALMERS, R.M.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.; XIAO, L. RYAN, U.; GASSER, R. EL-OSTA, Y.A.; STEVENS, M. Meeting Report: Application of genotyping methods to assess risks from *Cryptosporidium* in watersheds. **Environ. Health Perspect.,** v. 114, n.3, p. 430 – 434, 2006.

53. FERREIRA, M.S. & BORGES, A.S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients – A review. **Mem. Inst. Osw. Cruz.,** v. 97, n. 4, p. 443 – 457, 2002.

54. FIGUEIREDO, H.C.P.; PEREIRA JUNIOR, D.J.; NOGUEIRA, R.B.; COSTA, P.R.S. Excreção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural.,** v. 34, n.5, p. 1625 – 1627, 2004.

55. FRANCO, R.M. & CORDEIRO, N.S. Giardiases and cryptosporidiosis in child care settings in the municipality of Campinas, São Paulo state. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 29, n.6, p. 585 – 591, 1996.

56. FRANCO, R.M.B.; ROCHA, E.R. & CANTUSIO, N.R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Tropical.,** v. 43, n.2, p. 109 – 111, 2001.

57. FRANCO, R.M.B. & CANTUSIO, N.R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Osw. Cruz.,** v.97, n.2, p. 205 – 207, 2002.

58. FRANCO, R.M.B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em Saúde Pública. **Rev. Panam. Infectol.,** v.9, n.4, p.36 – 43, 2007.

59. GAMBA, C.R.; CIAPINA, E.M.P.; BATELLO, E.R.; ESPINDOLA, R.S.; SILVA, A.L.B.; PACHECO, A.; PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo – Brazil. **Braz. J. Microbiol.,** v. 31, p.151 – 153, 2000.

60. GARRIDO, L.E.M. ***Cryptosporidium parvum* – patógeno emergente de veiculação hídrica: desafios metodológicos de detecção ambiental.** 2003. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

61. GATEI, W.; GREENSILL, J.; ASHFORD, R.W.; CUEVAS, L.E.; PARRY, C.M.; CUNLIFFE, N.A.; BEECHING, N.J.; HART, C.A. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **J. Clin. Microbiol.,** v. 41, n.4, p.1458 – 1462, 2003.

62. GIBBONS-MATTHEWS, C. & PRESCOTT, A.M. Intra-isolate variation of *Cryptosporidium parvum* small subunit ribosomal RNA genes from human hosts in England. **Parasitol. Res.,** v. 90, p. 439 – 444, 2003.

63. GOMES, A.H.S.; KANAMURA, H.E.; ALMEIDA, M.E.; ARAUJO, A.J.U.S. Detecção de *Cryptosporidium* em amostras fecais por técnica de Nested-PCR em comparação com métodos imunológicos e parasitológicos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.,** v.63, n. 2, p. 255 – 261, 2004.

64. GÓMEZ-COUSO, H.; AMAR, C.F.; MCLAUCHLIN, J.; ARES-MAZÁS, E. Characterisation of a Cryptosporidium isolate from water buffalo (Bubalus bubalis) by sequencing of a fragment of the Cryptosporidium oocyst wall protein gene (COWP). **Vet. Parasitol.,** v.15, n.1-2, p. 139 – 144, 2005.

65. GONÇALVES, E.M.N. ***Cryptosporidium parvum*: avaliação de métodos diagnósticos e aspectos epidemiológicos.** 2002. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

66. GONÇALVES, E.M.N.; DA SILVA, A. J.; EDUARDO, M.B.; UEMURA, I.H.; MOURA, I.N.; CASTILHO, V.L.; CORBETT, C.E. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics.,** v.61, n.2, p.119-126, 2006.

67. GONÇALVES, E.M.N. **Incidência de enteroparasitas com caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em diferentes comunidades brasileiras.** 2007.183p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

68. GONÇALVES, E.M.N.; ARAÚJO, R.S.; ORBAN, M.; MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H.; CORBETT, C.E. Protocolo for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples**. Inst. Med. Trop. S. Paulo,** v. 50, n. 3, p. 165 – 167, 2008.

69. GUIZELINI, E. **Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp. nas fezes de pacientes com diarréia, mediante emprego de três técnicas de coloração.** 1991. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

70. GUIZELINI, E. & AMATO NETO, V. Isolation of oocyst of *Cryptosporidium* sp. in loose stools of patients with AIDS and of immunocompetent children and adults in São Paulo, Brazil. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo,** v. 47, p.150 – 152, 1992.

