

José Ribeiro Lopes

**Detecção, Identificação e Quantificação de Oocistos de
Cryptosporidium parvum na Água:
Métodos Convencionais
e
Imunofluorescência pós-Separação Imunomagnética**

*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para obtenção do grau de Mestre em Hidrobiologia*

Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Janeiro / 2002

José Ribeiro Lopes

**Detecção, Identificação e Quantificação de Oocistos de
Cryptosporidium parvum na Água:
Métodos Convencionais
e
Imunofluorescência pós-Separação Imunomagnética**

*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para obtenção do grau de Mestre em Hidrobiologia*

Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Janeiro / 2002

Resumo

Este trabalho reporta sobre os ensaios desenvolvidos para aplicação e validação do procedimento analítico para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água e designado pela USA-Environment Protection Agency como “Método 1622”. Este método compreende uma filtração adequada das amostras de água, a separação imunomagnética dos oocistos a partir do filtrado capturado e subsequente ensaio de imunofluorescência para determinação da concentração de oocistos e confirmação por coloração com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e por microscopia de contraste de fase.

A necessidade de definir instrumentos analíticos, eficientes e universais, para a identificação da forma infectante *Cryptosporidium* em amostras de água, tem sido uma constante ao longo dos últimos anos. Tal facto releva: 1) do reconhecimento de *C. parvum* como agente etiológico de patologia humana desde 1976, em indivíduos imunocomprometidos mas também em indivíduos imunocompetentes, tendo, em 1982, começado a aumentar o número de casos relatados, como resultado da epidemia da síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA) e 2) da constatação da existência de surtos epidémicos de criptosporidiose, incluindo o de Milwaukee em 1993, em que a água do sistema de abastecimento público foi responsável pela transmissão do parasita.

Cryptosporidium é um protozoário parasita que se transmite pela ingestão de oocistos que tenham sido excretados pelas fezes de humanos ou animais infectados. A infecção pode ser transmitida pelo contacto pessoa-a-pessoa ou animal-pessoa, pela ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes ou pelo contacto com superfícies ambientais contaminadas com fezes

Os resultados obtidos sugerem uma elevada eficiência e sensibilidade do método acima referido, por comparação com os processos convencionais de filtração e identificação de protozoários em amostras de água, para avaliar o risco para a saúde pública colocado por contaminantes da água de consumo como *Cryptosporidium*.

Résumé

Ce travail se rapporte aux essais développés pour l'application et validation du procédé analytique pour la recherche des oocysts de *Cryptosporidium* en échantillons d'eau et désigné par l'USA-Environment Protection Agency comme le "Méthode 1622". Cette méthode comprend une filtration adéquate des échantillons d'eau, la séparation immunomagnétique des oocysts à partir du filtré capturé et subséquent essai d'immunofluorescence pour la détermination de la concentration des oocysts et confirmation par la coloration avec 4', 6-diamidine-2-phenylindole (DAPI) et la microscopie de contraste de phase.

La nécessité de définir des instruments analytiques, efficaces et universels, pour l'identification de la forme infectante du *Cryptosporidium* chez les échantillons d'eau, a été une constante pendant les années. Ce fait relève: 1) de la reconnaissance du *C. parvum* comme un agent étiologique de pathologie humaine dès 1976, en personnes immunocompromis mais aussi chez des personnes immunocompétentes, et, dès 1982, le numéro des cas rapportés s'est élevé, comme résultat de l'épidémie du syndrome de l'immunodéficience humaine acquise (SIDA), et 2) de la constatation de l'existence des essors épidémiques de cryptosporidiose, en incluant l'essor de Milwaukee 1993, dans lequel l'eau du système d'approvisionnement public a été responsable de la transmission du parasite.

Cryptosporidium est un protozoaire parasite que se transmet par l'ingestion des oocysts qu'ayons été excrétés par des fèces des humaines ou animaux infectés. L'infection peut se transmettre par le contact personne à personne ou animal à personne, par l'ingestion de l'eau ou des aliments contaminés avec des fèces ou par le contact avec des superficies ambiantes contaminées avec des fèces.

Les résultats obtenus suggèrent une efficacité et sensibilité élevées de la méthode référée au-dessus par la comparaison avec les procédés conventionnels de filtration et identification de protozoaires en échantillons d'eau, pour évaluer le risque pour la santé publique posé par les contaminantes de l'eau de consommation comme *Cryptosporidium*.

Abstract

This work reports our experience to implement and to validate the (USA-Environment Protection Agency) EPA – Method 1622. This method 1622 is a performance-based method applicable to the determination of *Cryptosporidium* in aqueous matrices. It requires filtration, immunomagnetic separation of the oocysts from the material captured, and an immunofluorescence assay for the determination of oocysts concentration, confirmed by 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining and differential interference contrast (DIC) microscopy.

Cryptosporidium parvum has been recognized as a human pathogen since 1976. During 1976-1982, the disease was reported rarely and occurred predominantly in immunocompromised persons. In 1982, the number of reported cases began to increase as a result of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) epidemic. Initially, the increase in incidence was limited to immunocompromised persons; however, outbreaks and sporadic infections in immunocompetent persons were identified with the aid of a newly developed laboratory diagnostic techniques.

Cryptosporidium is a protozoan parasite transmitted by ingestion of oocysts that have been excreted in the stools of infected humans or animals. The infection can be transmitted through person-to-person or animal-to-person contact, ingestion of stools-contaminated water or food, or contact with stools-contaminated environmental surfaces. Several municipal waterborne outbreaks of cryptosporidiosis, including 1993 outbreak in Milwaukee, have focused attention and concern on the potential for waterborne transmission.

Our results suggest that EPA-Method 1622 is an excellent tool to evaluate the risk for public health posed by drinking water contaminants such as *Cryptosporidium*.

“A qualidade da água de consumo é um elemento vital de saúde pública e bem-estar”.

Peter Jiggins, 12 de Setembro de 2001

Agradecimentos

Na conclusão deste trabalho é meu desejo manifestar agradecimentos às pessoas que mais directamente colaboraram na sua realização.

Ao Professor Doutor José Manuel Correia da Costa, chefe do Laboratório de Parasitologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), delegação do Porto, que gentil e carinhosamente orientou este trabalho, acompanhou com sábio interesse e dedicação, concedeu as disponibilidades possíveis das instalações, equipamento e reagentes do laboratório que chefia e sugeriu, autorizou e incitou a técnica de análises clínicas e saúde pública Maria de Lurdes Delgado a colaborar, quero aqui expressar o meu reconhecido agradecimento.

À minha prezada colega Maria de Lurdes Delgado, que com a sua inultrapassável dedicação, saber e altruísta colaboração na execução das técnicas analíticas, contacto com os fornecedores de materiais e reagentes e pesquisa bibliográfica, muito contribuiu para a realização deste trabalho, aqui deixo um profundo e reconhecido agradecimento.

À minha prezada colega Dra. Águeda que desde o início gentilmente me disponibilizou toda a bibliografia que possuía e colaborou na procura de outra relacionada com o tema deste trabalho, o meu reconhecido agradecimento

Aos restantes colegas e a todo o pessoal do Laboratório de Parasitologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), delegação do Porto, quero também agradecer o carinho que sempre me dispensaram, fazendo-me sentir em casa, e colaboraram no que lhes foi possível, obrigado.

Ao Professor Doutor Victor Vasconcelos e à Professora Doutora Natividade, coordenadores do mestrado de Hidrobiologia, que com a sua sapiência e companheirismo muito contribuíram para contornar dificuldades surgidas no decorrer do curso, o meu sincero agradecimento.

1. – INTRODUÇÃO	10
1.1 – Generalidades/Resumo	10
1.2 – O parasita	13
1.2.1 – História	13
1.2.2 – Taxonomia	16
1.2.3 – O oocisto.....	18
1.2.3.1 – Características do oocisto determinantes na transmissão e disseminação.....	19
1.2.4 – Ciclo de vida.....	27
1.2.4.1 – Ciclo assexual.....	27
1.2.4.2 – Ciclo sexual.....	28
1.2.4.3 – Dualidade oocística.....	29
1.2.5 – Organelos e mecanismos invasivos do esporozoito	31
1.3 - Patogenia e patologia	33
1.4 – Epidemiologia	37
1.4.1 – Prevalência da criptosporidiose	37
1.4.2 – Transmissão	38
1.5 – Tratamento e Profilaxia	39
1.5.1 – Tratamento	39
1.5.2 – Profilaxia.....	40
1.6 – Metodologia para detecção e identificação de oocistos em amostras hídricas	44
1.6.1 – Colheita da amostra hídrica.....	44
1.6.2 – Concentração dos oocistos.....	45
1.6.3 – Purificação dos oocistos	46
1.6.4 – Coloração dos oocistos	48
1.6.5 – Exame da amostra.....	49
1.7 – Objectivos deste trabalho	51
2 - MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1 – Oocistos usados no estudo	52
2.2 - Cálculo da concentração dos oocistos da suspensão stock	52
2.3 – Lavagem e concentração de oocistos por centrifugação e por filtração, para coloração por técnicas usualmente empregues em amostras fecais	54
2.3.1 – Lavagem dos oocistos:	54
2.3.2 – Filtração em rampa por pressão negativa	55

2.4 – Esfregaços para coloração por técnicas usualmente aplicadas em amostras fecais	56
2.5 – Técnicas de coloração usualmente empregadas em amostras fecais ..57	
2.5.1 – <i>Safranina-azul de metileno</i>	57
2.5.2 – <i>Coloração de Heine</i>	57
2.5.3 – <i>Coloração acid-fast (modificada por Kinyoun)</i>	58
2.6 – Separação Imunomagnética e coloração por imunofluorescência.....59	
2.6.1 – <i>Avaliação da concentração da suspensão de trabalho por imunofluorescência</i>	59
2.6.1.1 – <i>Suspensões para enriquecimento de amostras de água</i>	59
2.6.1.2 – <i>Esfregaços</i>	60
2.6.1.3 – <i>Coloração dos esfregaços através de anticorpos monoclonais marcados com fluoresceína</i>	60
2.6.1.4 – <i>Exame microscópico de fluorescência</i>	61
2.6.1.5 – <i>Medição dos oocistos</i>	62
2.7 – Enriquecimento de amostras de água com oocistos	63
2.8 – Tratamento das amostras de água usando um filtro-cápsula	64
2.8.1 – <i>Filtração de amostras de água através de filtro-cápsula</i>	64
2.8.2 – <i>Eluição dos oocistos do filtro</i>	66
2.8.3 – <i>Separação imunomagnética</i>	68
2.8.3.1 – <i>Formação de complexos oocisto-esferas paramagnéticas</i>	69
2.8.3.2 – <i>Dissociação dos complexos oocisto-esferas paramagnéticas</i>	71
2.8.3.3 – <i>Execução dos esfregaços após separação imunomagnética</i>	72
2.8.5 – <i>Coloração dos esfregaços pós-separação imunomagnética e exame microscópico</i>	72
3 – RESULTADOS	73
3.1 – Avaliação da concentração da suspensão stock em câmara de Neubauer.....	73
3.2 – Resultados dos métodos convencionais usualmente empregues em amostras fecais	74
3.2.1 – <i>Esfregaços da suspensão stock</i>	74
3.2.2 – <i>Esfregaços das suspensões contendo 20×10^4 oocistos/mL</i>	77
3.2.3 – <i>Esfregaços das suspensões de 20×10^2 oocistos/mL</i>	81
3.2.4 – <i>Resultados da observação microscópica dos esfregaços resultantes da filtração em rampa por pressão negativa usando filtros de $0,45 \mu\text{m}$</i>	83
3.3 – Resultados da revelação dos oocistos por imunofluorescência.....	85
3.3.1 – <i>Resultados dos esfregaços corados por imunofluorescência para avaliação da concentração da suspensão de trabalho</i>	85
3.3.2 – <i>Resultados dos esfregaços obtidos de amostras de água filtradas por filtros cápsula e corados por imunofluorescência</i>	88
4 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	89
4.1 – Colorações usualmente empregues em amostras fecais.....	89
4.1.1 – <i>Colorações de oocistos lavados e diluídos com água destilada e com PBS-T</i>	89

4.1.2 – Colorações por técnicas usualmente empregues em amostras fecais de sedimentos de amostras de água contendo oocistos, filtradas com filtros de 0,45 μm	90
4.2 – Revelação dos oocistos por imunofluorescência	92
4.2.1 – Avaliação da suspensão de trabalho para enriquecimento de amostras	92
4.2.2 – Amostras filtradas por filtros-cápsula, purificadas por separação imunomagnética e coradas por imunofluorescência	92
4.3 – Validação dos resultados	94
4.3.1 - Técnicas usualmente utilizadas em amostras fecais	94
4.3.2 – Separação imunomagnética e coloração por imunofluorescência	95
4.3.2.1 – Significância estatística do número de amostras analisadas	96
5 – CONCLUSÃO	97
BIBLIOGRAFIA	100

1. – Introdução

1.1 – Generalidades/Resumo

Cryptosporidium parvum é um protozoário parasita que, geralmente, infecta as células epiteliais do trato gastrointestinal, podendo também causar infecções extra-intestinais no pâncreas, vesícula biliar, ductos biliares e pulmões. É uma das espécies pertencentes ao género *Cryptosporidium*, o qual afecta todos os grupos de vertebrados (Graczyk, Fayer e Cranfield, 1997).

As espécies deste género têm sido designadas com base no hospedeiro de que são isoladas: *Cryptosporidium nasorum*, peixes; *C. serpentis*, répteis; *C. baileyi* e *C. meleagridis*, aves; *C. felis*, *C. wairi*, *C. muris* e *C. parvum*, mamíferos (Graczyk, Fayer e Cranfield, 1997; Morgan *et al.*, 1999).

Das oito espécies referidas, apenas a espécie *C. parvum* representa um problema de saúde pública global, dado o seu potencial zoonótico (Graczyk, Fayer e Cranfield, 1997). Tem capacidade infectante para uma grande variedade de espécies de mamíferos, incluindo os humanos. No âmbito da saúde pública, merecem especial destaque, além dos humanos, os animais domésticos destinados à produção de leite, de abate e de companhia, considerando o seu potencial papel como agentes de transmissão cruzada animal-homem e homem-animal (Harp, Whitmire e Sacco, 1994; Clark e Sears, 1996).

A doença causada por *Cryptosporidium*, a criptosporidiose, pode variar desde uma infecção assintomática a uma diarreia aguda auto-limitada, geralmente de uns dias a três semanas, em adultos imunocompetentes (Heyworth, 1992). Porém, em hospedeiros imunocomprometidos caracteriza-se por uma diarreia aquosa severa tipo colérica, crónica, debilitante e potencialmente perigosa para a vida (Forney, Yang e Healey, 1996; Harp *et al.*, 1996; Priest *et al.*, 1999).

Salientam-se neste último grupo de pessoas as crianças mais jovens, as pessoas mais idosas, os doentes em tratamento imunossupressor e os doentes com SIDA (Harp e Sacco,

1996; Meloni e Thompson, 1996; Morgan *et al.*, 1999) entre os quais a espécie *C. parvum* causa uma significativa morbidade e mortalidade (Widmer *et al.*, 1998).

A transmissão dos parasitas do género *Cryptosporidium* acontece por meio do **oocisto**, a sua forma robusta infectante, capaz de sobreviver à maior parte dos ambientes por longos períodos de tempo, habitar todos os climas e locais e infectar vários hospedeiros diferentes. A infecção é, geralmente, fecal-oral, através do contacto pessoa-pessoa, animal-pessoa, águas e alimentos contaminados fecalmente (Hannahs, s.d.).

Alguns estudos indicam, em países industrializados, uma prevalência de cerca de 0.4% da população a excretar oocistos nas fezes em cada momento, e nos doentes com diarreia admitidos nos hospitais uma prevalência de excretadores de oocistos de 2 a 2.5%. A seroprevalência é, contudo, mais alta, variando aproximadamente entre os 30 e 35% na população dos Estados Unidos e entre os 60 e 70% na população dos países em vias de desenvolvimento (Fayer, 2000).

Os oocistos são lançados abundantemente no ambiente, contidos nas fezes das múltiplas dejeções dos hospedeiros infectados. Na fase aguda da infecção, um hospedeiro, humano ou não, pode excretar para cima de 10^7 oocistos por grama de fezes (Smith, 1998).

Sob determinadas condições atmosféricas, tais como, chuvas torrenciais, derretimentos de neve e enchentes, os oocistos são veiculados em quantidades anormais das áreas constituintes das bacias hidrográficas para os reservatórios das águas superficiais elevando a sua turvação e contaminação (Hansen e Ongerth, 1991; Ong *et al.*, 1996). O aumento do caudal dos cursos de água superficiais naturais, dos esgotos, das escorrências urbanas e dos terrenos agrícolas resultam na elevação da contaminação da água pelos oocistos (Dworkin *et al.*, 1996; Graczyk, Fayer e Cranfield, 1997).

Há estudos que referem amostras de águas superficiais com concentrações na ordem dos 5800 oocistos por litro (Graczyk, Fayer e Cranfield, 1997), enquanto o limiar dose-resposta potencial de infecciosidade, em teoria, é de apenas 1 oocisto viável (Gibson, Haas e Rose, 1998).

Além da ocorrência de surtos epidémicos mais ou menos extensos com origem na água de beber, são também de considerar os relatos de criptosporidiose por ingestão de oocistos com alimentos crus e com água ingerida acidentalmente em actividades desportivas e de recreio (WGWC—Working Group on Waterborne Cryptosporidiosis, 1997).

1.2 – O parasita

1.2.1 – História

A descoberta de *Cryptosporidium* é atribuída a E. E. Tyzzer que, em 1907, descreveu um organismo celular associado à mucosa gástrica em ratos de laboratório, *C. muris* (Tomás, Antunes e Araújo, 1986; Azevedo, 1989; Morgan *et al.*, 1999). Em 1912, o mesmo pesquisador identificou, também em ratos, localizada na mucosa do intestino delgado, uma segunda espécie, *C. parvum*, que infecta preferencialmente o intestino delgado dos humanos e de uma grande variedade de outros mamíferos e que é a espécie zoonótica principal responsável pela criptosporidiose humana (Villacorta *et al.*, 1988; Fayer, 2000; Morgan *et al.*, 1999).

O mesmo investigador, E. E. Tyzzer, em 1929, encontrou uma espécie semelhante a *C. parvum* no cego de galinhas. Slavin, em 1955, descreveu uma espécie idêntica, em perus bebês, associada a um quadro diarreico que designou de *C. meleagridis* (Huhggins, 1988; Morgan *et al.*, 1999).

Até à década de 80 foram citadas mais 17 espécies, a maioria das quais foram denominadas com base na presumível especificidade dos hospedeiros, distribuídos por 7 ordens de mamíferos, 4 de aves, 2 de peixes e 1 de répteis (Villacorta *et al.*, 1988).

A classificação das espécies do género *Cryptosporidium* pelas características biológicas, tais como a especificidade do hospedeiro, é actualmente reduzida para oito, de acordo com Morgan *et al.* (1999), ou dez, de acordo com Fayer, Morgan e Upton. (2000).

Apesar de ter sido identificado em 1912, por Tyzzer, o reconhecimento da espécie *C. parvum*, como infectante e causa de diarreia em humanos, só aconteceu em 1976. Este reconhecimento deveu-se a uma biópsia rectal de uma menina de três anos que residia numa herdade de criação de bovinos do Tennessee rural, USA, que sofria de uma gastroenterite havia duas semanas, cujo quadro clínico se caracterizava por cólicas abdominais, vômitos e diarreia aquosa, da qual foi isolado *C. parvum* (Huggins, 1988; Acha e Szyfres, 1989;

Webster, 1993; Graczyk, Fayer e Cranfield, 1997; Fayer, Morgan e Upton, 2000). A criança recuperou totalmente após tratamento sintomático (Huggins, 1988; Webster, 1993).

Quase em simultâneo, a criptosporidiose foi diagnosticada num doente que sofria de uma doença diarreica severa, a quem, subsequentemente, foi demonstrado ter SIDA (síndrome de imunodeficiência humana adquirida). Também neste caso foi encontrado *C. parvum* como agente infectante (Webster, 1993).

Na sequência daqueles casos, a criptosporidiose passou a ser tida como uma zoonose que afectava sobretudo os animais mais jovens, cujo sistema imunitário é ainda imaturo, dizimando rebanhos, por grave diarreia (Huggins, 1988), e a infecção humana aconteceria pela transmissão mamífero (ou outro animal)–homem, para o qual seria uma infecção oportunista individual (Kageruka *et al.*, 1984), cuja gravidade patológica se acentuava nos indivíduos imunodeprimidos.

Na década de 80, esta patologia passou a ser considerada um problema de saúde pública. Foi reconhecido que os indivíduos com função imunológica madura intacta podem também ser infectados (Tomás, Antunes e Araújo, 1986); que o parasita *Cryptosporidium* também afecta pessoas imunocompetentes, entre as quais é uma causa comum de gastroenterite auto-limitada (Smith e Rose., 1990); que deve ser considerado um dos patogénicos que causa diarreia na população em geral, especialmente entre as crianças (Acha e Szyfres, 1989).

Até 1982, mais 11 casos de criptosporidiose humana foram relatados. Actualmente há relatos de criptosporidiose de mais de noventa países, espalhados por todos os continentes (Fayer, Morgan e Upton, 2000).

A partir dos anos oitenta, a criptosporidiose foi reconhecida como uma causa comum de doença diarreica auto-limitada entre as pessoas imunocompetentes, e entre os indivíduos imunocomprometidos como, por exemplo, os doentes com SIDA, como causa de uma doença diarreica severa prolongada, e uma condição perigosa para a vida (Tomás, Antunes e Araújo, 1986; Plorde, 1987).

Em 1983, foi comunicado o primeiro caso de infecção humana por *Cryptosporidium* ao Serviço de Vigilância de Doenças Transmissíveis (Communicable Diseases Surveillance Service) no Reino Unido. Em 1991, talvez como resultado do desenvolvimento das técnicas de diagnóstico e do desenvolvimento no conhecimento dos profissionais de saúde para a detecção e identificação deste agente etiológico, o número de casos comunicados naquele país ascendeu a 5115, (Webster, 1993).

C. parvum é, actualmente, reconhecido entre as espécies de *Cryptosporidium*, como sendo a espécie maioritariamente responsável pela criptosporidiose nos humanos e nos animais, podendo a doença manter-se a um nível endémico ou emergir em surtos epidémicos (Smith e Rose, 1990).

Há referências várias de surtos epidémicos de criptosporidiose por ingestão de oocistos de *Cryptosporidium* de origem aquática, por ingestão da água de beber considerada potável após o tratamento nas estações destinadas a esta função (Fayer, 1994). Este tipo de surtos epidémicos, que pode afectar tanto as grandes como as pequenas comunidades, teve, ao que se pensa, a sua maior expressão em 1993, em Milwaukee, uma cidade americana do estado de Wisconsin, em que a população afectada foi estimada em mais de 403.000 pessoas (WGWC, 1997), entre as quais terá causado pelo menos 70 mortes (Mayer e Palmer, 1996).

Alguns dos principais surtos epidémicos, com número de casos igual ou superior a 500, relacionados com a água de consumo humano estão resumidos no quadro 1.1 da página 16.

Quadro 1.1. Resumo de alguns dos surtos epidémicos de criptosporidiose documentados, com número de casos igual ou superior a 500, relacionados com a água de consumo humano:

Ano	Localidade	N.º de casos estimados
1984	Braun Station, TX	2006
1987	Carrolton, GA	12960
1987	Carrol County, Georgia	13000
1989	Swindon/Oxfordshire, Reino Unido	> 515
1992	Jackson County, OR	15000
1993	Milwaukee, WI	403000
1993	Waterloo, Canadá	> 1000
1995	Torbay, Devon, Reino Unido	575
1995	South-west, Reino Unido	575
1996	Kelowna, BC	~ 14500
1996	Cranbrook, BC	~ 2097
1996	Northern England, Reino Unido	> 9000
1997	Inglaterra e País de Gales, R. Unido	> 4321

Fontes: WGWC, 1997; Gibson, Haas e Rose, 1998; Fayer, Morgan e Upton, 2000.

1.2.2 – Taxonomia

O parasita *Cryptosporidium parvum* é um eucariota unicelular, portanto, pertencente ao reino Protista, com organização interna semelhante à dos animais, logo, do sub-reino Protozoa (Lumsden e McMillan, 1993).

É uma das espécies de *Cryptosporidium*, género único da família Criptosporidiidae. (Tomás, Antunes e Araújo, 1986). Modernamente, é classificado no filo Apicomplexa, tal como as espécies de *Plasmodium* e de *Toxoplasma*, devido a, num dos estádios do seu ciclo de vida, possuir numa das extremidades um complexo apical destinado à invasão do hospedeiro (Peterson, 1993; Morgan *et al.*, 1999).

É um protozoário parasita intracelular obrigatório (Fayer et al., 2000). É monoxénico, isto é, o seu ciclo de vida completa-se num único hospedeiro (Tomás, Antunes e Araújo, 1986). O ciclo de vida é complexo e constituído de duas partes: sexual e assexual (Peterson, 1993).

Embora a criptosporidiose em humanos possa ser causada por outras espécies de *Cryptosporidium*, a espécie *C. parvum* é a principal agente causal desta doença em humanos (Fayer, Morgan e Upton, 2000). *C. parvum* pode causar doença em variadas espécies de mamíferos (Morgan et al., 1999; Fayer, Morgan e Upton, 2000), mas o oocisto desta espécie passa intacto o trato gastrointestinal das aves sem lhes causar doença (Graczyk et al., 1996), indicando que *C. parvum* é hospedeiro-específico dos mamíferos.

O tamanho e a forma dos oocistos bem como o número de esporozoítos são também elementos contribuintes para a classificação do parasita. Os oocistos de outros esporozoários patogénicos como *Isospora* e *Sarcocystis*, por exemplo, além de terem aproximadamente o dobro do tamanho dos de *C. parvum*, contêm cada um oito esporozoítos em vez de quatro e as suas formas são elipsoides e ovais em vez de esféricas (Lumsden e McMillan, 1993).

Embora haja discussão sobre qual a mais correcta classificação taxonómica (Morgan et al., 1999; Upton, 2000), baseando-nos nas considerações da literatura acima referidas, poder-se-á resumir a seguinte classificação taxonómica para a espécie *C. parvum*:

Reino	PROTISTA
Sub-reino	PROTOZOA
Filo	APICOMPLEXA
Classe	SPOROZOA
Subclasse	COCCIDIA
Ordem	EUCOCCIDA
Subordem	EIMERIINA
Família	CRYPTOSPORIDIIDAE
Género	<i>CRYPTOSPORIDIUM</i>
Espécie	<i>C. parvum</i>

1.2.3 – O oocisto

O oocisto é a forma parasitária ambientalmente resistente de transmissão e propagação de *Cryptosporidium parvum*. É esférico ou ligeiramente ovalado. O diâmetro é de apenas alguns micrómetros.