71. GREENBERG,P.D.; OCH, J.; CELLO, J.P. Diagnosis of *Cryptosporidium parvum* in patients with severe diarrhea and AIDS. **Digest. Disease and Scien.,** v.41, n. 11, p.2286 – 2290,1996.

72. HACHICH, E.M. **Avaliação da presença dos protozoários *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp em águas captadas para consumo humano no Estado de São Paulo.** 2002. 175p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.

73. HACHICH, E.M.; SATO, M.I.; GALVANI, A.T.; MENEGON, J.R.; MUCCI, J.L. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. **Water Sci. Technol.**, v.50, n.1, p. 230 – 245, 2004.

74. HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids**. J. Mol. Biol.,** v.166, p. 557 – 580, 1983.

75. HASHIMOTO, A.; SUGIMOTO, H.; MORITO, S.; HIRATA, T. Genotyping of single *Cryptosporidium* oocysts in sewage by semi-nested PCR and direct sequencing. **Water Res.,** v. 40, p. 2527 – 2532, 2006.

76. HELLER, L.; VIEIRA, M.B.C.M.; BRITO, L.L.A.; SALVADOR, D.P. Desempenho da filtração lenta em areia submetida a cargas de pico de oocistos de C*ryptosporidium* sp., bactérias e sólidos: uma avaliação em instalação piloto. **Eng. Sanit. Ambient.,** v.11, n.1, p. 27 – 38, 2006.

77. HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA molecular evolution and phylogenetic interference. v. 66, n.4, p. 411 – 453, 1991.

78. HIGGINS, J.A.; FAYER, R.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; LAL, A.A.; KERBY, S.; JENKINS, M.C. Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. v.47, n.3, p. 323 – 337, 2001.

79. HUBER, F.; DA SILVA, S.; BOMFIM, T.C.; TEIXEIRA, K.R.; BELLO, A.R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Vet. Parasitol.,** v. 150, p. 65 – 74, 2007.

80. JELLISON, K.L.; HEMOND, H.F.; SCHAUER, D.B. Sources and Species of *Cryptosporidium* oocysts in the Wachusett Reservoir watershed. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.68, n.2, p. 569 – 575, 2002.

81. JIANG, J.; ALDERISIO, K.A.; SINGH, A.; XIAO, L. Development of procedures for direct Extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 75, n. 3, p. 1135-1141, 2005a.

82. JIANG, J.; ALDERISIO KA, XIAO L. Distribution of *Crptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 71, n.8, p.4446 – 54, 2005b.

83. KARANIS, P.; PAPADOPOULOU, C.; KIMURA, A.; ECONOMOU, E.; KOURENTI, C.;SAKKAS, H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural drinking and recreational water of Northwestern Greece. Acta. Hydrochim. Hydrobiol., v. 30, p. 49- 58, 2002.

84. KARANIS, P.; SOTIRIADOU, I.; KARTASHE, V.; KOURENTI, C.; TSVETKOVA, N.; STOJANOVA, K. Ocorrence of Giardia and Cryptosporidium in water supplies of Russia and Bulgaria. **Environ. Res.,** v. 102, n.3, p. 260 – 271, 2006

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

86. KASSA, H.; HARRINGTON, B.J.; BISESI, M.S. Cryptosporidiosis: a brief literature review and update regarding *Cryptosporidium* in feces of Canada geese (*Branta canadensis*). **J. Environ. Health.,** v.66, p. 34 – 40, 2004.

87. KATSUMATA, T.; HOSEA, D.; RANUH, I.G.; UGA, S.; YANAGI, T.; KOHNO, S. Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. **Am. J. Tropic. Med. Hyg.,** v.62, n.1, p. 70 – 72, 2000.

88. KATO, S.; LINDERGARD, G.; MOHAMMED, H.O. Utility of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle. **Vet. Parasitol.,** v.111, p. 153-159, 2003.

89. KATO, S.; JENKINS, M.; FOGARTY, E.; BOWMAN, D. *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in fiel soil and its relation to soil characteristics: analyses using the geographic information systems. **Sci. Total Environ.,** v. 321,p. 47 – 58, 2004.

90. KOONJUL, P.K.; BRANDT, W.F.; FARRANT, J.M.; LINDSEY, G.G. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. **Nucleic. Acids. Res.,** v.27, n.3, p. 262- 269,1999.

91. LALLO, M. A. **Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* em cães na grande São Paulo.** 1993. 45p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.

92. LALLO, M.A. & BONDAN, E.F. Prevalence of Cryptosporidium sp. In institutionalized dogs in the city of São Paulo, Brazil. **Rev. Saud. Pub.,** v. 40, n.1, p. 120 – 125, 2006.

93. LAXER, M.A.; TIMBLIN, B.K.; PATEL, R.J. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg., v.**45, n. 6, p. 688 - 694, 1991.

94. LEE, Y.; GOMEZ, L.L.; MCAULIFFE, I.T.; TSANG, V.C.W. Evaluation of Cryptosporidium parvum oocyst recovery efficiencies from various filtration cartridges by eletrochemiluminescence assays. Lett. Appl. Microbiol., v. 39, n.2,p. 156 – 162, 2004.

95. LEBBAD, M.; NORRGREN, H.; NAUCLÉR, A.; DIAS, F.; ANDERSSON, S. LINDER, E. Intestinal parasites in HIV-2 associated AIDS cases with chronic diarrhea in Guinea-Bissau. **Acta. Trop.,** v. 80, p. 45 – 49, 2001.

96. LIMA, E.C. & STAMFORD, T.L.M. *Cryptosporidium* spp. No ambiente aquático: Aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Ver. C. S. Col.,** v.8,n.3,p. 791 – 800, 2003.

97. LUNA, S.; REYES, L.; CHINCHILLA, L.; MISAEL, G.C. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en agues superficiales en Costa Rica. **Parasitol. Latino Am.,** v. 57, p.63 – 64, 2002.

98. MATTE, M.H. **Avaliação de métodos moleculares em estudos de organismos do gênero *Aeromonas*.** 2004. 138p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.

99. MORGAN-RYAN, U.M.; FALL, A.; WARD, L.A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Aplicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens.* **Journ. Eukaryotic. Microbiol.,** v.49, n.06, p.433-440, 2002.

100. MUCCUIN, R.M.; CLANCY, J.L. Modifications to United States Environmental Protection Agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Appl. Environ Microbiol.,** v.69, n. 1, p. 267 – 274, 2003.

101. MULLER, A.P.B. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo.** 1999. 113p. Dissertação (Mestrado em

Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

102. NETO, R.C.; SANTOS, L.U.; FRANCO, R.M. Evaluation of sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. **Water Sci. Technol.,** v.54, n.3, p. 89 – 94, 2006.

103. NEWMAN, R.D.; WUHIB, T.; LIMA, M.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C.L. Environmental sources of *Cryptosporidium* in urban slum in Northeastern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v.49, p.270 – 275, 1993.

104. NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; MOORE, S.R.; NATARO, J.P.; AGNEW, D.A.; GUERRANT, R.L.; LIMA, A.A.M. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in Northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.,** v.180, p. 167 – 175, 1999.

105. OLIVEIRA-SILVA, M.B.; OLIVEIRA, L.R.; RESENDE, J.C.; PEGHINI, B.C.; RAMIREZ, L.E.; LAGES-SILVA, E.; CORREIA, D. Seasonal profile and level of CD4+ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/AIDS patients in the Triângulo Mineiro region, **Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v.40, n.5, p.512 – 515, 2007.

106. OKHUYSEN, P.C.; RICH, S.M.; CHAPPELL, C.L.; GRIMES, K.A.; WIDMER, G.; FENG, X.; TZIPORI, S. Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* isolate of cervine origin for healthy adults and interferon-gamma knockout mice. **J. Infect. Dis.,** v.185, p.1320 – 1325, 2002.

107. PENG,M.M.; MESHNICK, S.R.; CUNLIFFE, N.A.; THINDWA, B.D.M. HART, C.A.; BROADHEAD, R.L.; XIAO, L. Molecular epidemiology of

cryptosporidiosis in children in Malawi. **J. Eukaryot. Microbiol.,** v.50, p.557 – 559, 2003.

108. PEREIRA, J.T. **Métodos de desinfecção em água contendo *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: criptosporidiidae) e sua detecção por técnica de biologia molecular.** 2007. 89p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

109. RANDSTRÖM, P.; KNUTSSON, R.; WOLFFS, P.; LÖVENKLEV, M.; LÖFSTRÖM. Pre-PCR Processing. **Molec. Biotech.,** v 26, p.133 – 146, 2004.