Embora se observe alguma falta de unanimidade na literatura quanto ao diâmetro do oocisto [3 a 5 µm, segundo Kageruka *et al.* (1984) e Tomás, Antunes e Araújo (1986); 3,5 a 5,5 µm, Graczyk *et al.* (1996); 3,5 a 5 µm, Graczyk, Fayer e Cranfield (1997); 3 a 7 µm, LeChevalier, Norton e Lee, 1991b; 4,5 a 5,5 µm, Smith, 1998; 4 a 6 µm, Garcia (1990), Smith e Rose (1990), Henry (1991), Webster (1993), DWI-Drinking Water Inspectorate (1998), EPA-Environmental Protection Agency (1999), Fayer, Morgan e Upton (2000), Fricker (2000), Oda *et al.* (2000)], a maioria da literatura actual refere uma variação entre 4 e 6 µm.

Possui estrutura interna obscura, ao microscópio óptico. Após coloração, por várias técnicas de álcool-ácido (acid-fast) modificadas, podem distinguir-se estruturas a que correspondem os esporozoítos. Cada oocisto contém 4 esporozoítos que serão libertados após a ingestão daquele por um hospedeiro acidental susceptível (Garcia, 1990; Smith e Rose, 1990; Peterson, 1993; Webster, 1993; Fricker, 2000; Fayer, Morgan e Upton, 2000).

Os oocistos de *C. parvum*, antes de serem ingeridos, possuem uma parede que, vista ao microscópio electrónico, apresenta ser composta de duas camadas. A exterior é irregular e tem 10 nm de espessura. A interior é mais grossa e contém uma sutura lateral que se dissolve durante o desenquistamento para libertar os esporozoítos (Peterson, 1993). Ver figura 1.2, pág. 28.

Apresentam uma elevada resistência à pressão da variação das condições ambientais como temperatura, pH e salinidade (Fayer, 1994; Robertson, Campbell e Smith, 1992). Não são afectados pelo cloro nas concentrações normalmente utilizadas no tratamento da água (Smith e Rose, 1990).

1.2.3.1 – Características do oocisto determinantes na transmissão e disseminação

a) tamanho

O tamanho diminuto do oocisto de *C. parvum*, de aproximadamente 4 a 6 µm de diâmetro, cerca de metade de um glóbulo rubro do sangue humano, de forma aproximadamente esférica (Henry, 1991; Fricker, 2000; Fayer, Morgan e Upton, 2000) permite-lhe usar as mais variadas vias de disseminação.

Talvez se possa dizer que qualquer animal pode servir de veículo aos oocistos, seja na superfície externa do corpo, por adesão, seja no interior do tubo digestivo. Desde os mamíferos, incluindo os humanos, até aos insectos, como os escaravelhos dos excrementos ou as baratas, passando pelas aves, como os patos ou as gaivotas, os moluscos, como as ostras ou os mexilhões, até aos rotíferos (invertebrados microscópicos que se podem encontrar em qualquer parte do mundo onde haja água acumulada: lagos, lagoas, charcos ou simplesmente solos húmidos) todos são potenciais portadores de oocistos (Fayer, Morgan e Upton, 2000).

A água tem provavelmente o papel mais importante no transporte e disseminação dos oocistos. Além de meio ambiente natural de animais potenciais portadores, proporcionando, eventualmente, a disseminação por meio da cadeia alimentar, ela própria, a água, transporta os oocistos em suspensão em todas as direcções das suas correntes (Hansen e Ongerth, 1991; Ong *et al.*, 1996).

Os oocistos permanentes à superfície dos campos, ali depositados por emissão nas fezes ou por simples transporte mecânico proporcionado pela movimentação de pessoas e animais, e os contidos nos esgotos domésticos são arrastados de montante para jusante das bacias hidrográficas e vão acumular-se nos aquíferos, sobretudo nos superficiais (Dworkin *et al.*, 1996).

A acção do vento terá também uma importância considerável na movimentação dos oocistos, dado o seu tamanho ínfimo lhes permitir serem suspensos no ar juntamente com

outras partículas constituintes das poeiras. Os numerosos relatos de tosse e sintomas pulmonares de crianças com criptosporidiose e pessoas imunodeprimidas reforçam e dão sustentação a esta suposição (Fayer, Morgan e Upton, 2000).

A deslocação passiva dos oocistos transportados sobre objectos sólidos é outro modo de disseminação e infecção de hospedeiros susceptíveis, a pequenas e grandes distâncias do hospedeiro infectado emissor. Em 1993 ocorreu um surto de criptosporidiose entre os visitantes de uma feira agrícola no Maine central (USA). A investigação concluiu que os atingidos beberam na feira sumo feito no momento de maçãs apanhadas do chão, colhidas por abanação, de macieiras situadas na orla de uma área de pastorícia onde recentemente tinham andado vacas a pastar, algumas das quais estavam infectadas (Millard *et al.*, 1994).

Em investigações levadas a cabo na Costa Rica e no Peru, foram encontrados oocistos na superfície de vegetais usualmente consumidos crus, adquiridos no mercado. Estes vegetais foram, entre outros, alfaces, rabanetes, tomates, pepinos, cenouras, salsa (Fayer, Morgan e Upton, 2000).

b) resistência do oocisto

Os oocistos são conhecidos pela sua natureza robusta que lhes confere a característica resistência a várias pressões do meio ambiental (Robertson, Campbell e Smith, 1992). Os oocistos de *C. parvum* partilham desta resistência: são resistentes aos desinfectantes correntemente usados em concentrações admissíveis na desinfecção da água potável (WGWC, 1997), resistem a temperaturas ambientais relativamente elevadas e à congelação (Robertson, Campbell e Smith, 1992) e retêm a viabilidade e infecciosidade após a passagem através do intestino de aves hospedeiras (Graczyk *et al.*, 1996).

Robertson, Campbell e Smith, (1992) avaliaram a sobrevivência dos oocistos de *C. parvum* sob vários tipos de pressão ambiental. A avaliação baseou-se na viabilidade dos oocistos após terem sido submetidos a congelação e dessecação e aos desinfectantes óxido de cálcio, sulfato férrico e sulfato de alumínio, pela inclusão ou exclusão de dois corantes vitais fluorogénicos [4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e iodeto de propidium (PI)].

Estes autores concluem que os processos de tratamento investigados – óxido de cálcio, sulfato férrico e sulfato de alumínio – nas concentrações usadas não afectavam a viabilidade dos oocistos quando o pH era corrigido para 6, aproximadamente. Altas concentrações de cal por longos períodos aumentava significativamente a inviabilidade dos oocistos, mas quando o pH era corrigido a viabilidade não era alterada.

Quadro 1.2. Concentrações de ferro e alumínio utilizadas por Robertson *et al.* no processo de tratamento pela floculação:

Quantidade	Unidade	Metal
3,5	ppm	Fe
16	ppm	Fe
1	ppm	Al
1,5	ppm	Al

Fonte: Robertson, Campbell e Smith, (1992)

A congelação rápida dos oocistos, por imersão em azoto líquido (cerca de -200°C), resultou em 100% de mortes. Mas a congelação lenta, num congelador a -22°C , foi menos eficiente e só ao fim de 152 horas a mortalidade nos oocistos ultrapassou os 90%, sendo ao fim de 775 horas de 98,2%, tendo, portanto, ainda uma viabilidade de 1,8%.

A dessecação mostrou ser eficiente e consideravelmente rápida na acção letal para os oocistos. Ao fim de 2 horas de exposição a ar seco e à temperatura ambiente, a percentagem de oocistos mortos já era de 97% e ao fim de 4 horas já era de 100%.

Noutro estudo, Korich *et al.* (1990) estudaram os efeitos do ozono, dióxido de cloreto, cloreto e monocloramina na viabilidade dos oocistos de *C. parvum*, a 25°C . Neste estudo foram usadas as concentrações e tempos sumariados no quadro 1.3.

Quadro 1.3 Efeitos de alguns desinfectantes na viabilidade dos oocistos de *C. parvum*:

Desinfectante	Concentração (em ppm)	Tempo de exposição (em minutos)	Viabilidade após o tempo de exposição (em %)
Ozono	1	10	99,9
Dióxido de Cloro	1,3	60	90
Cloro	80	90	99
Monocloramina	80	120	98

Fonte: Korich *et al.* (1990)

Os autores deste estudo concluíram que os resultados encontrados indicavam que os oocistos de *C. parvum* são 30 vezes mais resistentes para o ozono e 14 vezes mais resistentes para o dióxido de cloro que os quistos de *Giardia* expostos a estes desinfectantes e sob as mesmas condições.

Relativamente à temperatura, pelos resultados divulgados por Fayer (1994) e interpretação do mesmo, alguns oocistos de *C. parvum* são resistentes, em suspensões aquosas virtualmente puras, até 1 minuto a 67,5°C e até 5 minutos a 59,7°C.

Deve, contudo, referir-se o estudo de Harp *et al.* (1996a), sobre o efeito da pasteurização na infecciosidade dos oocistos de *C. parvum* na água e no leite. Estes autores demonstram a eficácia da pasteurização comercial do leite, 15 segundos a 71,7°C, praticada nos países desenvolvidos, na inativação de suspensões de oocistos, tanto em água como em leite.

Naquele estudo, uma suspensão de 10^5 oocistos foi incapaz de infectar ratinhos bebés, após exposição da suspensão a 71,7°C por 15, 10 ou 5 segundos. Contrariamente, todos os ratinhos inoculados com a mesma suspensão, mas sem exposição à pasteurização, tornaram-se infectados.

c) prevalência ambiental

Um vitelo infectado com *C. parvum* normalmente emite aproximadamente 100 milhões de oocistos por dia, no período de uma semana (Müller *et al.*, 1993), tendo picos de excreção diária de 2 a 20 biliões, segundo Fayer (2000). Uma vaca adulta pode albergar uma infecção subclínica e excretar tanto como 7 milhões de oocistos por dia (Webster, 1996).

Os estudos sobre a prevalência de oocistos de *Cryptosporidium* no solo são escassos mas há vários trabalhos que nos podem fornecer dados sobre a ocorrência e concentração nas águas de superfície antes e após tratamento. Segundo Graczyk, Fayer e Cranfield (1997), a razão de amostras positivas em águas de superfície varia de 6 a 100 por cento, enquanto a concentração nas amostras positivas de águas de superfície varia de 0,003 a 5800 oocistos por litro.

Quadro 1.4. Resultados de positividade e concentração de alguns estudos em águas superficiais sem tratamento:

Amostras			Concentração (oocistos/litro)	Referências
Totais	Positivas	Positividade (em %)		
85	74	87,1	0,07 – 484	LeChevallier, Norton e Lee (1991b)
35	34	97,1	0,2 – 65	Hansen e Ongerth (1991)
30	14	46,7	0,14 – 30,0	Ong <i>et al.</i> (1996)
32	15	46,9	0,05 – 3,44	Ong <i>et al.</i> (1996)
19	5	26,3	0,48 – 5,14	Ong <i>et al.</i> (1996)
27	14	51,9	0,17 – 4,43	Ong <i>et al.</i> (1996)

LeChevallier, Norton e Lee (1991a) investigaram a ocorrência de oocistos na água de consumo, pós tratamento e filtração, em 66 estações de tratamento, em 14 estados dos EUA e numa província do Canadá. Foram observados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 26,8% (22 de 82) das amostras testadas de água destinada ao consumo, variando a concentração de 0,013 a 4,8 oocistos por litro.

Quadro 1.5. Ocorrência e densidade de oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente aquático em variados pontos do globo e em diferentes meios aquáticos.

Países	Número de amostras	Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> (% de amostras positivas)	Densidade de <i>Cryptosporidium</i> (oocistos L ⁻¹)
<i>Em águas superficiais</i>			
EUA	181	55	0.0025-44
EUA	85	87	0.007-484
EUA	35	97.1	0.18-63.5
EUA	11	100	2-112
EUA	101	24	0.005-252.7
Reino Unido (Escócia)	262	40.5	0.006-2.3
Reino Unido (Escócia)	403	15	0.0012-0.12
Reino Unido	375	4.5	0.07-4
Reino Unido	691	52.2	0.04-3
Reino Unido	375	4.4	0.07-2.75
Alemanha	9	78	Não declarado
Espanha	8	50	< 0.01-0.31
Austrália	114	46.5	0.1-14.3
Israel	16	68.8	0.006-0.52
Malasia	76	10.5	2-245.6
Reino Unido	196	39.3	0.006-15.6
<i>Em águas de beber</i>			
EUA	36	17	0.005-0.017
EUA	82	26.8	Não declarado
Reino Unido (Escócia)	15	7	0.006
Espanha	9	33	< 0.01-0.02
Brasil	18	22.2	Não declarado
Reino Unido	209	37	0.007-1.36
<i>Em efluentes de esgotos</i>			
EUA	11	100	4-3960
Reino Unido (Inglaterra)	50	74	1-321
Reino Unido (Escócia)	70	37	0.03-2.3
Reino Unido (Escócia)	117	65	5-60
EUA	130	Não declarado	Até 0.05
EUA	60	67	< 0.6-120
Reino Unido (Inglaterra)	94	25.5	10-60

Fonte: *Detection of Parasites in the Environment*, SMITH (1998).

Wallis *et al.* (1996), como resultado de um estudo sobre a prevalência de quistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente aquático através do Canadá, apresentam uma percentagem média de amostras positivas para o *Cryptosporidium* sp. de 4,4%. Esta percentagem de positividade foi de 4,5 nas amostras de água de beber não tratada, 3,6 na água de beber com pré-tratamento e 6,1 no esgoto antes do tratamento. Saliente-se que os autores referem ter sido muito difícil o reconhecimento dos oocistos sob as condições

experimentadas durante aquele estudo e que é provável que alguns erros tenham ocorrido na identificação.

Estes e outros dados de ocorrência e densidade de oocistos de *Cryptosporidium* encontrados em diferentes meios aquáticos, em variados pontos do globo, revelam a prevalência deste protozoário ubiqüitário. Alguns destes dados são mostrados no quadro 1.5 da página 24.

d) dose infecciosa média

Em teoria, um oocisto viável de *C. parvum*, bem sucedido no desenquistamento, poderá produzir infecção em quatro células tecidulares hospedeiras e será suficiente para produzir infecção num hospedeiro susceptível (Gibson, Haas e Rose, 1998; Fricker e Clancy, 1998; Fricker 2000).

Para avaliar quantos oocistos de *C. parvum* seriam necessários para desenvolver uma infecção numa pessoa saudável seronegativa, foram ingeridas doses únicas por 29 voluntários, desde 30 até 1 milhão de oocistos, provenientes de um bezerro. Um em cada cinco voluntários que ingeriram 30 oocistos contraíram infecção. Entre os que ingeriram 1000 ou mais oocistos sete em sete ficaram infectados (Gibson, Haas e Rose, 1998; Fayer, 2000).

Com base nos dados do estudo referido no parágrafo precedente, a dose infecciosa média (DI_{50}), isto é, o número de oocistos que poderia infectar metade dos indivíduos expostos a uma determinada dose, foi calculada em 132. Dados posteriores conduziram a um novo cálculo da DI_{50} para 87 oocistos (Fayer, 2000).

Fayer, Morgan e Upton (2000) referem uma investigação levada a cabo por Okhuysen *et al.* na qual foi verificado que diferentes isolados de oocistos produziam valores de DI_{50} altamente diferentes em voluntários humanos, tendo a DI_{50} variado de 9 a 1042, em função do isolado.

Estes estudos indicam a ausência de um número limiar de infecciosidade para o *C. parvum*, e sugerem que a probabilidade de um indivíduo contrair infecção tem um limite inferior de apenas um único oocisto viável. O risco de contrair infecção por *C. parvum* aumenta exponencialmente com o número de oocistos ingeridos (Gibson, Haas e Rose,1998).

Relacionando a probabilidade de infecção com o número de oocistos de *Cryptosporidium* ou quistos de *Giardia*, Gibson, Haas e Rose (1998) exprimem aquela relação pelo gráfico da figura 1.1.

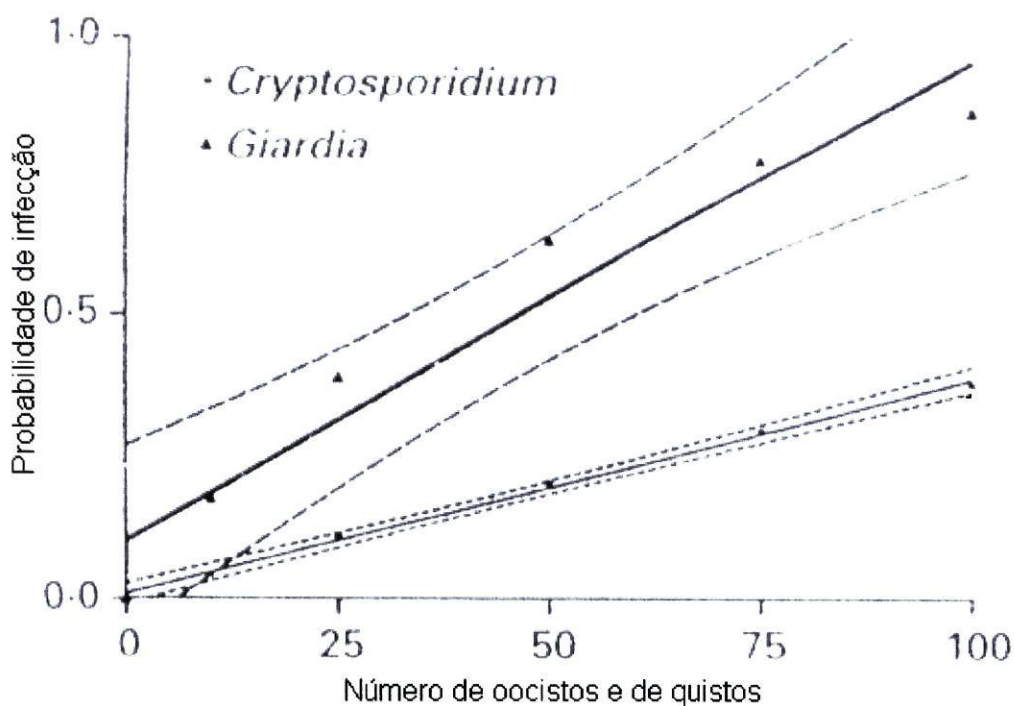


Fig. 1.1. Comparação da relação dose resposta de *Cryptosporidium* e *Giardia*. As linhas descontínuas correspondem a intervalos de confiança de 95%.

Fonte: Gibson Haas e Rose, 1998.

Segundo Gibson, Haas e Rose (1998), a relação da dose infecciosa, a viabilidade e o risco de infecção dos protozoários patogénicos pode ser exprimida pela equação:

$$P_i = 1 - e^{(-rN)},$$

onde P_i é a probabilidade de contrair infecção, r é a fracção de microorganismos ingeridos que sobrevive para iniciar uma infecção hospedeiro-específica, N é o número médio de microorganismos (por exemplo, num determinado volume de água), e é o número irracional 2,71828....

No gráfico da figura 1.1, o valor de r para o parasita *Cryptosporidium* é de 0,00467 (IC 95%, 0,00195–0,0097); para *Giardia* r assume o valor 0,01982 (IC 95%, 0,009798–0,03582). Nestes modelos, o risco de infecção por *Giardia* é superior ao risco de infecção por *Cryptosporidium*, mas isto pode dever-se ao número limitado de indivíduos em que assentam os estudos de que foram obtidos aqueles resultados, 1954 para *Giardia* e 29 para *Cryptosporidium* (Gibson, Haas e Rose, 1998).

1.2.4 – Ciclo de vida

O oocisto atinge o ambiente juntamente com as fezes excretadas pelo hospedeiro infectado. É extremamente resistente às condições ambientais (Robertson, Campbell e Smith, 1992) mas, após ingestão acidental por um hospedeiro susceptível, chega ao lúmen do trato intestinal do novo hospedeiro, desenquista e, aqui, inicia e completa um novo ciclo de vida (Webster, 1993).

1.2.4.1 – Ciclo assexual

O oocisto, desenquistado, liberta quatro células uninucleadas haploides, móveis, em forma de crescente – os esporozoítos (figura 1.2).

Os esporozoítos invadem e penetram rapidamente as células epiteliais do intestino. Cada esporozoíto, sofrendo várias transformações, entre as quais um aumento significativo de volume, diferencia-se em trofozoíto.

Cada trofozoito inicia um ciclo assexual de reprodução por fissão múltipla – esquizogonia ou merogonia, resultando na formação de um meronte ou esquizonte de 1.^a geração.

Cada meronte ou esquizonte de 1.^a geração produz oito merozoítos. Atingindo a maturação, os merontes rebentam e libertam merozoítos do tipo I.

Cada merozoito do tipo I libertado invade uma nova célula epitelial adjacente, sofre merogonia e origina, novamente, a formação e libertação de oito merozoítos do tipo I. Este processo de reinfeção poderá repetir-se continuamente, mantendo e desenvolvendo a infecção do hospedeiro pela via do **ciclo assexual**.



Figura 1.2. Microfotografia mostrando um oocisto de *C. parvum* desenquizado e três esporozoítos que emergiram do oocisto. Barra de escala = 10 µm. Fonte: Widmer, Carraway e Tzipori (1996).

1.2.4.2 – Ciclo sexual

Alguns merozoítos tipo I podem diferenciar-se em merontes que, em vez de conterem oito, contêm quatro merozoítos. Estes merontes são designados de tipo II.

Os merozoítos libertados dos merontes tipo II, designados merozoítos de tipo II, transformam-se em formas sexuais – gametócitos. Uns, ao serem libertados, penetram as células do hospedeiro, aumentam de tamanho desenvolvendo-se e transformam-se em macrogâmetas. Outros, após penetrarem as células do hospedeiro, sofrem um processo de fissão múltipla e transformam-se em microgametócitos, contendo dezasseis microgâmetas.

Os microgâmetas eclodem da célula hospedeira e vão penetrar os macrogâmetas que fertilizam e com os quais se fundem para formar um zigoto.

O zigoto, a única fase diploide no ciclo de vida do *Cryptosporidium*, forma uma parede resistente à sua volta, originando o oocisto. Ocorre a meiose, de que resultam quatro esporozoítos – esporogonia, sendo, então, o oocisto esporulado lançado no lúmen intestinal (Smith e Rose, 1990; Heyworth, 1992; Peterson, 1993).

Os oocistos esporulados, resultantes da meiose, que ocorre no hospedeiro, ao atingir o lúmen intestinal, tornam-se infectantes e podem reiniciar endogenamente o ciclo assexual no hospedeiro que os alberga ou podem ser emitidos para o exterior e ir iniciar a doença noutro hospedeiro susceptível (Peterson, 1993).

1.2.4.3 – Dualidade oocística

Esta dualidade de comportamento oocístico deve-se a que a cerca de 20% dos oocistos produzidos no intestino falta a parede que lhes confere a resistência ambiental, e possuem apenas uma série de membranas envolvendo os esporozoítos em desenvolvimento. Estes oocistos desprovidos de parede são, por vezes, chamados de oocistos de parede fina (Heyworth, 1992).

Os oocistos possuidores de uma parede que lhes confere resistência ambiental, cerca de 80%, são expelidos para o exterior juntamente com as fezes, podendo ir infectar outros hospedeiros.

Os oocistos desprovidos de parede, ou de parede fina, poderão, por desenquistamento, libertar os esporozoítos ainda dentro do intestino do hospedeiro, antes de serem expelidos com as fezes. Estes esporozoítos irão infectar novas células para perpetuar a infecção (Garcia, 1990; Heyworth, 1992).

Admitindo este mecanismo, teremos, então, dois ciclos auto-infectantes: o primeiro por reciclagem contínua dos merontes tipo I, originado nos merozoítos tipo I; o segundo por eclosão dos esporozoítos a partir dos chamados oocistos de parede fina (figura 1.3).

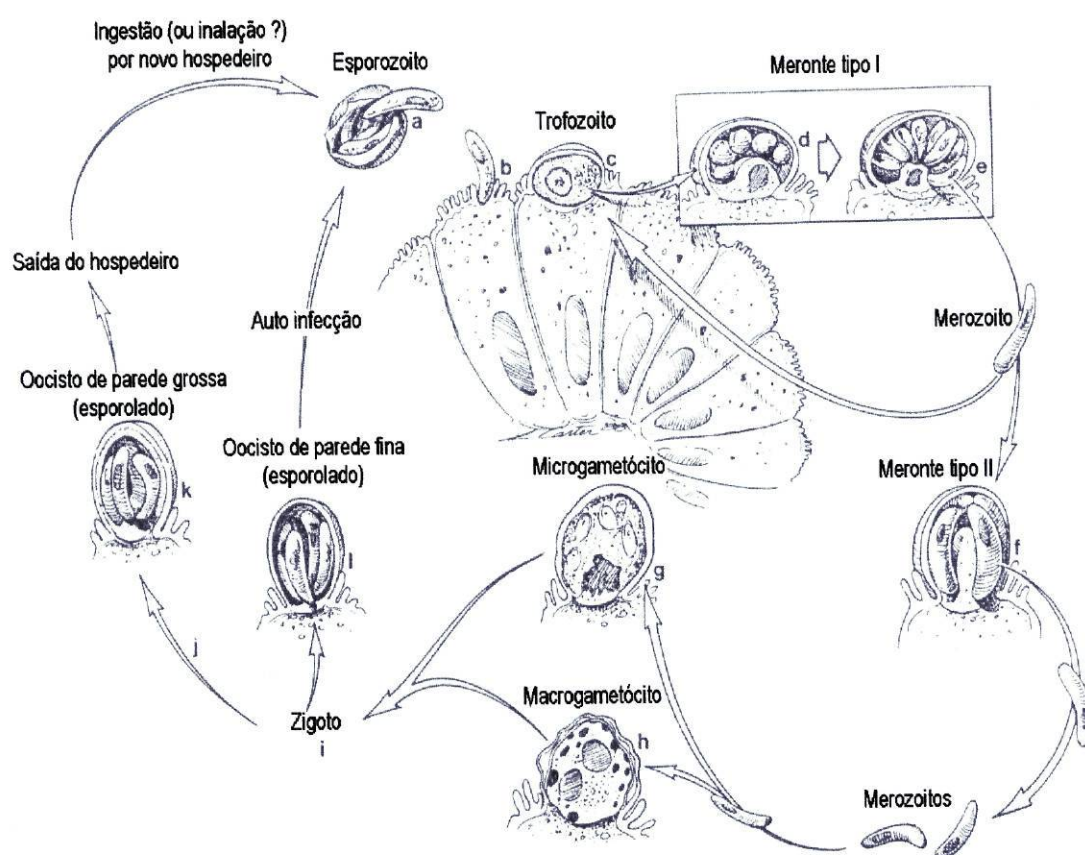


Figura 1.3. Ciclo de vida do *Cryptosporidium parvum*. A infecção do hospedeiro inicia com a ingestão de oocistos de parede grossa (k). Cada oocisto liberta 4 esporozoítos (a). Cada esporozoítos, no lúmen intestinal, infecta uma célula hospedeira (b) e transforma-se em trofozoítos (c) que, amadurecendo, dá um meronte tipo I contendo 8 merozoítos tipo I (d, e). Os merozoítos do tipo I darão novos merontes do tipo I (auto-infecção) ou merontes do tipo II (f). Os merontes tipo II contêm 4 merozoítos tipo II que dão início à fase sexual do ciclo de vida. Uns merozoítos do tipo II evoluirão para macrogametócitos (h), outros para microgametócitos (g). Os macrogametócitos evoluem para macrogâmetas. Os microgametócitos produzem microgâmetas que vão fertilizar os macrogâmetas. Da fertilização resulta o zigoto (i), que evolui para oocisto esporulado contendo 4 esporozoítos. Se de parede fina, o oocisto permanece no hospedeiro e liberta os esporozoítos no lúmen intestinal (auto-infecção) (l). Se de parede grossa, o oocisto é excretado nas fezes para ir infectar novos hospedeiros (j, k).