110. RAMIREZ, N.E.; WARD, L.A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes Infection.,** v.6, p.773-785, 2004.

111. RIBEIRO, P.C.; PILE, E.; QUEIROZ, M.M.; NORBERG, N.A.;TENÓRIO, J.R. Cryptosporidiosis occurrence in HIV + patients attended in a hospital, Brazil. **Rev. Saude Publ.,** v.38, n3, p.469 – 470, 2004.

112. RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A.A.; PAVLASEK. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.69, n.7, p.4302-4307, 2003.

113. RYAN, U.M.; READ, C.; HAWKINS, P.; WARNECKE, M.; SWANSON, P.; GRIFFITH, M.; DEERE, D.; CUNNINGHAM, M.; COX, P. Genotype of *Cryptosporidium* from Sydney water catchments areas. **J. Appl. Microbiol.,** v.98, p.1221-1229, 2005.

114. RYAN, U.M.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the red kangaroo (*Macropus rufus*). **Journ. Eukaryotic. Microbiol.,** v. 55, n.1, p. 22 – 26, 2008.

115. RODRIGUES, J.L.; LESER, P.; SILVA, T.D.O.M.; DOS SANTOS, M.I.; DALBONI, M.A.; ACCETURI, C.A.; CASTELO, A. Prevalence of cryptosporidiosis in diarrheic syndrome in HIV positive patients. **AMB. Rev. Assoc. Med. Bras.,** v. 37, n.2, p.79 – 84, 1991.

116. RUECKER NJ, BRAITHWAITE SL, TOPP E, EDGE T, LAPEN DR, WILKES G, ROBERTSON W, MEDEIROS D, SENSEN CW, NEUMANN NF. Tracking host sources of *Cryptosporidium* spp. in raw water for improved health risk assessment. **Appl. and Enviro. Microbiol.,** v. 73, n.12, p.3945 – 3957, 2007.

117. SANTOS, L.U.; BONATTI, T.R.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R.M. Occurrence of Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in activated sludge sample in Campinas, SP, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo., v.46, n.6, p. 309 – 313, 2004.

118. SÃO PAULO. Decreto nº 10.755, de 22 de Novembro de 1977. Dispõe sobre o enquadramento dos corpos de água receptores na classificação prevista no Decreto nº 8.468, de 8 de setembro de 1976 e dá providênciascorrelatadas,1977.Disponívelem:<http://cetesbnet/LEMA/01 %20Estadual/decretos/10755-77.htm > . Acesso em 27 jul. 2008.

119. SATO, M.I.Z.; GALVANI, A.T.; PADULA, J.A.; RAZZOLINI, M.T.P.; HACHICH, E.M. Assessing the risk from Giárdia and Cryptosporidium in public drinking water delivered by surface water systems. **J Water Health.,** (*in press*).

120. SAUDA, F.C.; ZAMARIOLI, L.A.; EBER FILHO, W.; MELLO, L.D.E. B. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos Reference Center for AIDS, São Paulo, Brazil. **J. Parasitol.,** v.79, n.3, p.454 – 456, 1993.

121. SHAMES, B.; FOX, J.G.; DEWHIRST, F.; YAN, L.; SHEN, Z.; TAYLOR, N.S. Identification of widespread Helicobacter hepaticus infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. **J. Clin. Microbiol.,** v.33, p.2968 – 2972,1995.

122. SIMMONS III, O.D.; SOBSEY, M.D.; HEANEY, C.D.; CHAEFER III, F.W.; FRANCY, D.S. Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by Method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration. **Appl. Env. Microbiol.,** v.67, n.3, p.1123-1127, 2001.

123. SLAPETA, J. *Cryptosporidium* species found in cattle: a proposal for a new species. **Trends. in Parasitol.,** v.22, n.10, p.469 – 474, 2006.

124. SLAVIM, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp.nov.). **J. Comp. Pathol.,** v. 65, n.3, p. 263-266, 1955.

125. SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Waterborne Cryptosporidiosis: Current Status. **Parasitol Today.,** v.14, n. 1,p. 14 – 22, 1998.

126. SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; TAIT, A.; MACLAUCHLIN, J.; THOMPSON RCA. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends. in Parasitol.,** v.22, n.4, p.160 – 167, 2006.

127. SODRE, F.C. & FRANCO, R.M.B. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **R. Bac.,** v. 33, n.2, p.97 – 107, 2001.

128. SUZUKI, E. **Etilogia das diarréias dos adultos atendidos nos pronto-socorros do município de Itapevi.- São Paulo.** 2007. 84p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.

129. TOMPS, S.R. **Estudo epidemiológico da cryptosporidiose e a sua associação com as condições de saneamento ambiental no distrito municipal de Perus, São Paulo.** 1998. Dissertação (Mestrado) – Universidade Mackenzie, São Paulo.

130. TYZZER, E.E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. Nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Med. Res.,** v.18, p.487- 509, 1910.

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

132. UNGAR BLP. *Cryptosporidium.* Principles and practices of infections diseases. 2000. 5ª ed.: 2903 – 2915.

133. VESEY, G.; SLADE, J.S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; FRICKER, C.R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **J. Appl. Bacteriol.,** v.75, n.1, p. 82 – 86, 1993.

134. WARD, L.A. & WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. **Diag. Microbiol. Inf. Dis.,** v.41, p.37-42, 2001.

135. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking water quality. *Cryptosporidium* as reference pathogen,** 2006. Disponívelem<http//:www.who.int/entity/water_sanitation_health/gdwqrevision/cryptodraft2.pdf.2006> Acesso em: 6 mai 2006.

136. WU, Z.; NAGANO, I.; MATSUO, A.; UGA, S.; KIMATA, I.; ISEKI, M.; TAKAHASHI, Y. Specific PCR primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. **Mol. Cell. Probes.,** v. 14, n.1, p. 33 – 39, 2000.

137. WU, Z.; NIGANO, I.; BOONMARS, T.; NAKADA, T.; TAKAHASHI. Intraspecies polymorphism of Cryptosporidium parvum revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP-single-strand conformational polymorphism analyses. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.69, n.8, p. 4720 – 4726, 2003.

138. XIAO, L.; MORGAN, U.M. FAYER, R.; THOMPSON, R.C.A.; LAL, A. A. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. **Parasitol. Today.,** v.16, n.7, p. 287-292, 2000.

139. XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A.A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.66, n.1, p. 5492-5498, 2000.

140. XIAO, L.; SINGH, A., LIMOR, J.; GRACZYK, T.K.; GRADUS, S.; LAL, A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw water and wastewater. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.67, n.3, p.1097-1101, 2001.

141. XIAO, L.; RYAN, U.M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Curr. Opin. Infect. Dis.,** v.15, n.5, p. 483 – 490, 2004.

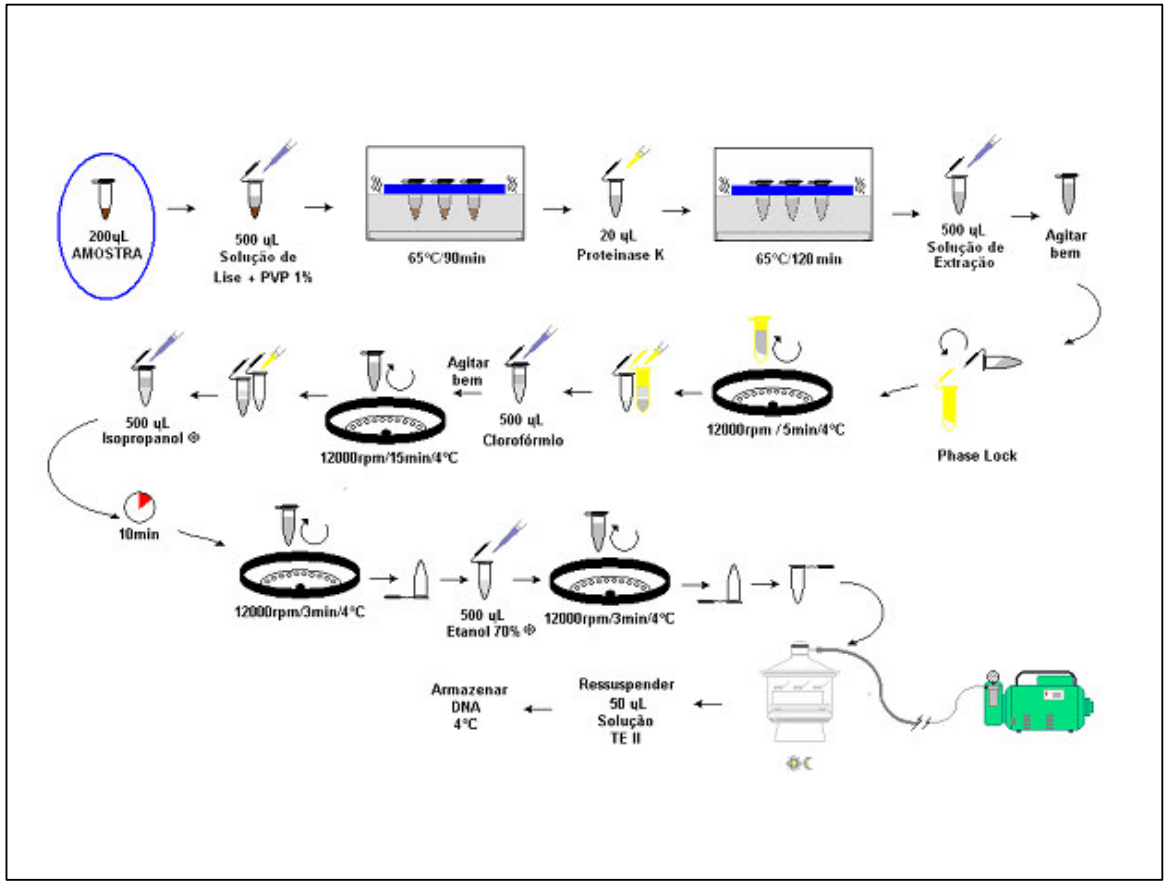
142. XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy, recent advances and implications for public health. **Clin. Microbiol. Rev.,** v.17, n.1, p.72-77, 2004.