Fonte: Heyworth (1992).

1.2.5 – Organelos e mecanismos invasivos do esporozoito

A observação, ao microscópio electrónico, dos esporozoitos de *Cryptosporidium*, aquando do ataque e invasão das células epiteliais intestinais e células de cultura, sugere haver analogia com outras formas invasivas Apicomplexa. O esporozoito contém organelos apicais, incluindo roptrias e micronemas, uma estrutura sonda anterior chamada conoide, um núcleo e dois corpos cristalóides posteriores (Azevedo, 1989; Peterson, 1993).

Quando a porção anterior do esporozoito entra em contacto com a célula hospedeira, a membrana celular hospedeira invagina e finas extensões da membrana microvilosa envolvem o parasita. Forma-se, assim, um vacúolo parasitóforo intracelular mas extracitoplasmático, localizado na superfície luminal da célula hospedeira (Azevedo, 1989; Peterson, 1993).

Um vacúolo que se desenvolve na porção anterior, na região das roptrias e micronemas (figura 1.4), parece ser uma estrutura membranosa residual após a libertação, no momento da invasão, de produtos contidos num organelo apical, postulado serem mediadores do processo invasivo. Não há, contudo, evidência concreta da função dos conteúdos destes organelos apicais (Peterson, 1993).

A membrana vacuolar separa o citoplasma do esporozoito do citoplasma da célula hospedeira e parece ser o organelo alimentador. Esta estrutura única na base do vacúolo parasitóforo terá um papel na troca de material entre o parasita e a célula hospedeira (Peterson, 1993).

As estruturas dos esporozoitos mencionadas poderão ser visualizadas pela observação da figura 1.4 da página 32.

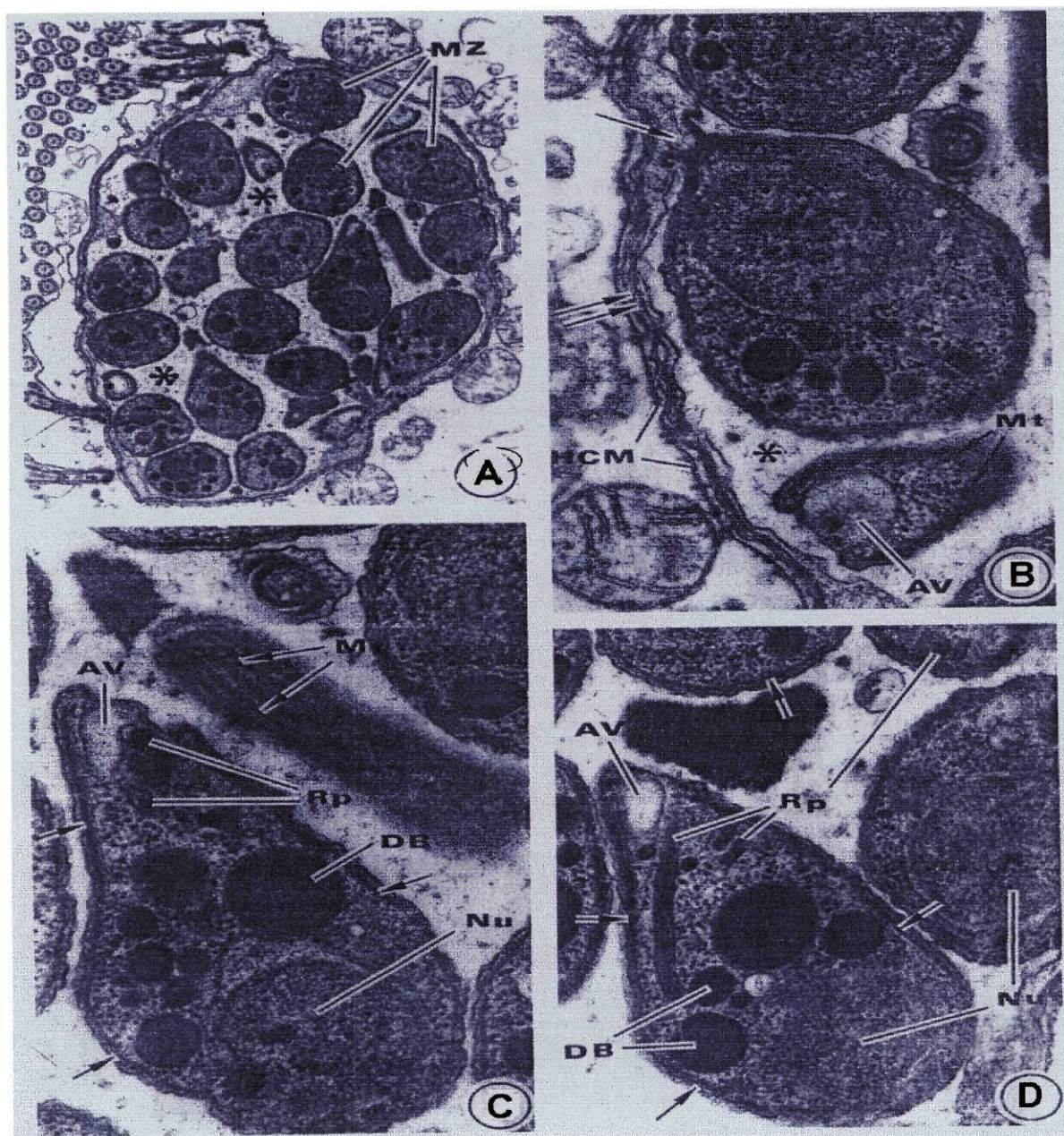


Figura 1.4:

(A). Secção ultrafina de um vacúolo parasitóforo (*) com vários merozoitos (Mz) de *Cryptosporidium* sp. cortados a vários níveis. x 12500.

(B). Detalhe de merozoitos imaturos mostrando a região apical (seta) em conexão com a parte interna do vacúolo parasitóforo (*). Este último é formado por duas membranas justapostas (par de setas) em estreito contacto com a membrana da célula hospedeira (HCM). Próximo, uma secção tangencial da porção apical mostrando o vacúolo apical (AV) envolvido por vários microtúbulos (Mt). x 48600.

(C). Secção ultrafina de merozoitos mostrando duas membranas subplasmalema justapostas (setas) e as estruturas internas como roptrias (Rp), corpos densos (DB), vesícula apical (AV) e núcleo (Nu). Próximo, uma secção longitudinal mostra alguns microtúbulos subpeliculares periféricos (Mt). x 55000.

(D). Secção longitudinal de merozoitos mostrando algumas secções de roptrias (Rp), corpos densos (DB), vesícula apical (AV), membranas subplasmalemais (setas) e um núcleo (Nu). x 42800.

Fonte: Azevedo, 1989.

1.3 - Patogenia e patologia

Em hospedeiros imunocompetentes, após um período de incubação de 4 a 14 dias, o paciente é acometido por uma diarreia aquosa profusa acompanhada de cólicas abdominais. Estas manifestações, geralmente, persistem de uma a duas semanas e desaparecem espontaneamente. Uma pequena percentagem refere náuseas, vômitos, anorexia e febre baixa (Plorde, 1987).

Em indivíduos imunocomprometidos como os doentes com SIDA, hipogamaglobulinemia congénita, em quimioterapia oncológica e doentes sujeitos a transplante de órgãos sob gestão imunossupressora, a sintomatologia é semelhante à dos hospedeiros normais. Mas a diarreia é caracteristicamente mais severa, clinicamente semelhante à diarreia induzida pela toxina colérica, com elevada perda de fluídos [de 1 a 17 litros por dia, segundo Plorde (1987); até 20 litros por dia, segundo Clark e Sears (1996)], podendo permanecer de forma persistente ou remitente durante o resto da vida.

Os mecanismos desencadeadores da diarreia que geralmente acompanha a criptosporidiose ainda não estão bem esclarecidos. Sabe-se, no entanto, que a invasão do intestino por *C. parvum* resulta em dano e eventualmente morte dos enterócitos com a consequente extrusão destes do epitélio intestinal (Clark e Sears, 1996). A atrofia das vilosidades, a hiperplasia celular das criptas intestinais e a infiltração de células inflamatórias, macrófagos e PMN (polimorfonucleares neutrófilos) na lâmina própria resultarão também da invasão do intestino por *C. parvum* (Plorde, 1987; Clark e Sears, 1996).

Guarino *et al.* identificaram actividade semelhante à das enterotoxinas em sobrenadantes de filtrados de fezes de bezerros infectados com *Cryptosporidium parvum*. Os mesmos pesquisadores também encontraram actividade enterotóxica nas fezes de vários doentes de SIDA com criptosporidiose (Clark e Sears, 1996).

Aqueles estudos, porém, não clarificam se a actividade secretória detectada nos sobrenadantes dos filtrados das fezes dos bezerros é devida a uma enterotoxina produzida

por *C. parvum* ou um factor do hospedeiro, como uma hormona secretória produzida pelo sistema imune ou nervoso, ou por um metabolito secretório libertado pelo epitélio intestinal infectado. Quanto à actividade enterotóxica encontrada nas fezes dos doentes com SIDA por aqueles autores, não é claro se a actividade detectada era específica de *C. parvum* ou originária de outras infecções que não teriam sido examinadas, dado as fezes provirem de doentes com possível diarreia idiopática (Harp e Sacco, 1996).

A infecção por *C. parvum* não terá um papel significativo na ontogenia da função celular dos linfócitos B na aquisição de resistência imunológica como resultante da infecção por este parasita. A aquisição e desenvolvimento da resistência à infecção ocorrerá na ausência de exposição prévia a *C. parvum* e resultará da presença da microflora bacteriana normal no hospedeiro (Harp e Sacco, 1996).

Um estudo realizado por Harp e Sacco em ratos, desde o nascimento até ao desmame, expostos e não expostos ao *C. parvum*, indica que o aumento da resistência à infecção não resulta da exposição mas sim da maturação normal da resposta imunitária em ratos jovens, pelo que os anticorpos como resposta à infecção por *C. parvum* terão um papel negligenciável. Esta opinião é reforçada pelo facto de os doentes com SIDA manterem uma infecção crónica por *C. parvum*, não obstante apresentarem títulos significativos de anticorpos serológicos e mucósicos contra este antígeno (Harp e Sacco, 1996).

Papel importante será desempenhado pelos linfócitos T, especialmente pelo subgrupo CD4⁺, no combate à infecção por *C. parvum*. Segundo Clark e Sears (1996), Flanigan *et al.* terão concluído que doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) com contagem de pelo menos 180 células CD4⁺ por mm³ se libertavam espontaneamente da infecção por *C. parvum* dentro de quatro semanas, mas que cerca de 87% daqueles que se apresentavam com contagem inferior desenvolviam criptosporidiose persistente.

Ratos selectivamente deplecionados de linfócitos T CD4⁺ (helper), por tratamento com anticorpos monoclonais anti-CD4, tiveram uma capacidade reduzida para vencer a infecção por *C. parvum*. Também foi verificado em ratos infectados com *Giardia muris*, também deplecionados de CD4⁺ por anticorpos monoclonais anti-CD4, desenvolverem infecção crónica, diferentemente de ratos imunocompetentes que eliminaram a infecção entre

4 a 5 semanas. Isto sugere que o triunfo imunológico sobre a infecção murina por *C. parvum* depende dos linfócitos T CD4⁺ (Heyworth, 1992).

Rasmussen *et al.* (1995) usaram ratos adultos infectados por *C. parvum*, imunes e imunodeprimidos por dexametazona (DEX - um glicocorticoide sintético), para testar os efeitos da dehidroepiandrosterona (DHEA - um esteroide abundante nos humanos, produzido pelo cortex adrenal). Uma das observações, a análise fenotípica dos esplenócitos, no 14.º dia pós-infecção, mostrou uma redução significativa dos linfócitos T CD4⁺ nos ratos imunodeprimidos quando comparados com os pares imunes. Outra observação, a emissão de oocistos nas fezes, revelou uma leve emissão de oocistos pelos imunes que terminou cerca do 10.º dia, enquanto a emissão pelos imunodeprimidos foi pesadíssima no início da infecção e, embora decrescendo no decurso da experiência, manteve-se até ao final, 14.º dia, sendo, contudo, mais elevada nos não tratados com DHEA que nos tratados com este esteroide adrenocortical (Rasmussen *et al.*, 1995).

O interferão- γ (IFN- γ), produzido pelo subconjunto celular T helper Th1 (Harp, Whitmire e Sacco, 1994) parece ter também um papel importante no combate à infecção por *C. parvum*. O IFN- γ tem um papel central na expressão da resistência ao coccidiano *Eimeria vermiformis* (Smith, Eckert e Braun, 1993).

Anticorpos monoclonais contra o IFN- γ anulam a resistência contra *E. vermiformis* numa estirpe de rato normalmente resistente e o IFN- γ inibe o desenvolvimento daquele parasita numa cultura celular (Smith, Eckert e Braun 1993). Há vários estudos que reforçam a convicção da importância do IFN- γ na resistência e combate à infecção por *C. Parvum* e alguns destes estudos mostram que o tratamento *in vivo* com anticorpos anti-IFN- γ aumenta a susceptibilidade dos ratos a *C. parvum* (Harp, Whitmire e Sacco 1994).

Os macrófagos são também envolvidos na resposta à invasão parasitária. Ratos infectados com *C. parvum*, independentemente do seu estado imune, têm significativamente mais macrófagos que os seus pares de ensaio (Rasmussen, 1995). Uma predominância de células Th1, que produzem ITN- γ e IL-2 (interleucina-2), em resposta a antigénios do

parasita, resulta em hipersensibilidade e activação prolongada dos macrófagos para matar os parasitas intracelulares (Harp, Whitmire e Sacco, 1994).

A função defensora dos macrófagos, incorporando e destruindo os corpos estranhos, poderá ser aproveitada pelos oocistos para se transportarem e ir invadir outras regiões do hospedeiro. Embora os oocistos usualmente não invadam o citoplasma das células hospedeiras, têm sido encontrados dentro de macrófagos com capacidade fagocítica destruidora defeituosa (Dupont *et al.*, 1996).

Organismos do género *Cryptosporidium* podem multiplicar-se dentro de macrófagos *in vitro*. Isto sugere que parasitas extra-intestinais possam deslocar-se utilizando como veículos macrófagos circulantes no fluxo sanguíneo. Esta hipótese é reforçada por um caso de criptosporidiose intestinal e pulmonar, cujo exame *post mortem* revelou a presença de organismos do género *Cryptosporidium* no lúmen e na submucosa de vasos sanguíneos (Dupont *et al.*, 1996).

1.4 – Epidemiologia

1.4.1 – Prevalência da criptosporidiose

Estudos de alguns autores referidos por Huggins (1988), com a finalidade de averiguar da frequência da criptosporidiose entre os indivíduos com quadro diarreico, mostram que, naquelas investigações, a percentagem de portadores de criptosporidiose variou entre 3,19% em crianças com diarreia não internadas, num estudo efectuado no Brasil em Belém do Pará, e 9,1% em doentes hospitalizados com sintomatologia gastrointestinal, num outro estudo.

No estudo referido a doentes internados com quadro clínico de gastroenterite, a média de portadores de criptosporidiose foi de 4,1%, sendo o valor mais elevado (4,8%) encontrado entre as crianças, enquanto que nos adultos foi de apenas 1,6%. Numa pesquisa epidemiológica, para fazer o diagnóstico da criptosporidiose em crianças com quadro clínico de diarreia aguda de zonas rurais e urbanas na Costa Rica, os resultados mostraram uma ligeiramente maior prevalência da infecção por *Cryptosporidium* sp. nas crianças das zonas urbanas (4,4%) comparativamente com as das zonas rurais (4,2%) (Huggins, 1988).

Os resultados dos estudos referidos nos dois parágrafos precedentes são próximos dos referidos por Acha e Szyfres (1989). Amostras de fezes submetidas a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*, efectuadas em doentes hospitalizados com gastroenterite, revelaram uma variação entre 4,1 e 4,8% nas amostras testadas quanto à positividade para a presença de oocistos de *Cryptosporidium*. Nestes resultados é verificada uma percentagem de positividade mais alta nas crianças (4,8%) relativamente aos adultos (4,1%).

Quanto à prevalência das infecções por *C. parvum* na população em geral, Mead *et al.* (1991) referem valores entre 2,2 e 8,5%. Trabalhos mais recentes apontam para uma prevalência de aproximadamente 2% nos países desenvolvidos em doentes imunocompetentes com diarreia (Ignatius *et al.*, 1997; Fayer, Morgan e Upton, 2000). Particular atenção deve ser focalizada nos doentes com SIDA, entre os quais a infecção criptosporidial é apontada

para variar entre 10 e 15%, nos países desenvolvidos, e, entre 30 e 50 % nos países em vias de desenvolvimento (Mead *et al.*, 1991; Peterson, 1993; Widmer, Carraway e Tzipori, 1996).

1.4.2 – Transmissão

A transmissão dos parasitas do género *Cryptosporidium* dá-se pela ingestão de oocistos viáveis por um hospedeiro susceptível, provenientes de um hospedeiro infectado. O modo de transmissão é fecal-oral. A forma transmissível e ambientalmente robusta, o oocisto, é excretado nas fezes por um hospedeiro infectado. A transmissão pode ser pessoa-a-pessoa, animal-pessoa, pessoa-animal, animal-animal. (WGWC, 1997; Gibson, Haas e Rose, 1998; Fayer, Morgan e Upton 2000).

A transmissão pode ser directa ou indirecta. Será directa quando os oocistos do hospedeiro infectado emissor cheguem ao receptor susceptível através de contacto físico directo entre ambos, e será indirecta quando os oocistos atinjam o receptor através de um veículo agente, seja vivo ou inanimado.

O contacto físico pessoa-a-pessoa e animal-animal acontece naturalmente nas actividades sexuais e sociais, o que permite a transmissão directa. A transmissão directa pessoa-animal e animal-pessoa também se pode dar quando se entra em contacto físico com os animais, por exemplo, quando os afagamos (WGWC, 1997).

Os mecanismos e os agentes da via indirecta de transmissão são múltiplos. Vários dos possíveis agentes intervenientes na transmissão de *C. parvum*, referidos no ponto 1.2.3.1 do presente trabalho, são explicados pelas características da forma infecciosa transmissível, o oocisto. Resumidamente, tais características estão relacionados com o tamanho, a resistência, a prevalência ambiental e a dose infecciosa média do oocisto.

1.5 – Tratamento e Profilaxia

1.5.1 – Tratamento

Grande número de drogas, entre as quais espiramicina, eritromicina, claritromicina, paromomicina, albendazol, nitozaxonida, neomicina, furazolidona, azitromicina, diloxanida, framacetina, têm sido testadas e usadas no tratamento da criptosporidiose (Tomás, Antunes e Araújo, 1986; Plorde, 1987; Huggins, 1988; Kotler, 1989; Rehg, 1991; Ferreira *et al.*, 1995; Dupont *et al.*, 1996; Bartlett, 1998). Porém, até este momento, nenhuma droga terapêutica provou ser eficaz contra esta doença em humanos (Forney, Yang e Healey, 1996; WGWC, 1997; Fricker e Clancy, 1998; Swales e Wright, 2000).

Dado que nos doentes imunocompetentes a criptosporidiose é auto-limitada (Plorde, 1987; Rehg, 1991; Priest *et al.*, 1999), embora podendo causar diarreia aquosa profusa e vômitos, cujos sintomas geralmente perduram desde alguns dias a três semanas, só ocasionalmente a infecção por *C. Parvum* causa uma diarreia severa e persistente nestas pessoas (Heyworth, 1992), para estes doentes não é justificado o esforço da procura de uma terapia antiparasitária específica (Plorde, 1987).

Para os doentes imunocompetentes, a ingestão abundante de líquidos, para reposição dos fluídos perdidos devido à diarreia e, se desejado, a toma de um antidiarreico, mesmo sem receita médica, será suficiente como tratamento (WGWC, 1997).

Em crianças, idosos, marasmáticos por má nutrição e diabéticos, a criptosporidiose pode causar uma diarreia severa, e constituir um perigo para a vida nas pessoas com o sistema imunológico debilitado (Gibson, Haas e Rose, 1998; Morgan *et al.*, 1999). Nas crianças, a reidratação oral e, por vezes, parenteral poderá ser requerida (Plorde, 1987). Nos doentes imunocomprometidos infectados por *Cryptosporidium*, a severidade e cronicidade da diarreia exigem intervenção terapêutica (Plorde, 1987).

Nos doentes imunodeprimidos, a única abordagem regularmente com êxito tem sido a reversão das anormalidades imunológicas subjacentes à infecção. Nos doentes sujeitos a

quimioterapia anti-cancerosa ou drogas imunossupressoras, nos receptores de transplante de órgãos, o sucesso na cura da criptosporidiose tem sido obtido com a retirada daqueles agentes terapêuticos (Plorde, 1987).

No grupo dos imunocomprometidos destacam-se os doentes com SIDA, nos quais a criptosporidiose é causa de diarreia em 15 a 40% dos adultos (Rehg, 1991) e contribui significativamente para a sua morbidade e mortalidade (Widmer *et al.*, 1998), devido à falta de medicamentos terapêuticos ou profiláticos (Graczik, Fayer e Cranfield, 1997).

O tratamento da criptosporidiose por drogas terapêuticas, nos doentes com SIDA é feito paliativamente (Kotler, 1989). Os insucessos clínicos são comuns e as curas relatadas são poucas (Plorde, 1987; Huggins, 1988; Ferreira *et al.*, 1995; Dupont *et al.*, 1996). Alguns doentes experimentam uma melhoria clínica ou mesmo resolução dos sintomas da diarreia mas a infecção permanece, continuando a excretar oocistos, e recidivam quando privados de agente terapêutico (Plorde, 1987; Kotler, 1989).

1.5.2 – Profilaxia

Dada a ausência de drogas medicamentosas eficazes contra a criptosporidiose, as medidas profiláticas terão de incidir no impedimento da transmissão e propagação de *Cryptosporidium*, que acontece por intermédio do oocisto, de um hospedeiro infectado a outros hospedeiros susceptíveis, especialmente os imunodeprimidos (Plorde, 1987).

As medidas profiláticas deverão ser de dois âmbitos, o informativo e o executivo. As medidas de âmbito informativo terão dois destinatários:

- I. o populacional – população em geral e especialmente a de maior risco (os imunodeprimidos, as crianças e os idosos);
- II. o institucional. – autoridades de saúde pública, profissionais de saúde e responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água de consumo público e tratamento de esgotos.

As medidas de âmbito executivo terão preferentemente um destinatário, o institucional.

As acções profiláticas de carácter informativo passarão pelo esforço de consciencializar a população do risco e perigosidade de contrair uma criptosporidiose, particularmente os mais débeis imunologicamente, em termos de saúde individual e colectiva.

Uma forma de tentar obter a consciencialização da população para o problema da criptosporidiose poderia ser, por exemplo, fazendo chegar às pessoas folhetos informativos do que é a doença, como pode ser contraída e o que pode e deve ser feito no plano individual para a evitar [MMWR-Morbidity and Mortality Weekly Report 44(RR-6), 1995; MMWR 46(RR-12) e 46(RR-10), 1997; WGWC, 1997].

Sumariamente, isto seria informar a população de que *Cryptosporidium* é um parasita que:

- embora não sendo visível a olho nu, pode estar presente na água e nos alimentos que ingerimos;
- quando ingerido, pode causar doença e pode pôr em risco a vida, das pessoas mais vulneráveis;
- não há ainda tratamento eficaz;
- pode ser evitada a infecção:
 - a) lavando os alimentos ingeridos crus;
 - b) lavando sempre as mãos antes de comer ou tocar nos alimentos crus;
 - c) evitar práticas sexuais de risco;
 - d) lavando sempre as mãos após tocar nos animais domésticos ou de quinta e antes de lhes preparar os alimentos, porque os animais também são potenciais hospedeiros e emissores do parasita, principalmente os que têm diarreia;
 - e) bebendo água apenas do fornecimento público ou engarrafada e, se isto não for possível, fervendo-a;
 - f) evitando engolir água quando nada ou toma banho em rios, lagos, charcos ou piscinas.

No âmbito institucional, além da consciencialização necessariamente comum à população em geral e aos responsáveis institucionais, será necessário mobilizar os responsáveis das instituições e proceder a:

- a) Diagnóstico da prevalência da criptosporidiose aos níveis local, regional e nacional;
- b) Diagnóstico da existência e funcionamento das instalações destinadas ao tratamento e abastecimento de água potável e da rede e instalações de tratamento dos esgotos;
- c) Definição de regras claras de mínimos de qualidade de funcionamento das instalações de captação, tratamento e abastecimento de água à população;
- d) Definição de regras claras de monitorização do funcionamento das instalações de captação, tratamento e abastecimento de água à população;
- e) Definição de regras claras e objectivas de penalização pelo não cumprimento das regras estabelecidas;
- f) Avaliação contínua das variações da prevalência da criptosporidiose aos níveis local, regional e nacional;
- g) Responsabilização civil e criminal das entidades operadoras da distribuição da água de consumo por danos atribuíveis à qualidade da água;
- h) Obrigatoriedade dos profissionais de saúde e dos laboratórios clínicos e de saúde pública da notificação da doença e da positividade de amostras a entidades de saúde pública competentes [MMWR 44(RR6), 1995; WGWC, 1997; DWI, 1998].

O diagnóstico e a avaliação contínua da prevalência da criptosporidiose na população humana poderão ser feitos submetendo a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* todas as amostras de fezes enviadas ao laboratório para exame parasitológico, posto que pessoas infectadas podem ser assintomáticas, ou, pelo menos, dos pacientes que sofram de diarreia [MMWR 46(RR-10), 1997].

O diagnóstico e a avaliação contínua do funcionamento das instalações destinadas ao tratamento e abastecimento de água potável deverá ser executado submetendo amostras de água dos aquíferos utilizados como fonte para fornecimento de água potável e, especialmente, amostras de água pós-tratamento nas estações com este fim, a exame analítico de pesquisa de oocistos, obedecendo a um plano preestabelecido explícito de utilização de métodos e técnicas de detecção e identificação padronizados (DWI, 1998; EPA, 1999).

Dado a contaminação cruzada entre a água dos esgotos e a água de consumo poder ser uma fonte de surtos de criptosporidiose (Dworkin *et al.*, 1996; Mayer e Palmer, 1996) é necessário monitorizar, pelo menos, os efluentes das ETARs (estações de tratamento de águas residuais) que, geralmente, são lançados nas linhas de água. É necessário avaliar a eficiência do processo de tratamento na remoção dos oocistos e prevenir a minimização do eventual papel do esgoto tratado como origem de contaminação oocística (Mayer e Palmer, 1996).

1.6 – Metodologia para detecção e identificação de oocistos em amostras hídricas

A metodologia para detecção e identificação de oocistos na água tem basicamente cinco etapas:

- I. colheita da amostra;
- II. concentração;
- III. purificação;
- IV. coloração;
- V. exame.

1.6.1 – Colheita da amostra hídrica

Dado os oocistos de *Cryptosporidium* ocorrerem geralmente em baixa concentração em águas ambientais (Hansen e Ongerth, 1991; Ong *et al.*, 1996; Smith, 1998), possuírem um número limiar potencial de infecciosidade extremamente baixo que, teoricamente, é de apenas 1 oocisto (Gibson, Haas e Rose, 1998; Fricker, 2000) e um tamanho diminuto de cerca de 5 μm (Smith e Rose, 1990; Fayer, Morgan e Upton, 2000; Oda *et al.*, 2000), a sua detecção e identificação implica a necessidade de colher e concentrar amostras de grandes volumes (Smith e Rose, 1990; Nieminski, Schaefer e Ongerth, 1995; Swalles e Wright, 2000).

Um dos critérios determinantes do volume da amostra a colher assenta na quantidade de material particulado presente na água, isto é da turvação. Tipicamente, o volume das amostras a analisar em águas de consumo alimentar e nas destinadas ao tratamento para este fim varia entre os 10 e os 1000 litros (Fricker, 2000).

Se o que se pretende analisar é um meio aquoso com elevada turvação como, por exemplo, a água residual de um esgoto, o volume das amostras poderá variar de cerca de 200 mL (Wallis *et al.*, 1996) a 1 litro (Mayer e Palmer, 1996) se a origem da amostra é afluyente, isto é, a montante da ETAR (estação de tratamento de águas residuais); se a amostra provém

da água efluente, isto é, a jusante da ETAR, o volume poderá ser de cerca de 15 litros (Mayer e Palmer, 1996).

Quando o volume desejado para análise é menor, as amostras podem ser tomadas no local de colheita e transportadas para o laboratório, onde é continuado o processo analítico (Hansen e Ongerth, 1991; Mayer e Palmer, 1996; EPA, 1999). Quando o volume das amostras a analisar é grande, são, no local de colheita, passadas através de um filtro e este é conduzido ao laboratório para continuação do processo analítico (Smith e Rose, 1990; Nieminski, Schaefer e Ongerth, 1995; Shepherd e Wyn-Jones, 1996; Ong *et al.*, 1996; DWI, 1998; Swales e Wright, 2000).

1.6.2 – Concentração dos oocistos

A concentração dos oocistos das amostras aquáticas é, basicamente, obtida pela filtração ou pela floculação. Usualmente, a concentração das amostras de grandes volumes (superiores a 100 litros) é obtida por passagem de um fluxo da água a analisar, a pressão controlada, durante um tempo determinado, através de um filtro em cartucho de polipropileno (LeChevallier, Norton e Lee, 1991b; Nieminski, Schaefer e Ongerth, 1995; Shepherd e Wyn-Jones, 1996; Wallis *et al.*, 1996; Swales e Wright, 2000; Hsu *et al.*, 2001; Monis e Saint, 2001). Em amostras de volumes menores é usado o filtro em membrana plana de base celulósica (Smith, 1998) ou de policarbonato (Ong *et al.*, 1996; Shepherd e Wyn-Jones, 1996) e é também usada a floculação por carbonato de cálcio (Shepherd e Wyn-Jones, 1996; Stinear *et al.*, 1996; Fayer, Morgan e Upton, 2000; Fricker, 2000).

Modernamente, é referida a concentração por centrifugação de fluxo contínuo (Fayer, Morgan e Upton, 2000; Swales e Wright, 2000) e filtração de fluxo contínuo (Oda *et al.*, 2000).

A centrifugação de fluxo contínuo foi usada por Swales e Wright (2000) para concentrar oocistos de amostras de 100 litros e comparar este método com o de filtração por cartucho de 1 µm de poro. Estes investigadores encontraram uma maior eficiência na detecção de oocistos pela centrifugação de fluxo contínuo comparativamente à filtração por filtro em cartucho.

Outro método de concentração, a filtração por fluxo contínuo selectiva do tamanho, baseia-se na passagem de um volume de água em duas filtrações consecutivas, por dois filtros de tamanhos diferentes. O tamanho de poro do filtro da primeira filtração é de modo a sustentar as partículas de maiores dimensões, indesejáveis e que dificultam a detecção dos oocistos. O tamanho de poro do filtro da segunda filtração é o conveniente para reter os oocistos mas deixar passar as partículas de menores dimensões, indesejáveis que dificultam a visualização dos oocistos (Oda *et al.*, 2000).

Segundo Oda *et al.* (2000), o método de concentração por filtração de fluxo contínuo selectivo de tamanho, aplicado na recuperação de oocistos em água potável, apresenta uma eficiência que varia entre os 77,2% e os 85,0%, quando o par de filtros é de 8 μm e 3 μm e um enriquecimento da amostra de apenas 110 oocistos por 20 litros de água.

Este método, segundo Oda *et al.* (2000), tem uma eficiência superior a outros e tem um custo por filtração por amostra de cerca 20 vezes menor, como, por exemplo, o Método 1622 da EPA que usa um filtro cápsula e um sistema de captura imunomagnética. Este poderá ser um método de eleição se for demonstrado ser eficiente em amostras de água com variados coeficientes de turvação, o que não é feito por Oda *et al.*.

1.6.3 – Purificação dos oocistos

Dado as técnicas de concentração dos oocistos nas amostras de água serem baseadas no tamanho das partículas, conseqüentemente uma grande quantidade de partículas estranhas são co-concentradas, pelo que é necessário um método de purificação que separe os oocistos daquelas partículas, na maior parte das amostras (Fricker, 2000).

A metodologia usada para a purificação tem sido a flutuação dos oocistos numa solução de gravidade específica mais elevada (1,1–1,2), através da qual passam as partículas mais densas que vão sedimentar no fundo do tubo (LeChevallier *et al.*, 1991b; LeChevallier *et al.*, 1995; Wagner-Wiening e Kimmig, 1995; Johnson *et al.*, 1995; Ong *et al.*, 1996; Fricker e Clancy, 1998; Smith, 1998; Robertson *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2001). As soluções

correntemente usadas incluem a sacarose, citrato de potássio e a sacarose de Percoll (Smith, 1998).

Após centrifugação, a camada superior e uma porção abaixo da interface, cerca de $\frac{1}{4}$ da suspensão, são colhidas, diluídas com um fluido de diluição e centrifugadas. O sobrenadante é aspirado e rejeitado até um determinado volume restante. O sedimento é ressuspenso e alíquotas desta última suspensão são posteriormente submetidas a coloração (LeChevallier *et al.*, 1991b; LeChevallier *et al.* 1995; Hsu *et al.*, 2001).

Abordagens metodológicas baseadas em **princípios imunológicos**, visando a separação dos oocistos de partículas contaminantes, incluem a citometria de fluxo (Smith, 1998; Fricker e Clancy, 1998; Fricker, 2000) e a **separação imunomagnética** (Fayer, Morgan e Upton, 2000).

A aplicação da citometria de fluxo, na separação dos oocistos das partículas contaminantes numa amostra de água, baseia-se na reacção dos epitopos expostos na superfície dos oocistos, suspensos num concentrado numa amostra, com um anticorpo monoclonal género-específico marcado pelo isotiocianato de fluoresceína (Smith, 1998).

As partículas fluorescentes, de tamanho, forma e intensidade fluorescente definidos, são separadas das partículas contaminantes, passando o concentrado por um dispositivo separador de células activadas pela fluorescência (FACS – fluorescence activated cell sorting). As partículas separadas são depositadas em lâminas de microscopia para serem visualizadas em epifluorescência, para confirmar a presença de oocistos (Fricker e Clancy, 1998; Smith, 1998).

A citometria de fluxo com separação celular por activação fluorescente é consideravelmente mais fiável que o método de purificação baseado na gravidade específica mas é mais moroso, requer operadores altamente habilitados e equipamento dispendioso. Contudo, esta técnica foi adoptada para exame de rotina de amostras de água por muitas empresas de água do Reino Unido e tem-se tornado largamente usada na Austrália, mas o seu uso está agora a declinar devido ao desenvolvimento da separação imunomagnética (Fricker, 2000).

A **separação imunomagnética** (IMS – immunomagnetic separation) também assenta na reacção dos epitopos, expostos na superfície dos oocistos, com paratopos de anticorpos monoclonais género-específicos. Os anticorpos estão ligados covalentemente à superfície de partículas esféricas magnetizáveis (Smith, 1998).

A ligação dos oocistos num concentrado de amostra de água, às partículas magnetizáveis cobertas com anticorpos monoclonais género-específicos, dá-se por mistura contínua do concentrado com as partículas paramagnéticas (Smith, 1998; Fricker, 2000). A mistura contínua favorece as colisões entre os epitopos expostos à superfície dos oocistos e os paratopos dos anticorpos monoclonais ligados às partículas esféricas magnetizáveis (Smith, 1998).

Os complexos esferas-anticorpos-oocistos são separados dos restantes materiais estranhos contaminantes em suspensão pela aplicação de um campo magnético no lado exterior do tubo contentor da suspensão mistura (Bukhari *et al.*, 1998; Smith, 1998). Os complexos, assim magnetizados, são atraídos e fixados na zona interior do tubo adjacente ao magnete. Esta técnica permite, por aspiração (Smith, 1998) ou por decantação (DWI, 1998; EPA, 1999), descartar o conteúdo sobrenadante e reter os complexos.

O tratamento com ácido clorídrico (HCl) gera a quebra das ligações anticorpo/oocisto, conduz à dissociação dos complexos e liberta os oocistos das esferas paramagnéticas (Fricker, 2000). Para retirar as esferas paramagnéticas, a suspensão amostra é submetida novamente a um campo magnético, permanecendo os oocistos na suspensão para sequente coloração (Bukhari *et al.*, 1998; DWI, 1998; EPA, 1999).

1.6.4 – Coloração dos oocistos

A coloração dos oocistos de origem aquática é feita com anticorpos monoclonais género específicos marcados pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e pelo corante fluorogénico 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Bukhari *et al.*, 1998; DWI, 1998; Smith, 1998; EPA, 1999; Fricker, 2000).

1.6.5 – Exame da amostra

A visualização dos oocistos é feita em microscopia de epifluorescência e de contraste de fase. A coloração pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC) é visualizada com filtro de excitação de 450 a 490 nm, espelho dicróico divisor do feixe de 510 nm e filtro de barreira ou de supressão de 515 a 520 nm (EPA, 1999). A coloração pelo DAPI é visualizada com filtro de excitação UV de 340 a 380 nm, espelho dicróico divisor do feixe de 400 nm e filtro de barreira ou de supressão de 420 nm (EPA, 1999).

Os oocistos corados pelo FITC apresentam-se como objectos esféricos ou ligeiramente ovoides com um diâmetro de 4 a 6 μm com uma fluorescência verde maçã brilhando mais intensamente na periferia (DWI, 1998; EPA, 1999; Fricker, 2000).

Dado os anticorpos disponíveis não serem espécie específicos reagirão com a maior parte das espécies de *Cryptosporidium*, e podem também reagir inespecificamente com outras partículas por reacção cruzada (Fricker, 2000). Por esta razão, quando em epifluorescência são visualizados objectos com as características do parágrafo anterior, devem tais objectos ser observados usando o bloco filtro de UV para confirmação, pelo 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), de que são oocistos do género *Cryptosporidium*, não nos permitindo, contudo, determinar a espécie (Bukhari *et al.*, 1998; DWI, 1998; EPA, 1999).

Pelo DAPI, corante vital fluorescente (Robertson, Campbell e Smith, 1992) que cora os ácidos nucleicos (Fricker, 2000), os objectos visualizados, para serem considerados oocistos, devem exibir uma das seguintes características:

- Até quatro núcleos azul céu distintos, dentro de um único oocisto;
- Coloração azul intensa interna, com núcleo aparente;
- Leve coloração azul interna, sem núcleo distinto (DWI, 1998; EPA, 1999).

Devido ao DAPI não ser um corante ácido nucleico específico e corar outros organismos, como algas e esporos, ou organelos, como cloroplastos (EPA, 1999; Fricker,

2000), se forem observadas características morfológicas atípicas, deve ser usada microscopia de contraste de fase para confirmação (DWI, 1998). Pela microscopia de contraste de fase deve-se procurar visualizar estruturas internas típicas dos oocistos tais como até quatro esporozoítos e corpo residual citoplasmático refráctil, dentro de uma parede lisa intacta (DWI, 1998).

Bukhari *et al.* (1998), em resultado de uma investigação para comparação entre *kits* de IMS de diferentes referências comerciais, sobre a eficiência de recuperação de oocistos de *C. parvum* a três níveis de turvação (50, 500 e 5000 unidades nefelométricas) em amostras de água obtidas de diferentes localizações geográficas, referem um rendimento de recuperação entre 68 e 83% em amostras até 500 unidades nefelométricas e superior a 35% a 5000 unidades nefelométricas, quando usado o *kit* DB (Dynabeads anti-*Cryptosporidium*) da Dynal.

Entre outras metodologias de detecção dos oocistos em amostras de água contam-se as técnicas moleculares mediadas pela PCR (polymerase chain reaction). A PCR assenta na acção catalisadora da polimerase na elongação de cadeias (Weil, 1983) ou de segmentos catenários (Johnson *et al.*, 1995) polidesoxirribonucleotídicos ou polirribonucleotídicos no caso da PCR-RT (reverse transcription – transcrição inversa) específicos, na presença de *primers* (iniciadores) específicos (Stinear *et al.*, 1996).

A PCR é uma técnica analítica muito potente e sensível, com aplicação em campos muito diversos, incluindo a biologia molecular, o diagnóstico clínico, a análise forense e a genética populacional (Tsai e Olson, 1992). Devido a que, geralmente, baixos números de oocistos são encontrados em amostras ambientais, a sua detecção requer um teste com alta sensibilidade e alta especificidade como a PCR (Wagner-Wiening e Kimming, 1995; Mayer e Palmer, 1996; Leng, Mosier e Oberst, 1996; Morgan *et al.*, 1998b; Morgan *et al.*, 1999; Monis e Saint, 2000).

1.7 – Objectivos deste trabalho

1 – Avaliar a eficiência de métodos convencionais usados correntemente na detecção, identificação e quantificação dos oocistos nas fezes, usando as colorações **safranina-azul de metileno**, **coloração de Heine** e **acid-fast modificada por Kinyoun**, quando aplicados com as mesmas finalidades em amostras de água, após aplicação de metodologia de concentração.

2 – Avaliar a eficiência da metodologia englobante de técnicas que usam a filtração por filtro-cápsula para a concentração de amostras de água, a separação imunomagnética para purificação de oocistos e a imunofluorescência para coloração na detecção, identificação e quantificação de oocistos na água no meio ambiental.

3 – Pesquisar, identificar e quantificar a eventual presença de oocistos de *C. parvum* na água de consumo público.

2 - Material e Métodos

2.1 – Oocistos usados no estudo

Os oocistos usados neste estudo foram obtidos de amostra fecal de um bovino infectado, gentilmente cedidos para este estudo pela Doutora Mercedes Menzo, directora do laboratório de parasitologia do Centro de Investigações Agrárias de Mabegondo, Corunha, Galiza, Espanha ao Professor Doutor José Manuel Correia da Costa, chefe do laboratório de parasitologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), delegação do Porto. Foram recebidos em tubo de microcentrifuga, concentrados, purificados e mantidos em suspensão.

A suspensão oocística, constituída de tampão fosfato salino PBS (phosphate buffered saline) 0,04 M, pH 7,2, com igual volume de $K_2Cr_2O_7$ (dicromato de potássio) a 5% como conservante, com adição de 2.000 U.I./mL de penicilina e 10 mg/mL de gentamicina para evitar a contaminação bacteriana, era referida ter uma concentração de $90,0 \times 10^6$ oocistos por mL.

Esta suspensão foi mantida em tubo de microcentrifuga em frigorífico a 4°C e constituiu a nossa suspensão *stock*.

2.2 - Cálculo da concentração dos oocistos da suspensão *stock*

Após agitação por vórtice (*vortex*) durante 2 minutos e três sequentes inversões do tubo contentor da suspensão *stock*, usando uma pipeta semiautomática, retiraram-se 6 alíquotas de 10 μ L desta suspensão. Cada alíquota foi diluída em 2,5 mL de água destilada com Tween-20 a 0,01% num tubo cónico de centrifuga de 15 mL de estireno polibutadieno e com rolha bujão de enroscar de polietileno de alta densidade (PBS/HDPE).

O tubo da suspensão *stock* foi sempre agitado por inversão imediatamente antes da toma de cada alíquota. A diluição de 1/250 teve por finalidade a condução a uma suspensão com uma concentração de 20 a 50 oocistos por quadrado de 1 mm² do hemacitómetro (câmara de contagem de Neubauer) (EPA, 1999).

De cada uma das novas suspensões, após agitação por *vortex* durante 1 minuto, foi enchida uma câmara de hemacitómetro por cada suspensão, a que foi previamente aplicada uma lamela de 20 x 26 mm. Após o enchimento, o hemacitómetro foi deixado permanecer durante 2 minutos sem agitação para sedimentação dos oocistos .

Os oocistos foram enumerados em microscópio óptico com lente objectiva de 40x e ocular de 10x, o que dava uma ampliação total de 400x. Contaram-se os objectos obscuros redondos ou ligeiramente ovalados com um diâmetro de 4 a 6 µm dos quatro quadrados de 1 mm² divididos em dezasseis quadrados situados nos quatro cantos do reticulado da câmara de contagem, esquematizada na figura 2.1.

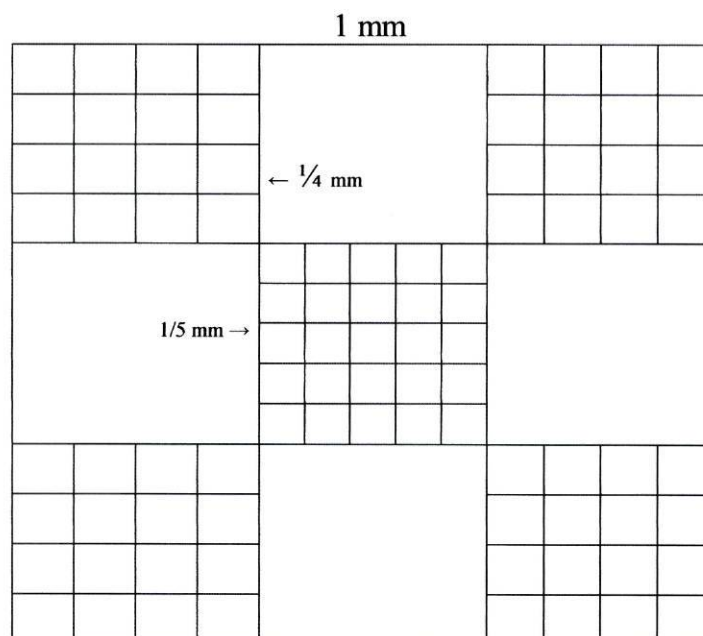


Figura 2.1. Esquema representativo de uma câmara de contagem de Neubauer ou hemacitómetro. Os oocistos são contados nos quatro quadrados de 1 mm de lado divididos em dezasseis quadrados mais pequenos de 1/4 mm de lado. Fonte: EPA, 1999.

Para determinar o número de oocistos por mL de cada suspensão, utilizando a câmara de contagem, foi usada a seguinte equação:

$$\frac{n.^{\circ} \text{ de organismos contados}}{n.^{\circ} \text{ de mm}^2 \text{ contados}} \times \frac{10}{1 \text{ mm}} \times \frac{\text{factor diluidor}}{1} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}} = n.^{\circ} \text{ de organismos / mL}$$

em que todos os factores são explícitos excepto o segundo do primeiro membro que se deve a que a altura entre a lamela e a base da câmara é de apenas 0,1 mm, daqui a multiplicação por 10 para obter um valor correspondente a um volume de 1 mm³ (Moura *et al.*, 1982; EPA, 1999). O valor da concentração da suspensão *stock* foi calculado, pela média das contagens

2.3 – Lavagem e concentração de oocistos por centrifugação e por filtração, para coloração por técnicas usualmente empregues em amostras fecais

2.3.1 – Lavagem dos oocistos:

- Introdução de 10 µL da suspensão *stock* num tubo de centrífuga de 15 mL PBS/HDPE contendo 4,5 mL de PBS 150 mM, pH 7,2 (solução em 800 mL de água destilada de 1,07 g de NaHPO₄ + 0,39 g de NaH₂PO₄.2H₂O + 8,5 g NaCl, ajustado o volume para 1 litro com água destilada e o pH para 7,2 com NaOH ou HCl) com Tween-20 a 0,01% (PBS-T);
- Centrifugação por 15 minutos a 1100 g[∞];
- Aspiração do sobrenadante por meio de bomba de aspiração hidráulica, até cerca de 0,5 cm do fundo do tubo para evitar aspirar oocistos;
- Ressuspensão do sedimento em 4,5 mL de PBS-T por agitação em *vortex* e repetição duas vezes dos passos *b.*, *c.* e *d.*;
- Retirados 10 µL da última suspensão de 4,5 mL e adicionados a 1 mL de PBS-T contidos num tubo de microcentrífuga.

[∞] g = [118 x 10⁻⁷ x r x n²], em que *r* é o comprimento do braço da centrífuga em cm e *n* é o número de rotações por minuto (r. p. m.). 1100 G corresponde aproximadamente a 2500 r.p.m. numa centrífuga com um braço de 15 cm.

As operações de lavagem e diluição atrás descritas foram igualmente processadas usando água destilada em substituição da solução PBS-T. Assim, passámos a dispor de quatro suspensões diluídas a partir da suspensão *stock*: duas em água destilada (uma de 20×10^4 e outra de 20×10^2 oocistos/mL) e duas em PBS-T (uma de 20×10^4 e outra de 20×10^2 oocistos/mL).

2.3.2 – Filtração em rampa por pressão negativa

10 μ L da suspensão *stock* foram diluídos em 4,5 mL de PBS-T (Robertson, 2000) contidos em tubo de 15 mL PBS/HDPE. Após homogenização por agitação em *vortex* 1 minuto, desta última suspensão tomaram-se quatro alíquotas de 10 μ L, e adicionou-se cada uma a um matraz contendo 500 mL de água destilada. Obtivemos, portanto, quatro amostras de água contendo cada uma 20×10^2 oocistos.

Homogenizaram-se cuidadosamente as amostras, por inversões contínuas durante 30 segundos, após a inoculação e imediatamente antes da filtração. Após a homogenização, as suspensões foram passadas através de filtros em membrana (Pall Gelman) de ésteres de celulose de 0,45 μ m de poro a uma pressão negativa de 0,7 bar em rampa de filtração (Milipore). Cada matraz foi enxaguado com 100 mL de água destilada que foi também passada pelo filtro.

A eluição dos oocistos capturados pelos filtros foi feita por dois métodos: agitação por oscilação plana horizontal circular e sonicação (Oda *et al.*, 2000).

Dois filtros foram colocados singularmente dentro de copos de vidro, contendo um 25 mL de PBS-T e o outro 25 mL de água destilada, e postos 15 minutos a agitar sobre um agitador (GFL 3005) de oscilação plana circular. Os outros dois filtros foram introduzidos, também singularmente, em tubos de 50 mL PBS/HDPE, contendo um 25 mL de PBS-T e o outro 25 mL de água destilada, e postos a sonicar em banho-maria a 37°C, 15 minutos, num homogenizador ultra sónico (Sonarex RK 100H).

Cada processo de eluição foi decorrido duas vezes. O produto da eluição de cada um dos filtros foi recolhido separadamente em tubos de 50 mL PBS/HDPE que foram centrifugados a 1100 g.

A seguir, o sobrenadante foi aspirado até de cerca de 0,5 cm do fundo do tubo.

O produto de eluição de cada um dos filtros do segundo curso de eluição foi adicionado ao sedimento do primeiro curso e repetidas a centrifugação e a aspiração do sobrenadante até um volume de aproximadamente 500 μ L.

Obtiveram-se, portanto, quatro sedimentos com concentração esperada de aproximadamente 40×10^2 oocistos por mL.

2.4 – Esfregaços para coloração por técnicas usualmente aplicadas em amostras fecais

Nestes esfregaços foram utilizadas lâminas de microscopia multialveolares de 10 alvéolos com e sem tratamento prévio. As lâminas com tratamento prévio foram pré tratadas com o amino alquilsilano APES (3-aminopropiltriétoxissilano) segundo o protocolo do fabricante, a Sigma. O APES, reagindo com os grupos Si-OH no vidro, forma uma superfície viscosa, promovendo, assim, o aumento de aderência de secções tecidulares ou de células.

Quatro alíquotas de 10 μ L de cada uma das suspensões resultantes das técnicas de purificação e concentração atrás mencionadas e da suspensão *stock* foram depositadas em alvéolos de lâminas multialveolares com e sem tratamento prévio, após o que foram postas a secar em estufa a 56°C durante cerca de 30 minutos.

Seguidamente, as lâminas foram coradas por uma das três colorações abaixo mencionadas.

2.5 – Técnicas de coloração usualmente empregadas em amostras fecais

2.5.1 – Safranina-azul de metileno

(Baxby, Blundell e Hart, 1984)

Reagentes:

- a. Alcool-ácido (mistura de 3 mL de HCl em 97 mL de metanol absoluto) – fixador;
- b. Safranina aquosa a 1% – corante;
- c. Azul de metileno a 1% – corante de contraste.

Operações da coloração, por ordem de execução:

- I. Passagem da lâmina pela chama do bico de Bunsen, para fixação breve;
- II. Imersão na solução alcool-ácido, numa tina com estrias internas laterais para manter a lâmina na posição vertical, durante 4 minutos;
- III. Lavagem com água destilada;
- IV. Cobertura da lâmina com safranina aquosa 1% e aquecimento até ocorrência de fervura, adicionando mais safranina quando necessário para manter sempre toda a lâmina coberta, durante 1 minuto;
- V. Lavagem com água destilada;
- VI. Cobertura da lâmina com azul de metileno 1%, durante 30 segundos;
- VII. Lavagem com água destilada, enxugamento com papel de filtro da água remanescente para secagem rápida ao ar à temperatura ambiente;
- VIII. Aplicação de líquido de montagem (glicerina tamponada) e cobertura com lamela para visualização por microscopia óptica.

2.5.2 – Coloração de Heine

(usada no INSA do Porto)

Reagentes:

- a. Fuchsin – corante;

- b. Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2% (v/v) – descorante;
- c. Verde malaquite 5% – corante de contraste.

Operações da coloração, por ordem de execução:

- I. Cobertura da lâmina com fuchsin, durante 2 minutos;
- II. Lavagem com água destilada;
- III. Imersão em H₂SO₄ 2%, numa tina com estrias internas laterais para manter a lâmina na posição vertical;
- IV. Lavagem com água destilada;
- V. Cobertura da lâmina com verde malaquite 5%, durante 30 segundos;
- VI. Lavagem apurada com água destilada e deixada secar ao ar à temperatura ambiente;
- VII. Aplicação de líquido de montagem (glicerina tamponada) e cobertura com lamela para visualização por microscopia óptica.

2.5.3 – Coloração acid-fast (*modificada por Kinyoun*) (CDC, 1999)

Reagentes:

- a. Metanol absoluto – fixador;
- b. Fuchsin carbólica de Kinyoun – corante;
- c. Mistura álcool-ácida (10% de ácido sulfúrico e 90% de metanol absoluto) – descorante;
- d. Verde malaquite a 3% (3g em 100 mL de água) – corante de contraste.

Operações da coloração, por ordem de execução:

- I. Cobertura da lâmina com metanol absoluto, durante 30 segundos;
- II. Escorrência do metanol remanescente;
- III. Cobertura com fuchsin carbólica, durante 1 minuto;
- IV. Lavagem breve com água destilada e escorrência;
- V. Imersão da lâmina em álcool-ácido, numa tina com estrias internas laterais para manter a lâmina na posição vertical, durante 2 minutos;

- VI. Lavagem com água destilada e escorrência;
- VII. Cobertura com verde malaquite, durante 2 minutos;
- VIII. Lavagem breve com água destilada e escorrência e secagem em estufa a 60°C durante cerca de 5 minutos;
- IX. Aplicação de líquido de montagem (glicerina tamponada) e cobertura com lamela para visualização por microscopia óptica.

2.6 – Separação Imunomagnética e coloração por imunofluorescência

A execução desta metodologia seguiu basicamente o delineado no «Method 1622: *Cryptosporidium* in Water by Filtration / IMS / FA», estabelecido pela Environmental Protection Agency (EPA) nos Estados Unidos, em 1999, e no protocolo padrão de operação para a monitorização de oocistos de *Cryptosporidium* na água tratada fornecida para consumo, estabelecido pela Drinking Water Inspectorate (DWI) no Reino Unido, em 1998.

2.6.1 – Avaliação da concentração da suspensão de trabalho por imunofluorescência

2.6.1.1 – Suspensões para enriquecimento de amostras de água

Da suspensão *stock* de oocistos de *C. parvum*, após agitação por *vortex* durante 2 minutos e inversão do tubo por três vezes, retiraram-se 20 µL que foram diluídos em 2 mL de Tween 20, 0,01 % (1,0 mL de Tween 20 a 10% por litro de água), criando uma suspensão de concentração esperada de 90×10^4 oocistos/mL.

Da suspensão de 90×10^4 oocistos/mL, depois de agitar como atrás referido, retiraram-se 20 µL e diluíram-se em 2 mL de Tween 20, 0,01% (T-0,01) obtendo-se uma nova suspensão, de 90×10^2 oocistos/mL.

Desta última suspensão, de 90×10^2 oocistos/mL, após agitação como já definido, pipetaram-se 200 µL e diluíram-se em 400 µL de T-0,01 obtendo-se uma suspensão de 30×10^2 oocistos/mL.

Estas duas suspensões, de 90×10^2 e 30×10^2 oocistos/mL, foram usadas no nosso estudo como suspensões de trabalho para enriquecimento de amostras de água para coloração por imunofluorescência (EPA, 1999).

2.6.1.2 – Esfregaços

Da suspensão de trabalho de 90×10^2 oocistos/mL, após agitação por *vortex* durante 2 minutos e inversão do tubo por três vezes, no alvéolo de cada uma de 9 lâminas monoalveolares depuseram-se alíquotas de 10 μ L, rolando e invertendo sempre três vezes o tubo contendor da suspensão de trabalho antes da toma da alíquota subsequente. No alvéolo de uma lâmina restante colocaram-se 75 μ L de T-0,01, como controlo negativo.

As lâminas foram postas 2 horas numa estufa a 42°C, para evaporação e completa secagem.

Após a secagem, aplicaram-se 50 μ L de metanol absoluto a cada alvéolo e deixaram-se as lâminas ao ar até o metanol ter evaporado (cerca de 4 minutos).

2.6.1.3 – Coloração dos esfregaços através de anticorpos monoclonais marcados com fluoresceína

Em cada alvéolo de cada lâmina dos esfregaços amostras, na lâmina de controlo negativo e na do controlo positivo (fornecida com o *kit* CRYPTO-CELL IF TEST, com uma suspensão de oocistos de *Cryptosporidium* fixada, não corada) depuseram-se 25 μ L de reagente corante (solução tamponada e estabilizada de anticorpos monoclonais marcados pela fluoresceína, com azul de Evans como corante de contraste e azida sódica como preservante).

Seguidamente, as lâminas foram postas a incubar em câmara húmida (caixa de plástico fechada contendo as lâminas e toalhetes de papel embebidos em água) a 37°C durante 30 minutos.

Após a incubação, o excesso de reagente foi aspirado dos alvéolos (amostras e controlo positivo) e estes foram lavados com PBS e água. A aspiração fez-se por meio de uma ponta de pipeta na extremidade de um tubo de borracha ligado a uma bomba hidráulica de aspiração (trompa de vácuo), usando um fluxo de água reduzido e tendo o cuidado de não arranhar a superfície do esfregaço para evitar o arrastamento dos oocistos.

A lavagem fez-se pela deposição e aspiração em cada alvéolo de 75 µL de líquido de lavagem. Primeiro, três vezes com PBS e, a seguir, uma vez com água destilada. Após cada deposição de líquido de lavagem, aguardaram-se 2 minutos e aspirou-se o excedente, como atrás indicado.

As lâminas foram, de imediato, colocadas 10 minutos em lugar seco, no escuro, numa estufa a 37°C, para secagem completa.

Após a secagem, sobre cada alvéolo aplicaram-se 10 µL do meio de montagem, fornecido para o efeito juntamente com o *kit* e colocou-se uma lamela, exercendo uma leve pressão, tendo o cuidado de remover todas as bolhas de ar.

2.6.1.4 – Exame microscópico de fluorescência

As lâminas foram examinadas em microscopia de fluorescência num microscópio Nikon Optiphot EFD-3, usando um filtro de excitação 450-490 nm, um espelho dicróico separador do feixe de luz de 505 nm e um filtro barreira ou de supressão de 520 nm.

No exame microscópico, visualizaram-se primeiro os controlos positivo e negativo e depois os restantes esfregaços estudo. Procuraram-se objectos com fluorescência verde maçã, esféricos ou ovais, com diâmetro de 4 a 6 µm, semelhantes aos visualizados no esfregaço controlo positivo fornecido com o *kit* Crypto-Cell If Test (EPA, 1999; DWI, 1999).

2.6.1.5 – Medição dos oocistos

A medição dos oocistos foi conseguida pela sua visualização através de uma lente ocular micrométrica, depois de ter sido calibrada com o auxílio de um micrómetro.

Colocou-se uma lente ocular micrométrica (lente ocular contendo gravado um segmento de linha dividido em 100 partes iguais por pequenos segmentos de linha perpendiculares, com espaços numerados de 1 a 10 e contendo cada um destes espaços 10 partes).

Seguidamente, colocou-se, na platina do microscópio, um micrómetro (lâmina de microscopia com um pequeno círculo central onde está contido um segmento de uma linha de 1 mm de comprimento dividido em 100 partes iguais de 0,01 mm por pequenos segmentos de linha perpendiculares).

Focou-se o micrómetro da platina e ajustou-se o segmento de linha 0 (zero) do micrómetro ocular com o segmento de linha perpendicular 0 (zero) do micrómetro da platina, de modo a estes dois segmentos ficarem exactamente sobrepostos.

Sem alterar o ajustamento, encontrou-se um ponto, tão distante quanto possível dos dois segmentos de linha perpendiculares zero sobrepostos, onde dois outros segmentos de linha perpendiculares estivessem exactamente sobrepostos.

Determinou-se o número de divisões no micrómetro ocular e o número de divisões no micrómetro da platina entre os dois pontos de sobreposição. Esta operação foi executada com cada uma das lentes objectivas (10X, 20X, 40X e 100X) colocadas no microscópio.

O número, em μm , correspondente a uma divisão do micrómetro ocular, foi encontrado pela relação entre o número de divisões no micrómetro da platina e o número de divisões no micrómetro da ocular, determinados entre os dois pontos de sobreposição. Como

cada divisão do micrómetro da platina mede 0,01 mm, ou seja 10 µm, aquela relação pode traduzir-se na equação seguinte:

$$\frac{\text{número de divisões no micrómetro da platina} \times 10}{\text{número de divisões no micrómetro da ocular}} = \frac{\text{número de } \mu\text{m}}{\text{divisão da ocular}}$$

Assim, quando observamos um objecto num esfregaço, basta contar o número de divisões do micrómetro ocular ocupadas pelo objecto e multiplicar pelo coeficiente encontrado correspondente à lente objectiva com que estamos a observar, para obtermos o valor da medição do objecto em µm (EPA, 1999).

2.7 – Enriquecimento de amostras de água com oocistos

Usando cinco balões de vidro, colocou-se em cada um uma barra magnética esterilizada para agitação. Em três dos balões introduziram-se 5 litros de água destilada em cada. Nos dois restantes introduziram-se 5 litros de água de consumo da torneira.

Cada balão foi posto sobre uma placa de um agitador magnético ligado à corrente eléctrica, levando a que a agitação da barra produzisse um vórtice na água contida no balão.

Da suspensão de trabalho ou de enriquecimento de amostras de 90×10^2 oocistos/mL, após agitação por *vortex* e inversão três vezes do tubo, usando uma pipeta semi-automática, foram tomados 10 µL, contendo aproximadamente 90 oocistos, e transferidos para cada um de quatro balões, dois de água destilada e dois de água da torneira.

A amostra de água destilada do quinto balão foi enriquecida com 10 µL da suspensão de trabalho com concentração de 30×10^2 , contendo aproximadamente 30 oocistos.

Antes da toma de cada alíquota de suspensão de oocistos, cada ponta da pipeta foi passada uma vez por T-0,01 e enchida e esvaziada cinco vezes com a suspensão de enriquecimento. Usou-se uma ponta de pipeta para cada toma de suspensão oocística.

A introdução das alíquotas da suspensão de enriquecimento nos balões foi feita abaixo da superfície da água (EPA, 1999). As amostras de água enriquecidas foram deixadas a agitar para homogenizar até à sua filtração, pelo menos 1 minuto.

2.8 – Tratamento das amostras de água usando um filtro-cápsula

2.8.1 – Filtração de amostras de água através de filtro-cápsula

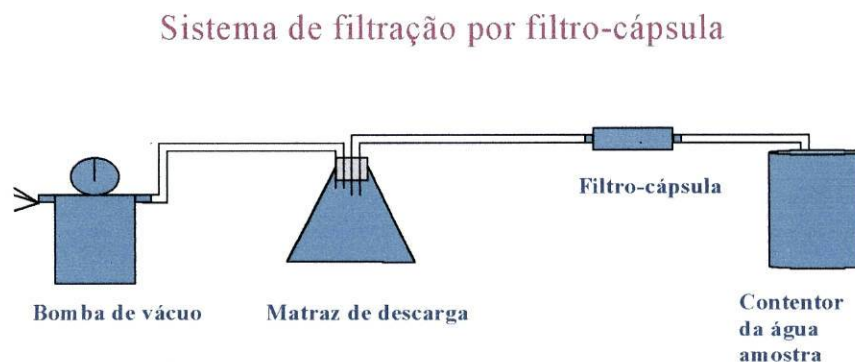
Neste método, a filtração de cada amostra de água foi obtida fazendo-a passar através de um filtro contido numa cápsula (EnvirochekTM 1210, Pall Gelman Laboratory), com o auxílio de uma bomba de vácuo, um matraz de descarga, três secções de um tubo de borracha e uma pipeta de Pasteur de vidro.

Numa ponta da primeira secção do tubo de borracha, com cerca de 8 mm de diâmetro, colocou-se uma pipeta de Pasteur de vidro estéril, para captar a nossa amostra, sendo a outra ponta desta secção do tubo de borracha ligada ao dispositivo de entrada da cápsula-filtro, depois de retirada desta a tampa.

A segunda secção do tubo de borracha ligou a cápsula-filtro pelo dispositivo de saída, depois de retirada a tampa, a um dos dois tubos que atravessam a rolha do matraz de descarga.

A terceira secção de tubo de borracha ligou o matraz de descarga, pelo outro tubo que atravessa a rolha, à bomba de vácuo (GAST, DOA-P104-BN, MFG Corp. Harbor, U.S.A.).

O sistema descrito pode ser observado na figura 2.2, na página seguinte.



25

Figura 2.2. Esquema representativo do sistema de filtração, por nós montado e usado na execução da filtração por filtro-cápsula.

Este sistema, excepto o filtro-cápsula, foi previamente por nós testado e ajustado, regulando a velocidade da bomba de vácuo para um fluxo de aproximadamente 2 litros de água destilada por minuto, conforme as instruções do fabricante do filtro-cápsula. A utilização da água destilada para ajustamento do fluxo teve também a finalidade de lavar o tubo de captação da amostra.

Filtraram-se por filtro-cápsula sete amostras de água, usando um filtro para cada amostra. Quatro amostras de 5 litros de água destilada enriquecidas cada uma com 10 μ L da suspensão de trabalho mais concentrada, de 90×10^2 oocistos/mL. Uma amostra de 5 litros de água destilada enriquecida com 10 μ L da suspensão de trabalho menos concentrada, de 30×10^2 oocistos/mL. Duas amostras de 10 litros de água de consumo colhidas de torneiras da bancada, sem enriquecimento de oocistos.

As duas amostras de água de consumo não enriquecidas com oocistos foram colhidas uma no Departamento de Parasitologia, outra na sede, do INSA do Porto

Com cada amostra de água procedeu-se do seguinte modo:

1. Com a bomba de vácuo desligada, introduziu-se, cerca de 2 cm, a ponta livre da pipeta de Pasteur na amostra de água contida no balão a agitar sobre o prato do agitador magnético;
2. Ligou-se a bomba de vácuo e aspirou-se toda a amostra, fazendo-a passar através do filtro, acompanhando sempre a descida do nível da água com a descida da pipeta. Quando próximo do esvaziamento, desligou-se o agitador e inclinou-se o balão para completo escoamento;
3. Desligou-se a bomba de vácuo, adicionou-se 1 litro de água destilada ao balão e enxaguou-se, impelindo movimentos rotativos à água para lavar as paredes do balão;
4. Ligou-se a bomba de vácuo e aspirou-se toda a água, fazendo-a passar também através do filtro;
5. Após ter sido aspirada toda a água, desligou-se a bomba de vácuo e esperou-se que a pressão decaísse até o fluxo parar. Elevou-se a cápsula a um plano superior ao do balão de descarga, mantendo-a na posição vertical, para evitar uma eventual perda de oocistos por refluxo;
6. Retirou-se a ponta do tubo de borracha que estava ligada à cápsula pelo dispositivo de entrada de fluxo, mantendo este a um nível superior ao de saída, pelas razões apontadas imediatamente antes, e accionou-se a bomba de vácuo para completo escoamento da cápsula;
7. Mantendo sempre a cápsula na posição vertical, retirou-se o tubo de borracha do dispositivo de saída da cápsula e taparam-se ambos os dispositivos, de entrada e de saída, com as respectivas tampas, seguindo-se a eluição dos oocistos do filtro.

2.8.2 – Eluição dos oocistos do filtro

A eluição dos oocistos foi feita com uma solução tampão cujos constituintes, proporções e preparação são descritos a seguir.

Constituintes, quantidades relativas e sequência de adição da solução de eluição:

1. Laureth-12 1% — 100 mL;
2. Tris 1 M, pH 7,4 — 10 mL;
3. Ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 2Na, 0,5 M, pH 8,0 — 2 mL;
4. Antifoam A (anti-espuma) — 150 mL;
5. Água destilada — q.b.p.1 litro.

Preparação das soluções parciais:

- a. Laureth-12 1% — Pesar 1 g de Laureth-12 e diluir em 100 mL de água destilada num copo. Dissolver, aquecendo num prato de um fogão eléctrico;
- b. Tris 1 M, pH 7,4 — Dissolver 1,21 g de Tris em 7,0 mL de água destilada e ajustar o pH para 7,4 com HCl ou NaOH a 1,0 N e completar para 10 mL com água destilada. Filtrar/esterilizar através de um filtro membrana 0,2 µm para um contentor de plástico esterilizado;
- c. EDTA, 2Na, 0,5 M, pH 8,0 — Dissolver 1,86 g de EDTA, 2Na di-hidratado em 8,0 mL de água destilada. Ajustar para pH 8,0 com HCl ou NaOH 6,0 N. Diluir para um volume final de 10 mL e ajustar para pH 8,0 com HCl ou NaOH 1,0 N;

Para eluir os oocistos dos filtros, retiraram-se as tampas do dispositivo de entrada de fluído das cápsulas e encheram-se as cápsulas com o tampão de eluição, através do dispositivo de entrada de fluído, cobrindo o filtro de membrana pregueada e o suporte que o sustém e recolocaram-se as tampas.

Em seguida, as cápsulas foram postas a agitar num agitador plano rotativo, na posição horizontal, a 80 ciclos por minuto, em dois períodos de 10 minutos cada. No primeiro período, a válvula de purga da cápsula foi posicionada para cima (12 horas no relógio) e na segunda sessão foi posicionada lateralmente (9 horas no relógio).

Após o segundo período de agitação, verteu-se o produto de eluição de cada cápsula para 3 tubos de 50 mL PBS/HDPE (dado não dispormos de centrífuga para tubos de 250 mL, que seriam os mais adequados) e repetiu-se o enchimento e agitação das cápsulas descritos nos dois parágrafos anteriores.

Os tubos contendo o produto de eluição foram postos a centrifugar a 1100 g durante 15 minutos, sem travão.

Finda a centrifugação, usando uma pipeta de Pasteur na ponta de um tubo de borracha ligado a uma trompa de água, com reduzido fluxo para evitar o arrastamento dos oocistos, aspirou-se o sobrenadante até cerca de 0,5 cm do fundo dos tubos de centrífuga.

O produto da segunda eluição foi adicionado aos mesmos tubos e repetidas as operações de centrifugação e aspiração.

Os sedimentos foram ressuspensos em 10 mL de solução de eluição, agitados 15 segundos em *vortex* e juntados num dos três tubos. Cada um dos dois tubos restantes foi enxaguado com 10 mL de solução de eluição os quais foram adicionados ao mesmo tubo, que foi, depois, centrifugado e aspirado como referido atrás.

Adicionámos 9,5 mL de água destilada ao sedimento, para que a amostra perfizesse 10 mL, e ressuspendemos em *vortex* durante 15 segundos, tendo-se seguido a técnica de separação imunomagnética para purificação dos oocistos.

2.8.3 – Separação imunomagnética

A separação imunomagnética baseia-se na ligação selectiva de esferas microscópicas paramagnéticas cobertas com anticorpos a antigénios específicos num meio aquoso.

Neste estudo usámos esferas cobertas com anticorpos anti-*Cryptosporidium* sp. da Dynal (Dynabeads anti-*Cryptosporidium*). Esta técnica é parte integrante do método 1622 da EPA dos Estados Unidos e de DETR Water Supply Regulation 1999 SI No. 1524 do Reino Unido.

Para purificar os oocistos de *Cryptosporidium parvum* presentes na suspensão de 10 mL resultante da técnica de filtração, eluição e concentração de cada amostra, seguimos as instruções do folheto Dynal Prod. No. 730.01 e da EPA (1999).

2.8.3.1 – Formação de complexos oocisto-esferas paramagnéticas

Em cada um dos tubos de Leighton de 125 x 16 mm, com uma área lateral plana de 60 x 10 mm para captura magnética (tubo L10, produto 740.03 da Dynal), introduzimos 1 mL de tampão A 10X “SL-buffer A” e 1 mL de tampão B 10X “SL-buffer B” fornecidos com o *kit* das esferas cobertas com os anticorpos.

Nos mesmos tubos introduzimos os 10 mL da suspensão de oocistos, após agitação em *vortex* durante 15 segundos. Rolhou-se cada tubo e identificou-se relativamente à amostra contida.

Após suspender as esferas “Dynabeads anti-*Cryptosporidium*”, por agitação em *vortex* durante 10 segundos e inverter o tubo, para assegurar não haver sedimento residual no fundo, adicionaram-se 100 µL destas aos tubos L10 que continham os concentrados das amostras de água com os tampões SL A e SL B.

Fixaram-se os tubos L10 num misturador rotativo de rotação plana vertical, MX-1 da Dynal, onde permaneceram a 25 rotações por minuto, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Esta mistura contínua visou facilitar a reacção dos anticorpos ligados covalentemente à superfície das esferas com os oocistos presentes nos concentrados da amostras.

Finda a mistura por rotação, com cada um dos tubos L10 procedeu-se do seguinte modo:

1. Removeu-se o tubo do misturador e colocou-se num concentrador de partículas magnéticas (MPC-1 da Dynal), na posição horizontal, com o lado plano do tubo voltado para baixo, para o magnete;

2. Agitou-se o tubo suavemente, inclinando cerca de 90° contínua e alternadamente para a rolha e para o fundo, durante 2 minutos com uma cadência de aproximadamente 1 inclinação por segundo. Esta acção teve por finalidade atrair e capturar os complexos esfera-oocisto formados durante a mistura;
3. De imediato, pondo o conjunto tubo/MPC-1 na posição vertical, com a tampa do tubo voltada para cima, foi retirada a tampa do tubo;
4. Inclinando o conjunto tubo/MPC-1 levou-se à horizontal, colocando o MPC-1 em posição superior ao tubo, rejeitou-se o sobrenadante por decantação e retiveram-se os complexos esfera-oocisto. Teve-se o cuidado de evitar agitar durante este passo;
5. Retirou-se o tubo do MPC-1 e ressuspendeu-se a amostra em 1 mL de tampão A 1X (obtido por diluição de 100 µL do tampão 10X em 1 mL de água destilada);
6. Misturou-se suavemente, por movimentos circulares, para ressuspender todo o material no tubo (não pode ser agitado em *vortex*);
7. Transferiu-se todo o líquido do tubo amostra para um microtubo de 1,5 mL, previamente identificado;
8. Rolhou-se e colocou-se o microtubo num concentrador de partículas magnéticas para tubos de microcentrifuga (MPC-S da Dynal, referido no “Method 1622” da EPA como MPC-M), com a tira magnética colocada no MPC-S;

Após a colocação de todos os microtubos no MPC-S:

- Agitou-se manualmente o conjunto microtubos/MPC-S com movimentos suaves de inclinação e semi-rotação de 180° alternados, “*rock/roll*”, cerca de um ciclo por segundo, durante 1 minuto. Esta

acção conduziu os complexos oocisto-esfera a formar uma mancha distinta castanha no lado interno da parede do microtubo na zona adjacente ao magnete.

- Imediatamente, levando os microtubos à posição vertical e sem os remover do MPC-S, com pipeta de Pasteur, aspirou-se o sobrenadante de cada microtubo amostra e da respectiva rolha, tendo o cuidado de não tocar na mancha castanha, para evitar a dispersão dos complexos oocisto-esfera. Imediatamente antes de cada aspiração do sobrenadante de cada microtubo, executaram-se três movimentos de agitação, como descrito no passo anterior.

2.8.3.2 – Dissociação dos complexos oocisto-esfera paramagnética

Após ter sido aspirado o sobrenadante de todos os microtubos amostra, retirou-se a tira magnética do MPC-S e adicionaram-se 50 µL de HCl 0,1N a cada microtubo amostra. Esta acidificação teve a finalidade de quebrar as ligações anticorpo-oocisto dos complexos oocisto-esfera.

Agitou-se cada microtubo em *vortex* durante 5 segundos, deixou-se em repouso 5 minutos, em posição vertical na cavidade apropriada do MPC-S, agitou-se outra vez em *vortex* durante 5 segundos e recolocou-se no MPC-S.

Reintroduziu-se a tira magnética no MPC-S, onde os microtubos foram deixados permanecer sem agitação durante cerca de 10 segundos. O sobrenadante livre das esferas paramagnéticas de cada microtubo foi posteriormente pipetado para o alvéolo de uma lâmina monoalveolar.

2.8.3.3 – Execução dos esfregaços após separação imunomagnética

No alvéolo de cada uma de sete lâminas monoalveolares (Spot-On, Dynal Prod. No. 740.04) depositaram-se 5 µL de NaOH 1N, com a finalidade de neutralizar os concentrados das amostras, antes acidificados para quebrar as ligações anticorpo-oocisto dos complexos oocisto-esfera.

Sem remover os microtubos do MPC-S, transferiu-se a amostra de cada um para um alvéolo de uma lâmina monoalveolar contendo 5 µL NaOH 1N. Houve o cuidado de não dispersar as esferas que estavam na parede interior do microtubo.

Num alvéolo de uma lâmina monoalveolar foram depositados 75 µL de PBS, para servir de controlo negativo.

Como já descrito no n.º 2.6.1.2, as lâminas foram a secar 2 horas numa estufa a 42°C.

Após a secagem, aplicaram-se 50 µL de metanol absoluto ao alvéolo de cada lâmina e foram deixadas a secar ao ar até o metanol ter evaporado completamente (cerca de 4 minutos).

2.8.5 – Coloração dos esfregaços pós-separação imunomagnética e exame microscópico

Procedeu-se como descrito em 2.6.1.3.

3 – Resultados

3.1 – Avaliação da concentração da suspensão stock em câmara de Neubauer

A média das contagens das seis alíquotas de 10 μL da suspensão *stock* diluídas a 1/250 foi de 36,0 oocistos por câmara. As contagens individuais foram 32, 34, 35, 36, 38 e 41, dando, portanto, um desvio padrão de 3,3 e um coeficiente de variação de 9,1%.

Baseados nestas contagens, calculámos a concentração da suspensão *stock*. Se em 0,1 μL ($1\text{ mm}^2 \times 0,1\text{ mm}$ de altura da câmara) da suspensão diluída 250 vezes havia, em média, 36,0 oocistos, em 1 mL (1000 μL) de suspensão não diluída (suspensão *stock*) haveria $90,0 \times 10^6$.

Estes valores foram coincidentes com os indicados pela origem da suspensão *stock*.

3.2 – Resultados dos métodos convencionais usualmente empregues em amostras fecais

3.2.1 – Esfregaços da suspensão *stock*

A coloração dos esfregaços da suspensão *stock*, por qualquer das três técnicas de coloração utilizadas, usualmente empregues em amostras fecais, permitiu visualizar e identificar muitos oocistos (corpos esféricos ou ligeiramente ovalados, medindo entre 4 e 6 μm , com estruturas internas mais escuras em forma de crescente, os esporozoítos).

Com safranina-azul de metileno, os oocistos apresentaram-se como corpos laranja-rosa vivo contra um fundo azul.

Pela coloração de Heine, os oocistos coraram de vermelho, contra um fundo verde.

Pela técnica *acid-fast* modificada por Kinyoun, os oocistos coraram de rosa avermelhado, contra um fundo verde.

Não foi feita a contagem de oocistos nestes esfregaços porque seria difícil e pouco fiável. Por um lado, a presença de elementos residuais (figura 3.1) dificultava e eventualmente ocultava a visualização dos oocistos. Por outro lado, a profusão de oocistos nas zonas de maior densidade apresentava sobreposições de contornos mal definidos dificilmente discrimináveis quanto ao número potencialmente envolvido (figura 3.2).

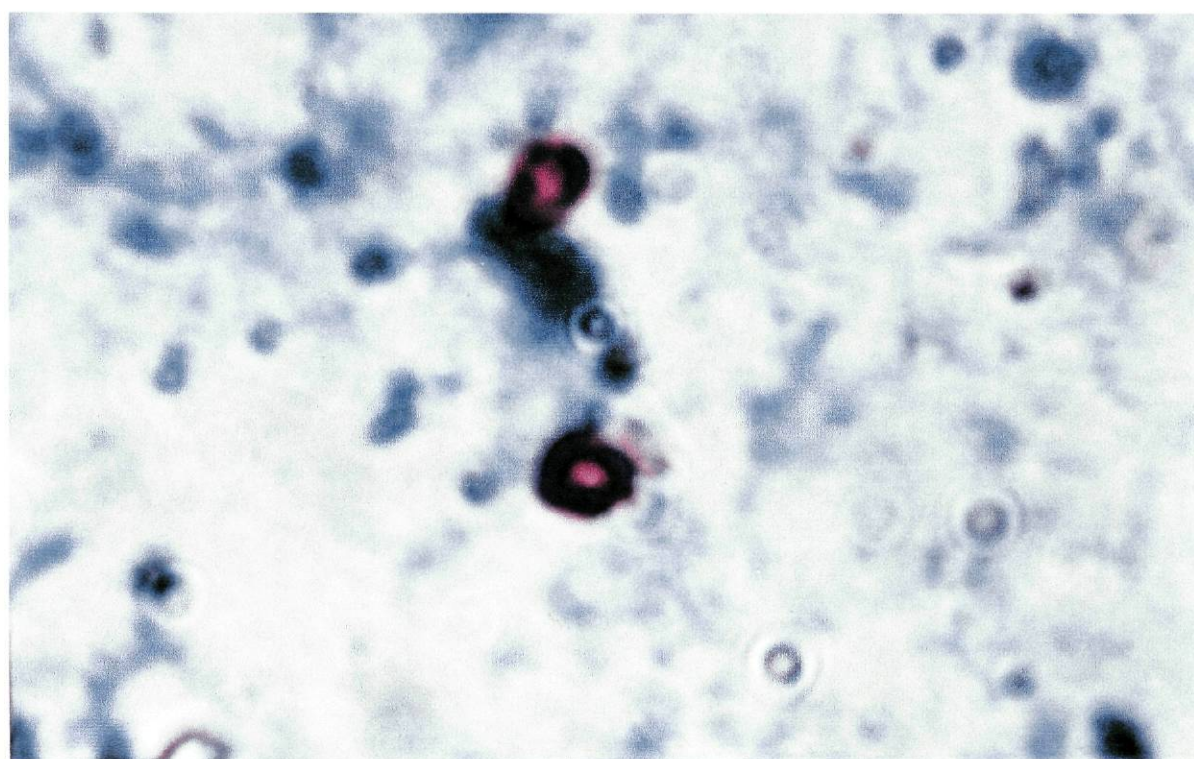
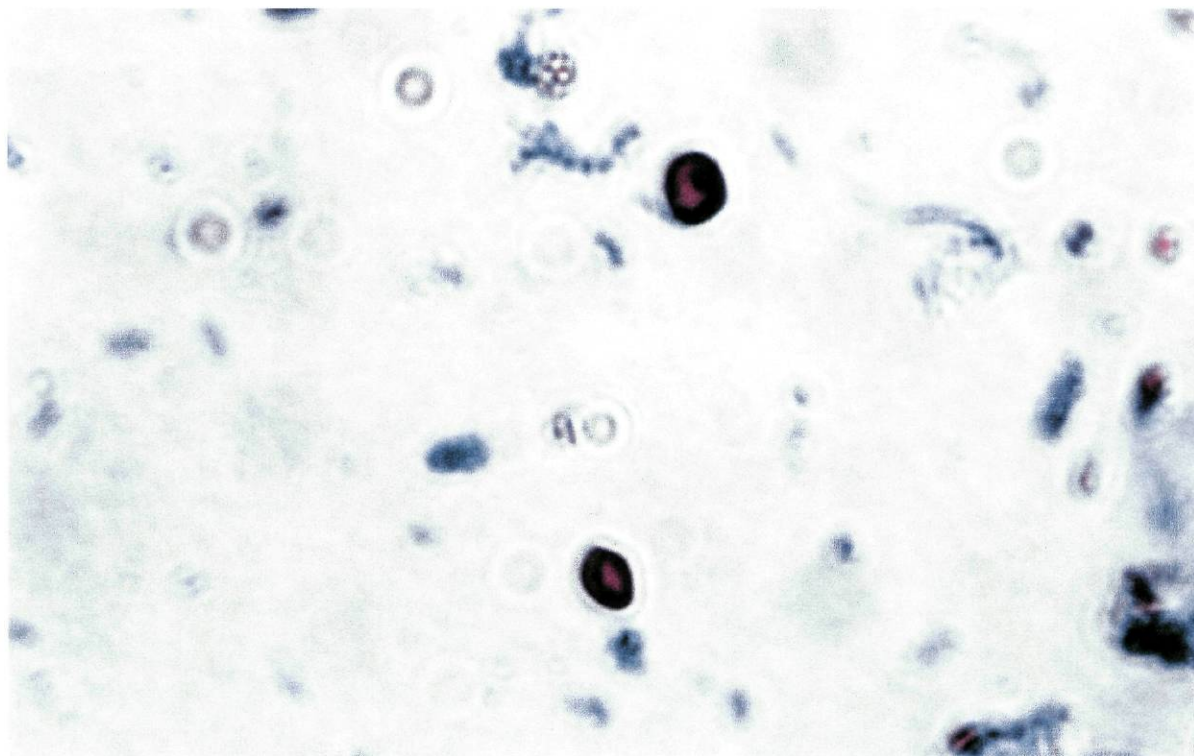


Figura 3.1. Microfotografias com ampliação de 1000X de esfregaços a partir da suspensão *stock*, destacando-se em cada uma, próximo do centro, dois oocistos. Em cima, esfregaço corado por coloração de Heine. Em baixo, esfregaço corado por *acid-fast* modificado por Kinyoun. Os oocistos apresentam-se como corpos avermelhados com estruturas escuras à periferia, os esporozoítos (INSA-Porto).

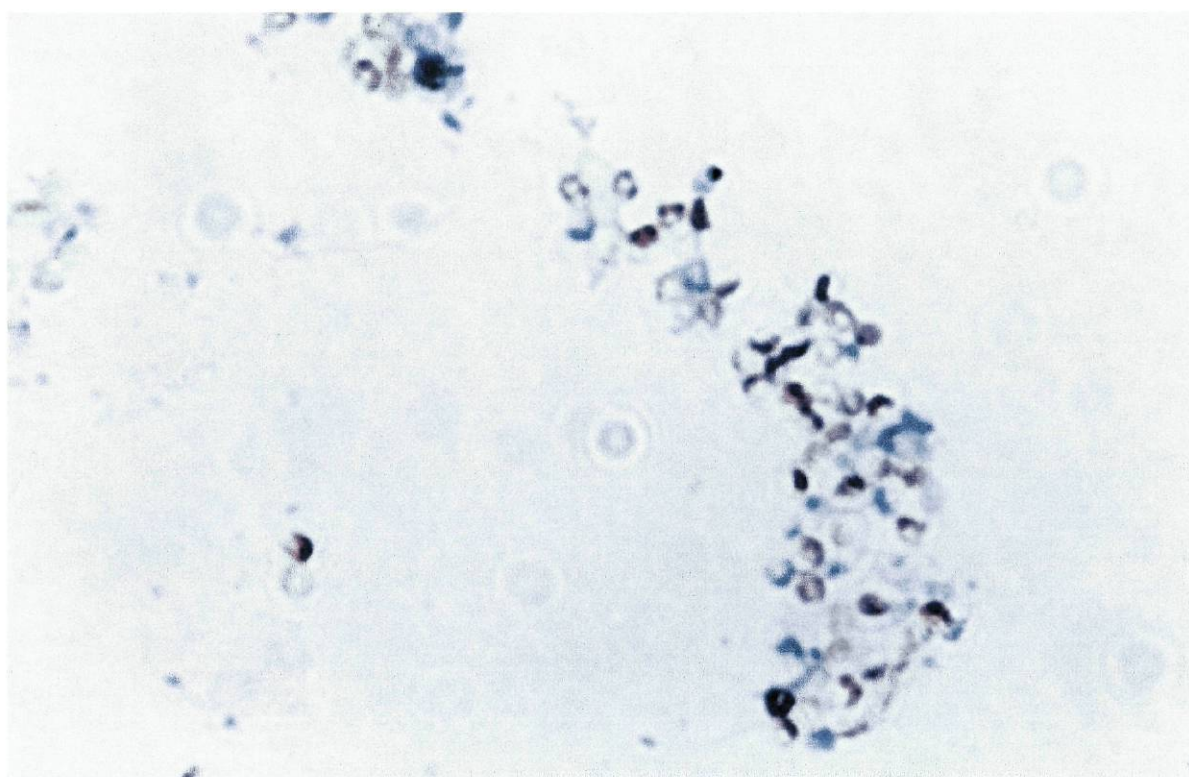
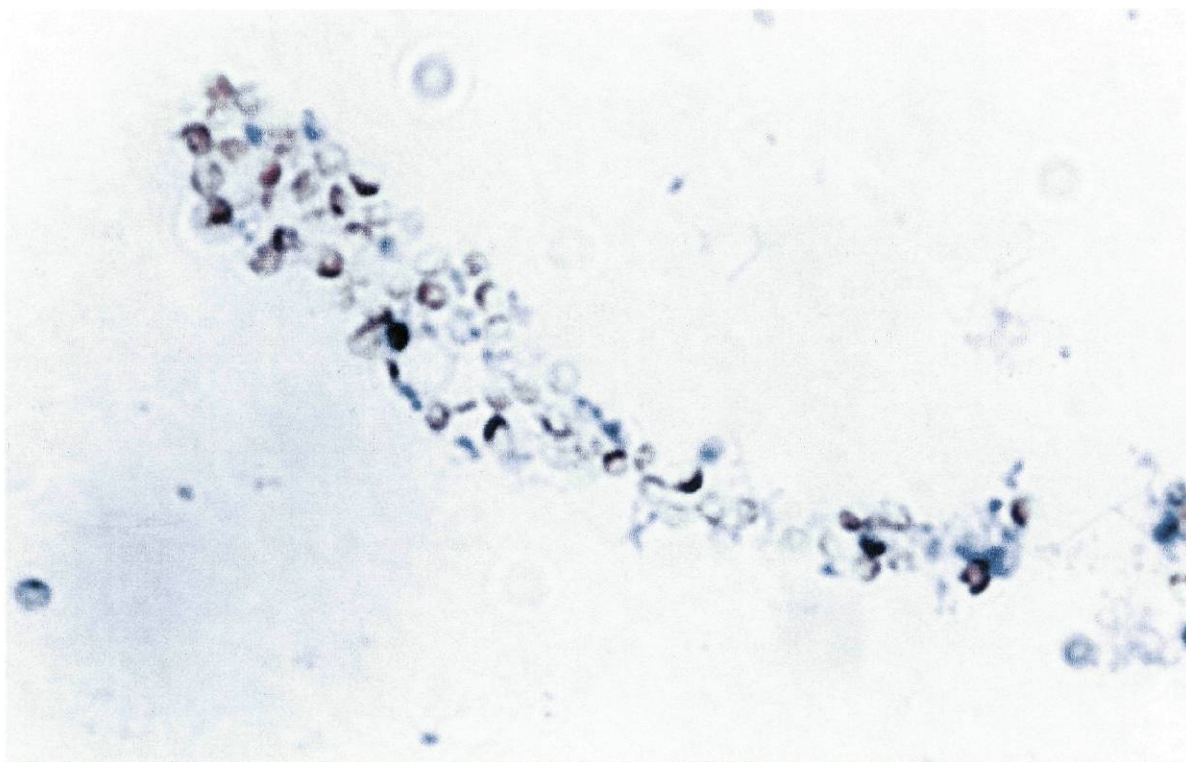


Figura 3.2. Microfotografias com ampliação de 200X de esfregaços derivados da suspensão *stock* de oocistos corados por *acid-fast* modificado por Kinyoun. Os oocistos apresentam-se como corpos rosa avermelhados, visualizando-se estruturas mais escuras dispostas à periferia, os esporozoítos (INSA-Porto).

3.2.2 – Esfregaços das suspensões contendo 20×10^4 oocistos/mL

Em cada um destes esfregaços era esperado encontrar um número de oocistos correspondente a $10\mu\text{L}$ da suspensão de 20×10^4 oocistos/mL, ou seja, cerca de 2.000 por esfregaço.

Os números de oocistos encontrados foram muito inferiores ao esperado. Aqueles números, valor médio, desvio padrão (ΔP), coeficiente de variação (CV) e rendimento médio, isto é, o valor médio de oocistos encontrados dividido pelo número de oocistos esperado encontrar, de cada uma das três técnicas tinturiais de coloração usadas nas suspensões de 20×10^4 oocistos/mL, em água destilada e em PBS-T, usando lâminas sem tratamento prévio e pré tratadas com APES estão resumidos nos quadros 3.1 e 3.2.

Da suspensão em água destilada e lâminas sem tratamento prévio, encontraram-se nos três grupos de quatro esfregaços cada: grupo corado pela safranina-azul de metileno, 0, 5, 8 e 35 oocistos em cada esfregaço, com uma média de 15,3, desvio padrão (ΔP) de 15,6, coeficiente de variação (CV) de 102% e um rendimento médio de 0,8%; grupo corado pela coloração de Heine 1, 7, 18, e 45 oocistos em cada, com uma média de 17,8, ΔP de 19,5, CV de 110% e um rendimento médio de 0,9%; grupo corado pelo *acid-fast* modificado por Kinyoun, 2, 9, 15, e 31 oocistos em cada, com uma média de 14,3, ΔP de 12,4, CV de 86,7% e um rendimento médio de 0,7%.

Da suspensão em PBS-T 20×10^4 e lâminas sem qualquer tratamento prévio, encontraram-se em cada um dos três grupos de quatro esfregaços corados: pela safranina-azul de metileno, 4, 15, 33 e 84 oocistos em cada, com uma média de 34,0, desvio padrão ΔP de 35,4, CV de 104% e um rendimento médio de 1,7%; pela coloração de Heine, 3, 15, 48 e 50 oocistos em cada, com uma média de 29,0, ΔP de 23,6, CV de 81,4% e um rendimento médio de 1,5%; pelo *acid-fast* modificado por Kinyoun, 17, 25, 33 e 72 oocistos em cada, com uma média de 36,8, ΔP de 24,2, CV de 65,6% e um rendimento médio de 1,8%.

Da suspensão em água destilada e lâminas pré tratadas com APES, encontraram-se em cada um dos três grupos de quatro esfregaços corados: pela safranina-azul de metileno

13, 27, 43 e 88 oocistos em cada, com uma média de 42,8, ΔP de 32,6, CV de 76,2% e um rendimento médio de 2,1%; pela coloração de Heine 15, 32, 94 e 143 oocistos em cada, com uma média de 71,8, ΔP de 58,8, CV de 82,8% e um rendimento médio de 3,6%; pelo *acid-fast* modificado por Kinyoun, 61, 63, 114 e 145 oocistos em cada, com uma média de 95,8, ΔP de 28,4, CV de 29,7% e um rendimento médio de 4,8%.

Quadro 3.1. Contagens de oocistos dos esfregaços de 10 μ L de suspensão de 20 x 10⁴ oocistos/mL em lâminas sem qualquer tratamento prévio.

A: suspensão em água destilada					
Coloração	Oocistos encontrados por esfregaço	Valor médio	ΔP	CV(%)	Rendimento Médio (%)
Safranina-azul de metileno	0, 5, 8, 35	15,3	15,6	102	0,8
Coloração de Heine	1, 7, 18, 45	17,8	19,5	110	0,9
Acid-fast modificado por Kinyoun	2, 9, 15, 31	14,3	12,4	86,7	0,7
B. suspensão em PBS-T					
Coloração	Oocistos encontrados por esfregaço	Valor médio	ΔP	CV(%)	Rendimento Médio (%)
Safranina-azul de metileno	4, 15, 33, 84	34,0	35,4	104	1,7
Coloração de Heine	3, 15, 48, 50	29,0	23,6	81,4	1,5
Acid-fast modificado por Kinyoun	17, 23, 35, 72	36,8	24,2	65,6	1,8

Da suspensão em PBS-T e lâminas pré-tratadas com APES (3-aminopropiltriétoxissilano) encontraram-se em cada um dos três grupos de quatro esfregaços corados: pela safranina-azul de metileno, 102, 204, 205 e 211 oocistos em cada, com uma média de 180,5, ΔP de 52,4, CV de 29,0% e um rendimento médio de 9,0%; pela coloração de Heine, 83, 89, 220 e 231 oocistos em cada, com uma média de 155,8 ΔP de 8^o,7, CV de 51,8% e um rendimento médio de 7,8%; pelo *acid-fast* modificado por Kinyoun, 185, 198, 204 e 407 oocistos em cada, com uma média de 248,5, ΔP de 106,0, CV de 42,6% e um rendimento médio de 12,4%.

Na figura 3.3, na página seguinte, podem observar-se duas fotografias de esfregaços derivados da suspensão em PBS-T de 20×10^4 oocistos/mL, corados por *acid-fast* modificado por Kinyoun mostrando oocistos com ampliação de 1000X.

Quadro 3.2. Contagens de oocistos dos esfregaços de 10 μ L de suspensão de 20×10^4 oocistos/mL em lâminas pré tratadas com APES (3-aminopropiltriétoxissilano):

A: suspensão em água destilada					
Coloração	Oocistos encontrados por esfregaço	Valor médio	ΔP	CV(%)	Rendimento Médio (%)
Safranina-azul de metileno	13, 27, 43, 88	42,8	32,6	76,2	2,1
Coloração de Heine	15, 32, 94, 143	71,0	58,8	82,8	3,6
Acid-fast modificado por Kinyoun	61, 63, 114, 145	95,8	28,4	29,7	4,8
B: suspensão em PBS-T					
Coloração	Oocistos encontrados por esfregaço	Valor médio	ΔP	CV(%)	Rendimento Médio (%)
Safranina-azul de metileno	102, 204, 205, 211	180,5	52,4	29,0	9,0
Coloração de Heine	83, 89, 220, 231	155,8	80,7	51,8	7,8
Acid-fast modificado por Kinyoun	185, 198, 204, 407	248,5	106,0	42,6	12,4

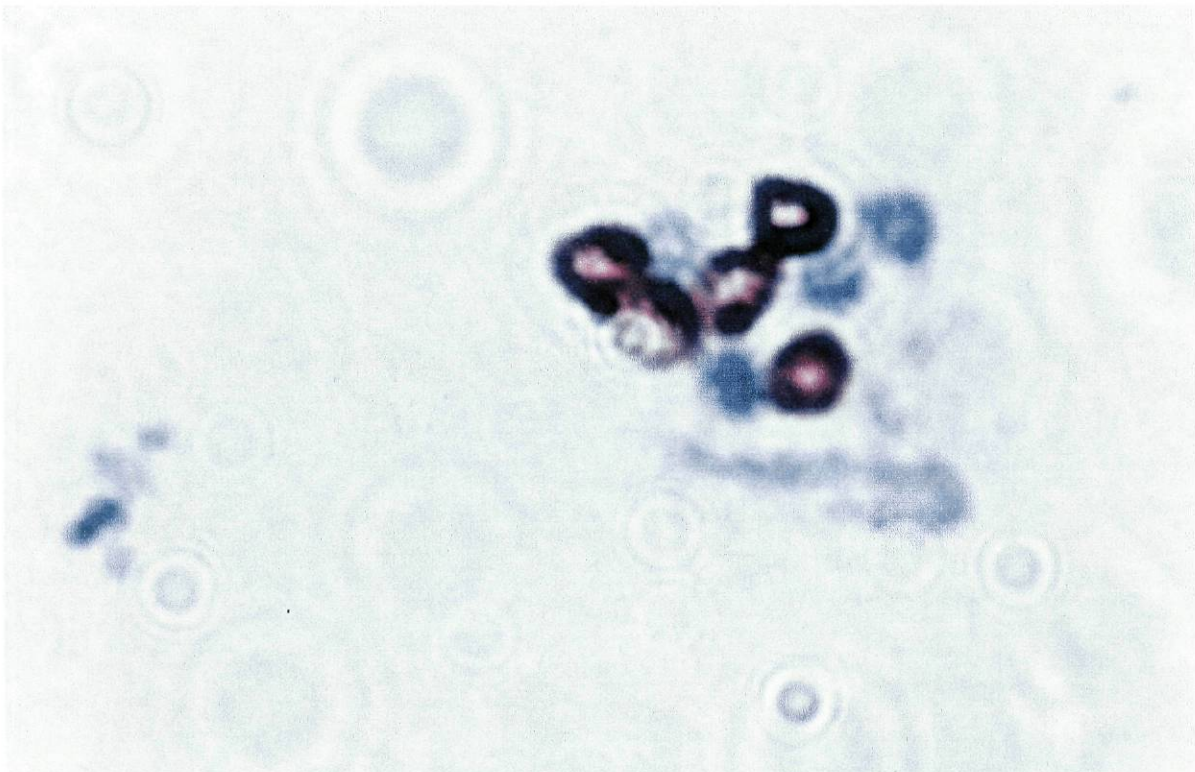
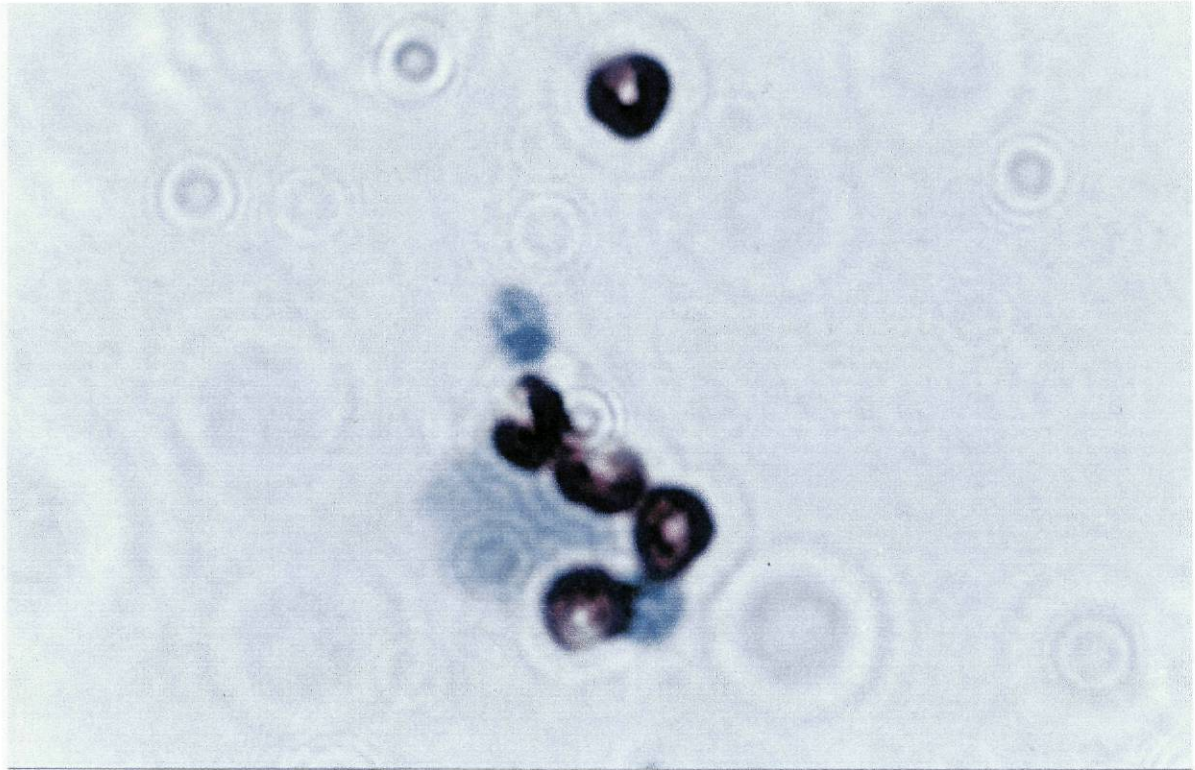


Figura 3.3. Microfotografias de esfregaços derivados da suspensão em PBS-T de 20×10^4 oocistos/mL, corados por *acid-fast* modificado por Kinyoun mostrando oocistos com ampliação de 1000X. Os oocistos apresentam-se como corpos corados de vermelho alaranjado com estruturas mais escuras e mais densas dispostas à periferia, os esporozoítos (INSA-Porto)

3.2.3 – *Esfregaços das suspensões de 20×10^2 oocistos/mL*

Em cada um destes esfregaços era esperado encontrar um número de oocistos correspondente a 10 μ L da suspensão de 20×10^2 oocistos/mL, ou seja, cerca de 20 por esfregaço. Os rendimentos médios obtidos foram de 1,25, 0,00 e 2,50 para as colorações safranina-azul de metileno, coloração de Heine e *acid-fast* modificado por Kinyoun, respectivamente.

Os números de oocistos encontrados, o valor médio, desvio padrão (ΔP), coeficiente de variação (CV) e rendimento médio, isto é, o valor médio de oocistos encontrados dividido pelo número de oocistos esperado encontrar, de cada uma das três técnicas de coloração usadas nas suspensões de 20×10^2 oocistos/mL, descritos a seguir, são mostrados nos quadros 3.3 e 3.4.

Nos esfregaços de suspensão em água destilada e lâminas sem tratamento prévio, encontraram-se em cada um dos três grupos de quatro corados: pela safranina-azul de metileno, 0, 0, 0 e 1, oocistos, com uma média de 0,25, ΔP de 0,5, CV de 200% e um rendimento médio de 1,25%; pela coloração de Heine, 0, 0, 0 e 0 oocistos, com uma média de 0,0, ΔP de 0,0, CV de 0,0% e um rendimento médio de 0,0%; pelo *acid-fast* modificado por Kinyoun, 0, 0, 0 e 2 oocistos, com uma média de 0,5, ΔP de 1,0, CV de 200% e um rendimento médio de 2,5%.

Nos esfregaços de suspensão em PBS-T 20 0,01 e lâminas sem tratamento prévio, encontraram-se em cada um dos três grupos de quatro corados: pela safranina-azul de metileno, 0, 0, 0 e 2, oocistos, com uma média de 0,5, ΔP de 1,0, CV de 200% e um rendimento médio de 2,50%; pela coloração de Heine 0, 0, 1 e 1 oocistos, com uma média de 0,25, ΔP de 0,5, CV de 200% e um rendimento médio de 1,25%; pelo *acid-fast* modificado por Kinyoun, 0, 0, 0 e 1 oocistos, com uma média de 0,25, ΔP de 0,5, CV de 200% e um rendimento médio de 1,25%.

Nos esfregaços de suspensão em água destilada e lâminas pré tratadas com APES (3-aminopropiltriétoxissilano), encontraram-se em cada um dos três grupos de quatro corados:

pela safranina-azul de metileno 0, 0, 1 e 2 oocistos, com uma média de 0,75, ΔP de 1,0, CV de 133% e um rendimento médio de 3,75%; pela coloração de Heine 0, 0, 1 e 2 oocistos, com uma média de 0,75, ΔP de 1,0, CV de 133% e um rendimento médio de 3,75%; pelo *acid-fast* modificado por Kinyoun 0, 0, 1 e 3 oocistos, com uma média de 1,0, ΔP de 1,4, CV de 140% e um rendimento médio de 5,0%.

Nos esfregaços de suspensão em PBS-T 20 0,01 e lâminas pré tratadas com APES, encontraram-se em cada um dos três grupos de quatro corados: pela safranina-azul de metileno 0, 1, 1 e 3 oocistos, com uma média de 1,25, ΔP de 1,3, CV de 104% e um rendimento médio de 6,25%; pela coloração de Heine 0, 0, 2 e 3 oocistos, com uma média de 1,25, ΔP de 1,5 CV de 120% e um rendimento médio de 6,25%; pelo *acid-fast* modificado por Kinyoun 0, 0, 3 e 5 oocistos, com uma média de 2,0, ΔP de 2,00, CV de 120% e um rendimento médio de 10,0%.

Quadro 3.3. Contagens de oocistos dos esfregaços de 10 μL de suspensões de 20×10^2 oocistos/mL em lâminas sem qualquer tratamento prévio.

A: suspensão em água destilada					
Coloração	Oocistos encontrados por esfregaço	Valor Médio	ΔP	CV(%)	Rendimento Médio (%)
Safranina-azul de metileno	0, 0, 0, 1	0,25	0,5	200	1,25
Coloração de Heine	0, 0, 0, 0	0,0	—	—	—
Acid-fast modificado por Kinyoun	0, 0, 0, 2	0,5	1,0	200	2,50
B: suspensão em PBS-T					
Coloração	Oocistos encontrados por esfregaço	Valor médio	ΔP	CV(%)	Rendimento Médio (%)
Safranina-azul de metileno	0, 0, 0, 2	0,5	1,0	200	2,50
Coloração de Heine.	0, 0, 1, 1	0,5	0,6	120	2,50
Acid-fast modificado por Kinyoun	0, 0, 0, 1	0,25	0,5	200	1,25

Quadro 3.4. Contagens de oocistos dos esfregaços de 10µL de suspensões de 20 x 10² oocistos/mL em lâminas pré tratadas com APES (3-aminopropiltrióxissilano):

A: suspensão em água destilada					
Coloração	Oocistos encontrados por esfregaço	Valor médio	ΔP	CV(%)	Rendim. Médio (%)
Safranina-azul de metileno	0, 0, 1, 2	0,75	1,0	133	3,75
Coloração de Heine	0, 0, 1, 2	0,75	1,0	133	3,75
Acid-fast modificado por Kinyoun	0, 0, 1, 3	1,00	1,4	140	5,00
B: suspensão em PBS-T					
Coloração	Oocistos encontrados por esfregaço	Valor médio	ΔP	CV(%)	Rendim. Médio (%)
Safranina-azul de metileno	0, 1, 1, 3	1,25	1,3	104	6,25
Coloração de Heine	0, 0, 2, 3	1,25	1,5	120	6,25
Acid-fast modificado por Kinyoun	0, 0, 3, 5	2,00	2,4	120	10,0

3.2.4 – Resultados da observação microscópica dos esfregaços resultantes da filtração em rampa por pressão negativa usando filtros de 0,45 µm

Exceptuando dois esfregaços em cada uma de duas lâminas pré tratadas pelo APES e coradas pela técnica de coloração *acid-fast* modificada por Kinyoun, nos esfregaços resultantes da filtração em rampa por pressão negativa, usando filtros de 0,45 µm, não foi visualizado qualquer oocisto corado por qualquer das três técnicas de coloração usadas, tanto nas lâminas sem tratamento prévio como nas lâminas pré tratadas pelo APES.

Os esfregaços, dois em cada uma de duas lâminas pré tratadas pelo APES, que mostraram alguns oocistos corados, conforme o quadro 3.5, pertenciam a grupos de quatro esfregaços provenientes de dois tipos de eluição, por sonicação e por agitação, suspensão pós filtração com PBS-T e corados *pelo acid-fast* modificado por Kinyoun.

O número médio de oocistos esperado encontrar era de 40 por esfregaço. Destes dois grupos de quatro esfregaços idênticos, obtiveram-se médias de 1,25 oocistos por esfregaço, com desvios padrões de 1,9 e 1,8, coeficientes de variação de 152 e 144 e rendimentos médios de 3,1% em ambos os grupos.

Quadro 3.5. Oocistos encontrados em duas lâminas multialveolares pré tratadas pelo APES e coradas pela técnica de coloração *acid-fast* modificada por Kinyoun:

Tipo de eluição	Oocistos encontrados por esfregaço	Valor médio	ΔP	CV (%)	Rendimento Médio (%)
Sonicação	0, 0, 2, 4	1,25	1,9	152	3,1
Agitação	0, 0, 3, 3	1,25	1,8	144	3,1

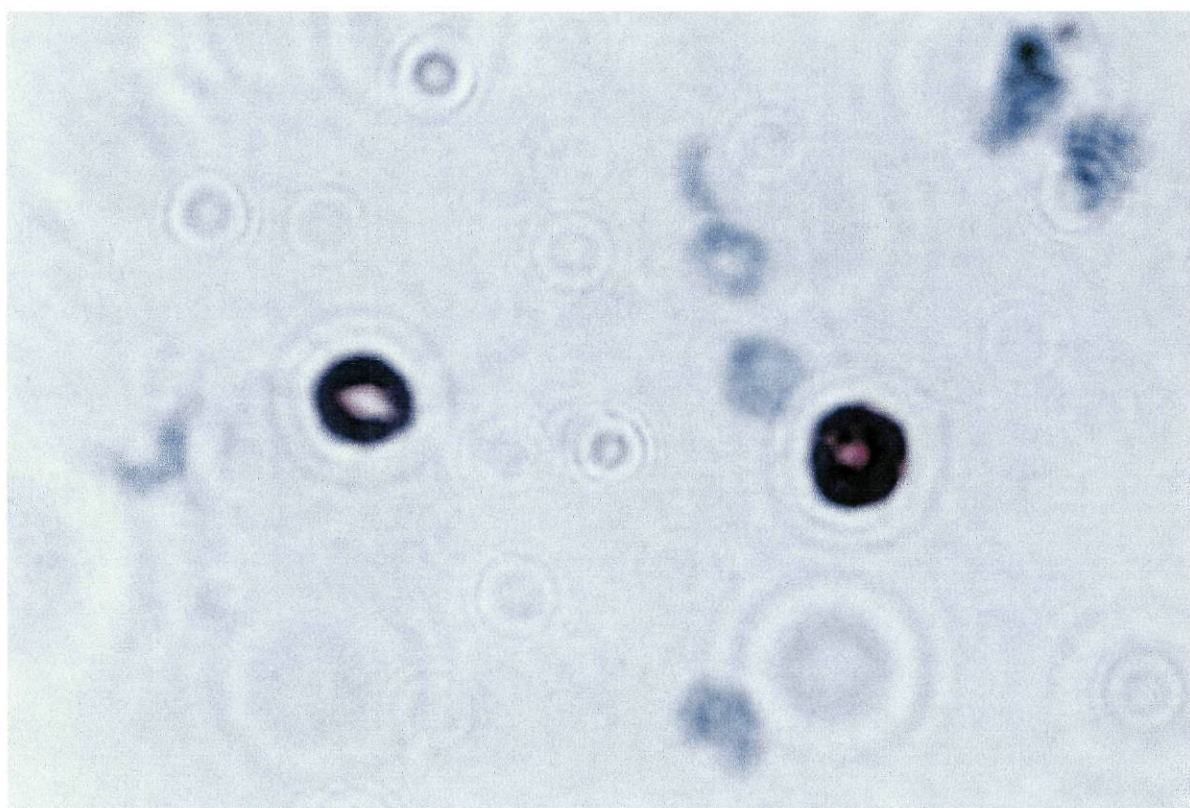


Figura 3.4. Microfotografia com ampliação de 1000X de um esfregaço proveniente de uma amostra de água enriquecida com oocistos, após filtração em rampa por pressão negativa e eluição por sonicação, corado pela técnica de coloração *acid-fast* modificada por Kinyoun. Destacam-se dois oocistos (corpos corados de rosa avermelhado) com estruturas internas mais escuras dispostas à periferia, os esporozoítos (INSA-Porto).

3.3 – Resultados da revelação dos oocistos por imunofluorescência

3.3.1 – Resultados dos esfregaços corados por imunofluorescência para avaliação da concentração da suspensão de trabalho

Os resultados da observação em microscopia de fluorescência dos esfregaços resultantes de alíquotas de 10 μ L, para avaliação da suspensão de trabalho, usada para enriquecimento de amostras de água, com vista a testar a eficiência da aplicação da imunofluorescência na detecção, identificação e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium*, estão expressos no quadro 3.6.

A enumeração dos oocistos dos esfregaços para avaliação da suspensão de trabalho, após a observação do esfregaço positivo e do negativo, foi feita por comparação com estes controlos.

A figura 3.5 mostra uma microfotografia do esfregaço controlo positivo, fornecido com o *kit* CRYPTO-CELL IF TEST, após a coloração por imunofluorescência. Nesta microfotografia visualizam-se distintamente os oocistos como corpos verde alface, medindo entre 4 e 6 μ m, aproximadamente esféricos, destacando-se de um fundo azulado.

Os oocistos dos nossos esfregaços não apresentavam a fluorescência verde alface como a do controlo positivo, mostrando em vez disso corpos com uma tonalidade amarelada contra um fundo azul esverdeado (figura 3.6). Dadas as semelhanças das dimensões e formas dos corpos fluorescentes com as do controlo positivo e a confrontação com o controlo negativo, concluímos tratar-se inequivocamente de oocistos.

Cada esfregaço foi esquadrihado duas vezes por cada uma de duas pessoas e o resultado foi tomado pela média das quatro contagens.

O valor médio de oocistos encontrados nos nove esfregaços de 10 μ L cada da suspensão de trabalho, pela coloração de imunofluorescência, foi de 92,0, com um desvio padrão (Δ P) de 7,6 e um coeficiente de variação (CV) de 8,3%.

Quadro 3.6. Resultados dos esfregaços corados por imunofluorescência para avaliação da suspensão de trabalho

Oocistos encontrados por esfregaço de 10 μ L da suspensão de trabalho	Valor médio	Δ P	CV (%)
81, 86, 87, 89, 92, 93, 95, 98, 107	92,0	7,6	8,3

Este valor médio, de 92 oocistos em cada 10 μ L de uma suspensão diluída a $1/10^4$, indica-nos que partimos de uma suspensão stock cuja concentração seria de $92,0 \times 10^6$ oocistos por mL, pelo que adoptámos este valor como referência para os resultados da técnica de coloração por imunofluorescência.

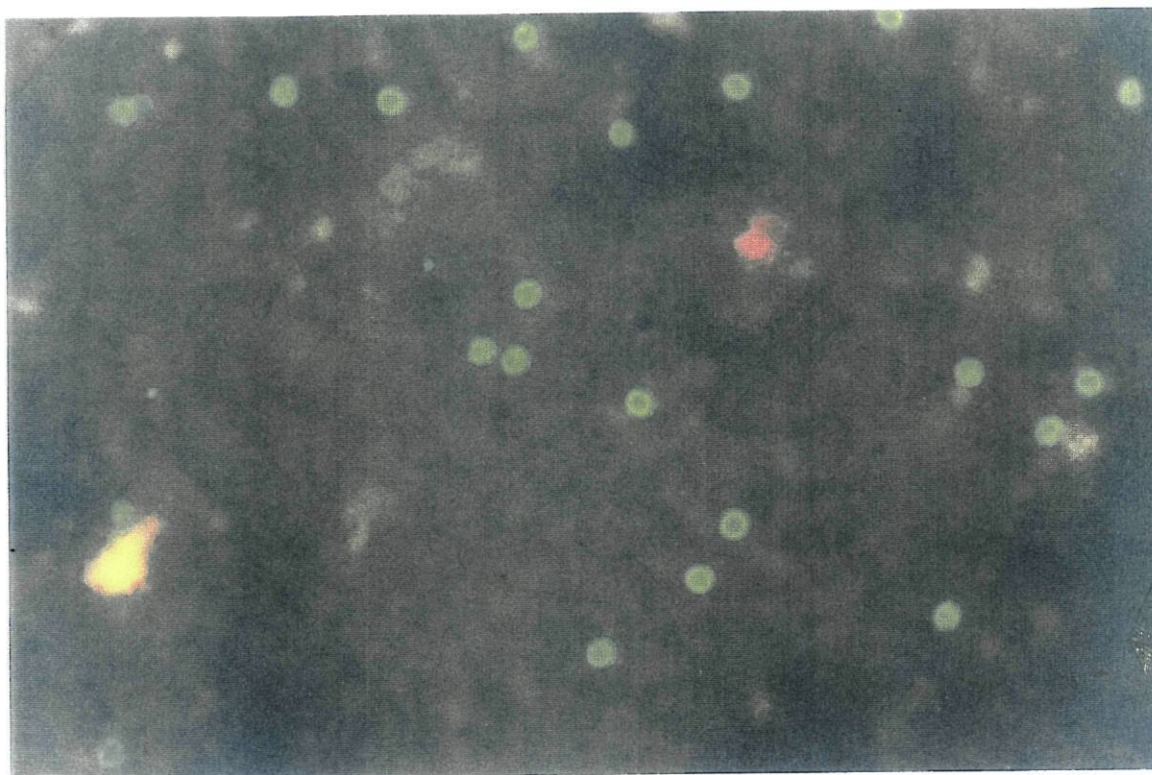


Figura 3.5. Microfotografia do esfregaço controlo positivo fornecido com o *kit* CRYPTO-CELL IF TEST, corado por imunofluorescência, mostrando oocistos corados de verde alface, com uma ampliação de 200X (INSA-Porto).

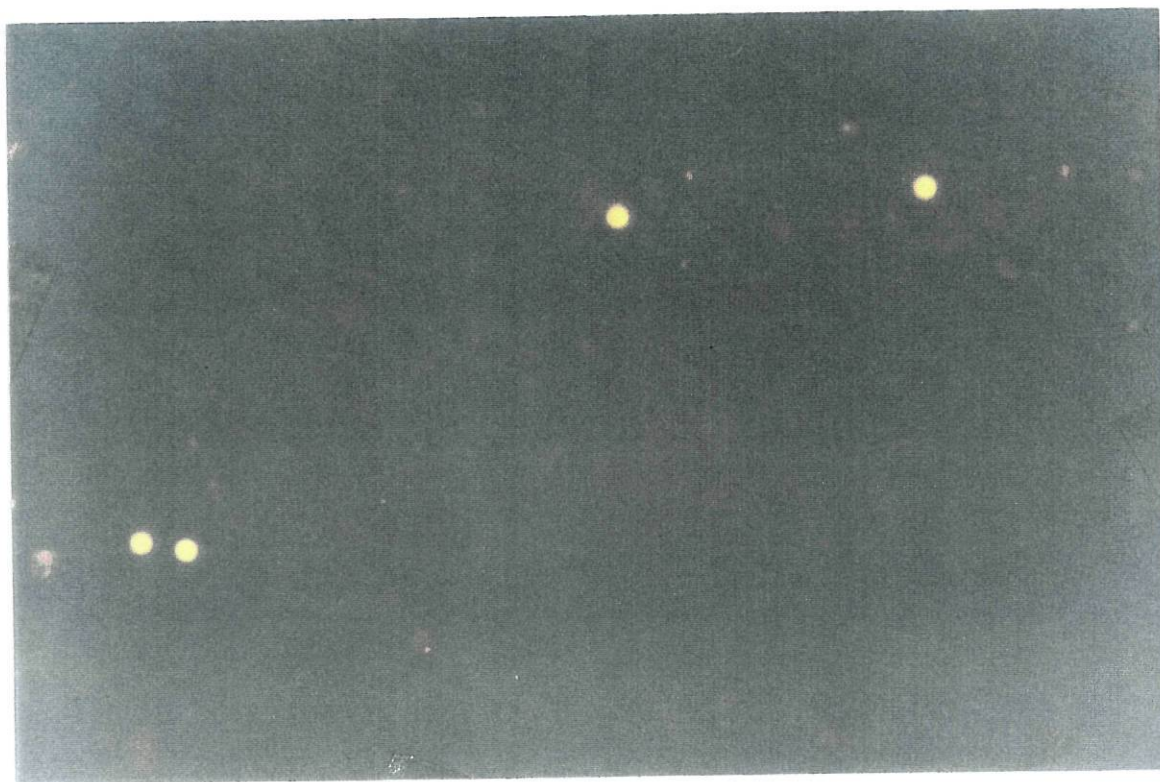


Figura 3.6. Microfotografia de um esfregaço a partir de uma amostra pós filtração, separação imunomagnética e coloração por imunofluorescência, com ampliação de 200X. Destacam-se do fundo azulado quatro oocistos (corpos aproximadamente esféricos de tonalidade amarelada): dois no quadrante superior direito, um pouco afastados um do outro, e dois quase juntos no quadrante inferior esquerdo (INSA-Porto).

3.3.2 – Resultados dos esfregaços obtidos de amostras de água filtradas por filtros cápsula e corados por imunofluorescência

Nos esfregaços das amostras enriquecidas com 10 µL de suspensão de trabalho, esperado conter 92 oocistos, filtradas por filtros-cápsula e coradas por imunofluorescência, os oocistos encontrados por cada esfregaço foram:

78 e 85 nos dois esfregaços derivados de amostras de água destilada;

75 e 87 nos dois esfregaços derivados de amostras de água de consumo.

No esfregaço da amostra enriquecida com 10 µL da suspensão de trabalho diluída a 1/3, esperado conter cerca de 31 oocistos, filtrada por filtro-cápsula e corada por imunofluorescência, encontraram-se 25 oocistos.

Quadro 3.7. Resultados de esfregaços de amostras de água destilada e de consumo enriquecidas com oocistos, filtradas por filtros-cápsula e corados por imunofluorescência.

Tipo de amostra e número de oocistos de enriquecimento (n)	Oocistos encontrados por esfregaço	Valor médio	ΔP	CV (%)	Rendimento médio (%)
Água destilada (92)	78, 85	81,5	7,8	9,6	88,6
Água de consumo (92)	75, 87	81,0	8,5	10,5	88,0
Água destilada (31)	25	-	-	-	80,6
Água destilada + água de consumo (92)	75, 78, 85, 87	81,3	5,7	7,0	88,4

Os números de 78 e 85 oocistos encontrados nos dois esfregaços derivados das amostras de água destilada e 75 e 87 nos dois esfregaços derivados de amostras de água de consumo, enriquecidas com 92 oocistos, apontam para um rendimento médio de 88,6% e 88,0%, respectivamente.

Os 25 oocistos encontrados no esfregaço derivado da amostra de água destilada enriquecida com cerca de 31 oocistos indicam um rendimento de 80,6%.

Nos dois esfregaços derivados de água de consumo, tratados de igual forma, não foram visualizados quaisquer oocistos.

4 – Discussão dos resultados

4.1 – Colorações usualmente empregues em amostras fecais

4.1.1 – Colorações de oocistos lavados e diluídos com água destilada e com PBS-T

O emprego de colorações usualmente utilizadas em amostras fecais pareceu dar bons resultados quando aplicadas em amostras de elevada concentração de oocistos. Mas a aplicação das mesmas colorações (safranina-azul de metileno, coloração de Heine e *acid-fast* de Kinyoun) em oocistos lavados contidos em amostras diluídas de baixa concentração mostrou uma eficiência (rendimento médio) reduzidíssima e uma enorme variabilidade (CV), registando-se mesmo em grande número de esfregaços a ausência de detecção de oocistos.

Conforme resumido nos quadros 3.1 a 3.5:

- O uso de PBS-T na lavagem e diluição dos oocistos mostrou melhorar o rendimento de detecção e identificação de oocistos, comparativamente ao uso de água destilada com a mesma finalidade;
- A utilização de lâminas pré tratadas com APES nos esfregaços de suspensões de oocistos mostrou também uma melhoria do rendimento, comparativamente à utilização de lâminas sem qualquer tratamento prévio;
- A coloração *acid-fast* modificada por Kinyoun pareceu ser mais eficiente, relativamente às outras duas usadas neste estudo, a safranina-azul de metileno e a coloração de Heine.

Os oocistos corados pelo *acid-fast* de Kinyoun revelaram maior nitidez estrutural nomeadamente dos esporozoitos.

Apesar destas diferenças observadas, quanto a o meio de suspensão ser água destilada ou PBS-T, as lâminas serem ou não pré tratadas com um potenciador da aderência e a coloração ser a safranina-azul de metileno ou a coloração de Heine ou o *acid-fast* de Kinyoun, o rendimento diminuiu com o aumento da diluição, ou seja, com a diminuição da

concentração. Nas suspensões de menor concentração (20×10^2 oocistos/mL), o rendimento médio variou de zero até um máximo de 10%.

O rendimento máximo de 10% (quadro 3.4) foi obtido quando o meio de suspensão e lavagem era o PBS-T, a lâmina de suporte dos esfregaços era pré tratada com o potenciador de aderência APES e a técnica de coloração o *acid-fast* de Kinyoun, em quatro esfregaços de uma lâmina nos quais era esperado encontrar cerca de 20 oocistos em cada. Em dois destes esfregaços o número de oocistos achados foi zero, sendo nos dois restantes de 3 e 5, o que dá uma média de 2,0, um desvio padrão de 2,4 e um coeficiente de variação de 120%.

Mesmo admitindo um processo de purificação de oocistos sem perdas, estes resultados mostram não serem estas técnicas adequadas à detecção e identificação de oocistos na água ambiental, dado a concentração de oocistos na água ambiental ser geralmente baixa (Bukhari, 1998; Jiggins, 2001). Com esta metodologia correr-se-ia o risco de rotular de negativas um grande número de amostras quando estas seriam positivas.

4.1.2 – Colorações por técnicas usualmente empregues em amostras fecais de sedimentos de amostras de água contendo oocistos, filtradas com filtros de 0,45 µm

A aplicação de técnicas usualmente empregues em amostras fecais em sedimentos provenientes da filtração de amostras de água contendo oocistos mostrou, neste estudo, um rendimento praticamente nulo. Só em dois dos quatro esfregaços idênticos de cada uma de duas lâminas pré tratadas com APES e coradas por *acid-fast* de Kinyoun foram encontrados alguns oocistos.

O rendimento dos dois grupos de quatro esfregaços idênticos com positividade foi de apenas 3,1%, em termos médios. Acresce ainda que dois em cada quatro destes esfregaços deram resultados completamente nulos, conduzindo a coeficientes de variação de cerca de 150%.

Por estes resultados, conclui-se não ser esta uma metodologia praticável para a obtenção de resultados fiáveis na detecção, identificação e quantificação de oocistos na água,

tanto pelo baixíssimo rendimento como e principalmente por alguns esfregaços apresentarem um rendimento nulo, o que elimina qualquer fiabilidade.

4.2 – Revelação dos oocistos por imunofluorescência

4.2.1 – Avaliação da suspensão de trabalho para enriquecimento de amostras

O valor médio da concentração da suspensão *stock* de $92,0 \times 10^6$ oocistos por mL, obtida pela coloração por imunofluorescência, vai ao encontro do valor médio de 36 oocistos em $0,1 \mu\text{L}$ (volume de um quadrado da câmara de Neubauer) de uma suspensão diluída a $1/250$, que nos indicava que tínhamos partido de uma suspensão com uma concentração de $90,0 \times 10^6$, a nossa suspensão *stock*.

Nas amostras enriquecidas para filtração por filtro-cápsula e coloração por imunofluorescência, admitiu-se como referência o valor de $92,0 \times 10^2$ oocistos/mL para a suspensão de trabalho, por uma questão de uniformidade de coloração para visualização microscópica, identificação e contagem.

4.2.2 – Amostras filtradas por filtros-cápsula, purificadas por separação imunomagnética e coradas por imunofluorescência

Os rendimentos médios obtidos de 88,6, 88,0 e 80,6%, tomando como linha de base de 100% a contagem na avaliação da suspensão de trabalho corada pela imunofluorescência, são ligeiramente superiores aos encontrados por Bukhari *et al* (1998), de 68 a 83%, contudo estão de acordo com os resultados de rendimento obtidos por outros investigadores, de 90% ou mais, referidos por aqueles mesmos autores.

Isto significa que a obtenção de concentrados de amostras através da filtração por filtros-cápsula e coloração pela imunofluorescência é uma metodologia adequada para a concentração, identificação e quantificação de oocistos na água de consumo e águas ambientais, onde frequentemente os oocistos de *Cryptosporidium* ocorrem em baixo número (Bukhari *et al.*, 1998; Jiggins, 2001).

Este é actualmente o método de referência para a monitorização de oocistos de *Cryptosporidium* na água de consumo nos Estados Unidos e no Reino Unido. Nos Estados

Detecção, Identificação e Quantificação de Oocistos de *Cryptosporidium parvum* na Água: Métodos Convencionais e Imunofluorescência pós-Separação Imunomagnética

Unidos pelo estabelecido no “Method 1622, da EPA, de 1999; no Reino Unido pelo estabelecido em “Water Supply (Water Quality) Amendment Regulations 19XX, SI XXX” da DWI-Drinking Water Inspectorate, de 1998.

4.3 – Validação dos resultados

4.3.1 - Técnicas usualmente utilizadas em amostras fecais

Os resultados obtidos pelas técnicas de coloração correntemente utilizadas em amostras fecais e usadas no presente estudo, apresentam uma dispersão (expressa pelo CV) situada entre os 29 e os 200% e um rendimento médio (baseado no número de oocistos com que foram enriquecidas as amostras, determinado pela contagem em câmara de Neubauer) entre 0,7 e 12,4%.

O valor mais baixo de CV, de 29%, obteve-se com um rendimento médio de apenas 9%, numa suspensão cuja concentração era de 20×10^4 oocistos por mL.

Das suspensões com concentração mais baixa, 20×10^2 oocistos por mL, os CV foram sempre superiores a 100% e o rendimento médio máximo foi de 10%, acrescendo o facto de alguns esfregaços não apresentarem qualquer oocisto.

Tomando como referência os critérios de validação inseridos na parte 4 do protocolo operacional padrão para a monitorização de oocistos de *Cryptosporidium* na água de consumo da DWI (1998), do Reino Unido, só serão de validar os resultados quando o CV e o rendimento (R) forem, respectivamente, inferior e superior a 30% ($CV < 30\% < R$).

Por aqueles critérios, a validade dos resultados obtidos neste estudo pelas técnicas tinturiais (apresentados nos quadros 3.1 a 3.5) é rejeitada, porque todos os CV encontrados foram muito superiores a 30% e o rendimento médio foi sempre muito inferior a 30%, com excepção de um grupo de quatro esfregaços cujo CV foi de 29%, mas no qual o rendimento médio foi de apenas 9%, o que faz com que seja também rejeitado.

4.3.2 – Separação imunomagnética e coloração por imunofluorescência

Aplicando os mesmos critérios de validação, $CV < 30\% < R$, referidos no ponto anterior, aos resultados obtidos no nosso estudo pela metodologia de filtração por filtro-cápsula, separação imunomagnética e coloração por imunofluorescência, verifica-se que todos os valores por nós encontrados satisfazem aquelas condições de validade.

O coeficiente de variação (CV), de 9,6 e 10,5%, foi muito inferior e o rendimento médio (R), de 88,6 e 80,6, foi muito superior aos 30% definidos como valor de fronteira de validação exigido pela DWI (1998) para a monitorização de oocistos de *Cryptosporidium* na água de consumo sujeita a pré tratamento no Reino Unido.

O número de ensaios e o número de oocistos por nós utilizados no enriquecimento de amostras, para avaliar este método, respeita o exigido pela EPA (1999) para estabelecimento da competência de um laboratório demonstrar o controlo sobre o método analítico e gerar rendimento e precisão aceitáveis.

A EPA impõe um mínimo de quatro ensaios com amostras de água destilada enriquecidas cada uma com oocistos entre 100 e 500. Nós fizemos cinco ensaios com amostras enriquecidas: quatro amostras com cerca de 92 e uma com cerca de 31 oocistos.

Os critérios de aceitação de execução do ensaio da EPA (1999) estabelecem limites de rendimento médio entre 19 e 100% e um desvio padrão relativo máximo de 54. O rendimento médio de 88,4% e o desvio padrão de 5,7 por nós obtido satisfazem aqueles critérios de aceitação.

Os dois ensaios com água de consumo público sem enriquecimento com oocistos, pelo método em discussão, serviram como controlo negativo dos ensaios e simultaneamente serviram o nosso propósito de pesquisar a eventual ocorrência de oocistos na água da rede pública.

A não detecção de oocistos nos dois esfregaços correspondentes às amostras de água da rede pública não enriquecidas com oocistos, ao mesmo tempo que controlaram o método, deram-nos a indicação de ausência de oocistos naquelas amostras de água.

4.3.2.1 – Significância estatística do número de amostras analisadas

Para uma avaliação com alguma fiabilidade da água de consumo público da rede de abastecimento do Porto seria necessário analisar um número de amostras muito maior, com distribuição de colheitas que cobrisse a cidade e especialmente a origem da rede de abastecimento.

Estudos feitos noutros países referem percentagens de amostras de água de consumo, com a mesma origem, positivas para *Cryptosporidium*, variando dos 3% aos 50% (Loowery *et al.*, 2001; Jiggins, 2001; Schor, 2000).

Isto quer dizer que para se realizar uma investigação da prevalência e distribuição de oocistos de *Cryptosporidium* na água de consumo, com resultados com significância estatística, pode ser necessário analisar um número elevado de amostras da mesma origem. Uma investigação com uma eventual baixa percentagem de positividade de amostras, por exemplo, 3%, como poderia ser o nosso caso, poderia exigir um número de amostras analisadas na ordem das centenas.

Como o custo de análise de cada amostra pelo método IMS-FA é de cerca de 190€, com as sete amostras analisadas ultrapassámos a verba de cerca de 1.050€ de que dispúnhamos para este estudo. Por esta razão o nosso estudo teve de limitar-se à avaliação e implementação deste método analítico.

5 – Conclusão

Neste estudo avaliou-se o uso de métodos convencionais (concentração e coloração) habitualmente utilizados para a pesquisa e identificação de oocistos nas fezes, designadamente centrifugação, filtração e coloração por safranina-azul de metileno, coloração de Heine e *acid-fast* modificada por Kinyoun, quando aplicadas na água com a mesma finalidade.

Avaliou-se também o método de concentração de amostras de água por filtração através de filtro-cápsula, purificação dos oocistos por separação imunomagnética e coloração por imunofluorescência.

O uso de métodos convencionais usados correntemente em amostras fecais, para a detecção, identificação e quantificação de oocistos, revelou-se, neste estudo, inadequado para a sua aplicação na água. O rendimento mostrou-se muito baixo e os resultados inconsistentes.

Contrariamente, o método de concentração de amostras de água por filtração através de filtro-cápsula, purificação dos oocistos por separação imunomagnética e coloração por imunofluorescência mostrou rendimentos elevados, entre 80,6 e 88,6%, e elevada consistência, com coeficientes de variação entre 7,0 e 10,5%, indicando a sua aplicabilidade na detecção, identificação e quantificação de oocistos na água.

Duas amostras de água de consumo público, de 10 litros cada, mostraram-se negativas para a presença de oocistos. Isto significa apenas que naquele local de colheita, naquele momento e naquela quantidade de amostra não foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* na água da rede de abastecimento público, não garante a ausência de oocistos na água de consumo da rede pública.

Com este trabalho ficam, no laboratório de parasitologia do INSA-Porto, implementadas as condições laboratoriais capazes de proceder à investigação da prevalência e distribuição de oocistos de *Cryptosporidium* na água, pelo método de filtração por filtro-cápsula, separação imunomagnética e coloração por imunofluorescência (Method 1622 – EPA, 1999).

Dado ser importante conhecer, de forma sistematizada, a prevalência e distribuição geográfica da criptosporidiose humana em Portugal, é necessário estabelecer um plano a nível nacional que permita fazer uma avaliação da situação. É necessário, por um lado, fazer a pesquisa, identificação e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* na água destinada ao consumo público e na usada em actividades aquáticas desportivas e de lazer e, por outro, sistematicamente, submeter a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* todas as amostras de fezes enviadas aos laboratórios para exame parasitológico durante um determinado período.

Dado haver diferenças na virulência, patogenicidade, infecciosidade e sensibilidade às drogas entre as estirpes e dentro da mesma estirpe entre os genótipos (Morgan *et al.*, 1999), a avaliação da extensão e da natureza da variação genética do *Cryptosporidium* é um requisito essencial, particularmente em situações de surto, para determinar a fonte de infecção e de contaminação ambiental (Morgan *et al.*, 1998a; Morgan *et al.*, 1998b; Morgan *et al.*, 1999; Fayer, 1999; Fayer, Morgan e Upton, 2000).

A metodologia da separação imunomagnética-coloração por imunofluorescência (IMS-FA) não satisfaz aquele requisito. Tal é conseguido pela PCR (Carraway, Tzipori e Widmer, 1996; Morgan *et al.*, 1998a; Morgan *et al.*, 1998b; Morgan *et al.*, 1999; Fayer, 1999, 2000; Monis e Saint, 2001; Lowery *et al.*, 2001; Higgins, 2001)

Após o diagnóstico da situação de Portugal quanto à prevalência e distribuição, extensão e natureza da variação genética do *Cryptosporidium*, talvez possa justificar-se que só quando se verifique o incumprimento de determinado valor paramétrico (presença de *Clostridium perfringens*) na água de consumo público deva ser investigado todo o sistema de fornecimento da água de consumo humano para «identificar a existência de risco para a

Detecção, Identificação e Quantificação de Oocistos de *Cryptosporidium parvum* na Água: Métodos Convencionais e Imunofluorescência pós-Separação Imunomagnética

saúde humana devido à presença de outros microrganismos patogénicos, por exemplo Cryptosporidium», como se deduz da nota 2, parte C, anexo I do Decreto-Lei n.º 243/2001.

BIBLIOGRAFIA

- ACHA, P.N. e SZYFRES, B. (1989) – *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals* (2ª ed.), Washington: Pan American Health Organization.
- AZEVEDO, C. (1989) – Ultrastructural Observations of *Cryptosporidium* sp. Parasite of *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Journal of Intervertebrate Pathology*, **54**: 23-27.
- BARTLETT, J.A. (1998) – Cryptosporidiosis, *Project Inform*, <http://www.projinf.org/fs/cryptos.html>.
- BAXBY, D.; BLUNDELL, N. e HART C.A. (1984) – The Development and Performance of a Simple, Sensitive Method for the Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Faeces, *Journal of Hygiene, Cambridge*, **92**: 317-323.
- BUKHARI, Z.; McCUIN, R.M.; FRICKER, C.R. e CLANCY, J.L. (1998). Immunomagnetic Separation of *Cryptosporidium parvum* from Source Water Samples of Various Turbidities, *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(11): 4495-4499.
- CAMPBELL, A.T.; ROBERTSON, L.J. e SMITH, H.V. (1992) – Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts: Correlation of In Vitro Excystation with Inclusion or Exclusion of Fluoregenic Vital Dyes, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(11): 3488-3493.
- CARRAWAY, M.; TZIPORI, S. e WIDMER, G. (1996) – Identification of Genetic Heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* Ribosomal Repeat, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(2): 712-716.
- CDC (1999) – Diagnostic Procedures for Stool Specimens, http://www.dpd.cdc.gov/dpdxHTML/Frames/DiagnosticProcedures/body_dp_stoolstaining.htm.
- CLARK, D.P. e SEARS, C.L. (1996) – The Pathogenesis of Cryptosporidiosis, *Parasitology Today*, **12**(6): 221-225.
- DOING, K.M.; HAMM, J.L.; JELLISON, J.A.; MARQUIS, J.A. e KINGSBURY, C. (1999) – False-Positive Results Obtained with the Alexon ProSpect *Cryptosporidium* Enzyme Immunoassay, *Journal of Clinical Microbiology*, **37**(5): 1582-1583.
- DRIEDGER, A.M.; RENNECKER, J.L.; e MARIÑAS, B.J. (2001) – Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts with Ozone and Monochloramine at Low Temperature, *Water Research*, **35**(1): 41-48.
- DRIEDGER A.M.; RENNECKER, J.L.; e MARIÑAS, B.J. (2000) – Sequential Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts With Ozone and Free Chlorine, *Water Research*, **34**(14): 3591-3597.
- DUPONT, C.; BOUGNOUX, M.E.; TURNER, L.; ROUVEIX, E. e DORRA, M. (1996) – Microbiological Findings about Pulmonary Cryptosporidiosis in Two AIDS Patients, *Journal of Clinical Microbiology*, **34**(1): 227-229.
- DWI-Drinking Water Inspectorate (1998) – Standard Operating Protocol for the Monitoring of *Cryptosporidium* Oocysts in Treated Water Supplies to Satisfy Water Supply (Water Quality) Amendment Regulations 19XX, SI XXX (Draft). Reino Unido.

- DWORKIN, M.S.; GOLDMAN, D.P.; WELLS, T.G.; KOBAYASHI, J.M. e HERALDT, B.L. (1996) – Cryptosporidiosis in Washington State: An Outbreak with Well Water, *The Journal of Infectious Diseases*, **174**: 1372-1376.
- EPA-Environmental Protection Agency (1999) – Method 1622: Cryptosporidium in Water by Filtration/IMS/FA. Estados Unidos.
- FAYER, R. (1994) – Effect of High Temperature on Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Water, *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(8): 2732-2735.
- FAYER, R. (Edit.) (1999) – Basic Biology of *Cryptosporidium*, Division of Biology, Kansas State University, <http://www.ksu.edu/parasitology/basicbio>.
- FAYER, R. (Edit.) 2000 – Basic Biology of *Cryptosporidium*, Division of Biology, Kansas State University. <http://www.ksu.edu/parasitology/basicbio>.
- FAYER, R.; MORGAN, U. e UPTON, S.J. (2000) – Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, Detection and Identification. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1305-1322.
- FDA-FOOD & DRUG ADMINISTRATION (2000) – *Cryptosporidium parvum*, *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Center for Food Safety & Applied Nutrition*, Estados Unidos da América. <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap24.html>.
- FERREIRA, M.L.; LOPES, A.; LOBO, O.; LITO, L.M.; SALGADO, M.J. e ANTUNES, F. (1995) – Criptosporidiose Disseminada num Doente com SIDA. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, **3-4**: 235-238.
- FORNEY, J.R.; YANG, S. e HEALEY, M.C. (1996) – Protease Activity Associated with Excystation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts, *The Journal of Parasitology*, **82**(6): 889-892.
- FRENCH, K.; GUEST, R.K.; FINCH, G.R. e HAAS, C.N. (2000) – Correlating *Cryptosporidium* Removal Using Dissolved Air Flotation in Water Treatment. *Water Research*, **34**(16): 4116-4119.
- FRICKER, C. (2000) – Waterborne Cryptosporidiosis: Current Methods and Comparison of Efficiencies for the Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts, *Culture*, **21**(1): 6-8.
- FRICKER, C. e CLANCY, J. (1998) – Crypto's Protocol Prospects, *Water Quality International*, (Maio/Junho): 11-15.
- GARCIA, L.S. (1990) – Laboratory Methods for Diagnosis of Parasitic Infections, in Baron, E.J. e Finegold S.M. (Eds.), *Diagnostic Microbiology* (8ª ed.). Ed. por The C. V. Mosby Company: St. Louis, Baltimore, Philadelphia, Toronto. 776-861.
- GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. e BRUKNER, D.A. (1994) – Detection of Microsporidial Spores in Fecal Specimens from Patients Diagnosed with Cryptosporidiosis, *Journal of Clinical Microbiology*, **32**(7): 1739-1741.
- GIBSON, C.J.; HAAS C.N. e ROSE J.B. (1998) – Risk Assessment of Waterborne Protozoa: Current Status and Future Trends. *Parasitology*, **117**: S205-S212.
- GOLDSTEIN, Susana T. *et al.*. «Cryptosporidiosis: An Outbreak Associated with Drinking Water Despite State-of-the-Art Water Treatment». *Annals of Internal Medicine*, <http://www.acponline.org/journals/annals/01mar96/cryptosp.htm>.
- GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; FAYER, R. e ANDERSON, M.S. (1996) – Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Are Retained upon Intestinal Passage through a Refractory Avian Host. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(9): 3234-3237.

- GRACZYK, T.K.; FAYER R. e CRANFIELD, M.R. (1997) – Zoonotic Transmission of *Cryptosporidium parvum*: Implications for Water-borne Cryptosporidiosis, *Parasitology Today*, **13**(9): 348-351.
- HANNAHS, G. (s.d.) – *Cryptosporidium parvum*: an Emerging Pathogen. Kenyon College, <http://www2.kenyon.edu/depts/biology/slouc/bio38/hannaahs/crypto.htm>.
- HANSEN, J.S. e ONGERTH, J.E. (1991) – Effects of Time and Watershed Characteristics on the Concentration of *Cryptosporidium* Oocysts in River Water, *Applied and Environmental Microbiology*, **57**(10): 2790-2795.
- HARP, J.A. e SACCO, R.E. (1996) – Development of Cellular Immune Functions in Neonatal to Weanling Mice: Relationship to *Cryptosporidium Parvum* Infection. *Journal of Parasitology*, **82**(2): 245-249.
- HARP, J.A.; FAYER, R.; PESCH, B.A. e JACKSON, G.J. (1996) - Effect of Pasteurization on Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Water and Milk, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(8): 2866-2868.
- HARP, JAMES A.; WHITMIRE, W.M. e SACCO, R. (1994) – In Vitro Proliferation and Production of Gamma Interferon by Murine CD4⁺ Cells in Response to *Cryptosporidium Parvum* Antigen, *Journal of Parasitology*, **80**(1): 67-72.
- HENRY, J.B. (1991) – *Clinical & Diagnosis Management by Laboratory Methods* (18^aed.), Filadélfia, Londres, Toronto, Montreal, Sidney, Tóquio, W.B. Saunders Company.
- HEYWORTH, M.F. (1992) – Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, **166**: 465-472.
- HSU, B.; HUANG, C.; HSU, Y.; JIANG, G. e HSU, C.L. (2001) – Evaluation of Two Concentration Methods for Detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in Water, *Water Research*, **35**(2): 419-424.
- HUGGINS, D.W. (1988) – Criptosporidiose. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, Ano II, **4**: 211-215.
- IGNATIUS, R.; LEHMANN, M.; MIKSITS, K.; REGNATH, T.; ARVAND, M.; ENGELMANN, E.; FUTH, U.; HAHN, H. e WAGNER, J. (1997) – A New Acid-Fast Trichome Stain for Simultaneous Detection of *Cryptosporidium parvum* and Microsporidial Species in Stool Specimens, *Journal of Clinical Microbiology*, **35**: 446-449.
- JIGGINS, P. (2001) – Drinking Water Directive and *Cryptosporidium*. Sustaining the Future – Environmental Health Conference an Exhibition, Bournemouth International Centre, Reino Unido, 10-13 de Setembro. http://cieh.mondosearch.com/cgi-bin/MsmGo.exe?grab_id=47591608&EXTRA_ARG=.
- JOHNSON, D.W.; PIENIAZEK, N.J.; GRIFFIN, D.W.; MISENER, L. e ROSE, J.B. (1995) – Development of a PCR Protocol for Sensitive Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Water Samples, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(11): 3849-3845.
- KAGERUKA, P.; BRANDT, J.R.A.; TAELMAN, H e JONAS, C. (1984) – Modified Köster Staining Method for the Diagnosis of Cryptosporidiosis, *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* **54**: 171-175.
- KANG e MATHAN, M.M. (1996) –A Comparison of Five Staining Methods for Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Faecal Specimens from the Field, *Indian Journal Medicine Research*, **103**: 264-266.
- KORICH, D.G.; MEAD, J.R.; MADORE, M.S.; SINCLAIR, N.A. e STERLING, C.R. (1990) – Effects of Ozone, Chlorine Dioxide, Chlorine and Monochloramine on *Cryptosporidium parvum* Oocyst Viability, *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(5): 1423-1428.

- KOTLER, D.P (1989) – Diarreia na Sida: Diagnóstico e Tratamento, *Momento Médico* **29**(11): 9–15.
- LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D. e LEE, R.G. (1991a) – *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Filtered Drinking Water Supplies, *Applied and Environmental Microbiology*, **57**(9): 2617-2621.
- LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D. e LEE, R.G.(1991b) – Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Surface Water Supplies, *Applied and Environmental Microbiology*, **57**(9): 2610-2616.
- LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; SIEGEL, J.E. e ABBASZADEGAN, M. (1995) – Evaluation of the Immunofluorescence Procedure for Detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Water, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(2): 690-697.
- LENG, X.; MOSIER, D.A.; e OBERST, R.D. (1996) – Simplified Method for Recovery and PCR Detection of *Cryptosporidium* DNA from Bovine Feces, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(2): 643-647.
- LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; MILLAR, B.C.; MCCORRY, K.A.; XU, J.; ROONEY, P.J. e DOOLEY, J.S. (2001) – Occurrence and Molecular Genotyping of *Cryptosporidium* spp. in Surface Waters in Northern Ireland, *Journal of Applied Microbiology*, **91**(5): 774-779.
- LUMSDEN, W.H.R. e McMILLAN, A. (1993) – Protozoários, in J. G. Collee, J. P. Duguid, A. G. Fraser, B. P. Marmion (Ed.), *Microbiologia Médica*, 6ª ed.; trad. Maria Serpa Santos; edit. por Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1039-1092.
- MAYER, C.L. e PALMER C.J. (1996) – Evaluation of PCR, Nested PCR, and Fluorescent Antibodies for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Species in Wastewater, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(6): 2081-2085.
- McANULTY, J.M.; FLEMING, D.W. e GONZALEZ, A.H. (1994) – A Community-Wide Outbreak of Cryptosporidiosis Associated with Swimming at a Wave Pool, *Journal of American Medical Association*, **272**(20): 1597-1600.
- MEAD, J.R.; ARROWOOD, M.J.; SIDWELL, R.W. e HEALEY, M.C. (1991) – Chronic *Cryptosporidium parvum* Infections in Congenitally Immunodeficient SCID and Nude Mice, *The Journal of Infectious Diseases*, **163**: 1297-1304.
- MELONI, B.P. e THOMPSON, R.C.A. (1996) – Simplified Methods for Obtaining Purified Oocysts from Mice and for Growing *Cryptosporidium parvum* in Vitro, *The Journal of Parasitology*, **82**(5): 757-762.
- MILLARD, P.S.; GENSHEIMER, K.F.; ADDISS, D.G.; SOSIN, D.M.; BECKETT, G.A.; HOUCK-JANKOSKI, A. e HUDSON, A. (1994) – An Outbreak of Cryptosporidiosis From Fresh-Pressed Apple Cider. *Journal of American Medical Association*, **272**(20): 1592-1596.
- MMWR-Morbidity and Mortality Weekly Report (1995) – *Assessing the Public Health Threat Associated with Waterborne Cryptosporidiosis*, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), **44**(RR-6), cwus@cdc.gov.
- MMWR-Morbidity and Mortality Weekly Report (1997) – *Case Definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance*, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, **46**(RR-10).
- MMWR-Morbidity and Mortality Weekly Report (1997) – *USPHS/IDSA Guidelines for the Prevention of Opportunistic Infections in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus*, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), **46**(RR-12), cwus@cdc.gov.

- MONIS, P.T. e SAINT, C.P. (2001) – Development of a Nested-PCR Assay for the Detection of *Cryptosporidium parvum* in Finished Water, *Water Research*, **35**(7): 1641-1648.
- MORGAN, U.M.; XIAU L.; FAYER R.; LAL A.A. e THOMPSON, R.C.A. (1999) – Variation in *Cryptosporidium*: Towards a Taxonomic Revision of the Genus, *International Journal for Parasitology*, **29**: 1733-1751.
- MORGAN, U.M.; DEPLAZES, P.; FORBES, D.A.; SPANO, F.; HERTZBERG, H.; SARGENT, K.D.; ELLIOT, A. e THOMPSON, R.C.A. (1998a) – Molecular Characterization of *Cryptosporidium* from various Hosts, *Parasitology*, **117**: 31–37.
- MORGAN, U.M.; DEPLAZES, P.; FORBES, D.A.; SPANO, F.; HERTZBERG, H.; SARGENT, K.D.; ELLIOT, A. e THOMPSON, R.C.A. (1998b) – Sequence and PCR–RFLP analysis of the Internal Transcribed Spacers of the rDNA Repeat Unit in Isolates of *Cryptosporidium* from Different Hosts, *Parasitology*, **118**: 49–58.
- MOSS, D.M.; CHAPPELL, C.L.; OKHUYSEN, P.C.; DUPONT, H.L.; ARWOOD, M.J.; HIGHTOVER, A.W. e LAMIE, P.J. (1998) – The Antibody Response to 27-, 17-