143. XIAO, L.; KERRI, A.A.; JIANG, J. detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: Effect of the number of samples and analytic replicates on test results. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.72, p. 5942 – 5947, 2006.

144. ZHOU, L.; SINGH, A.; JIANG, J.; XIAO, L. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. **J. Clin. Microbiol.,** v.41, p. 5254 – 5257, 2003.

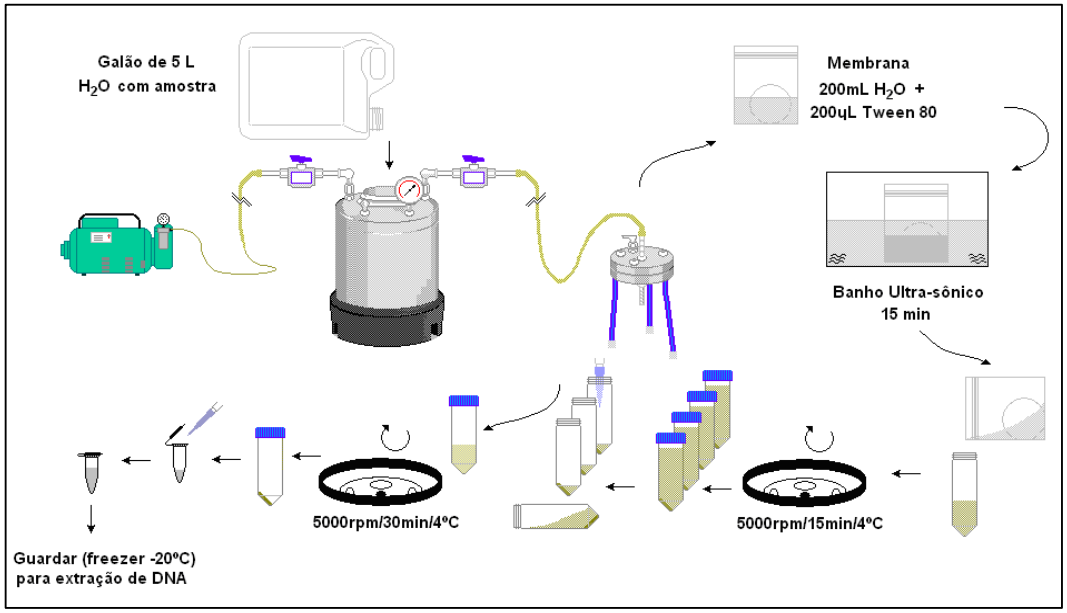
8. ANEXOS

Extração do DNA genômico pelo método de Fenol/Clorofórmio/Álcool-isoamílico



Fonte: Laboratório de Saúde Pública da USP

Procedimento de filtragem e concentração das amostras de água



Fonte: Laboratório de Saúde Pública da USP.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo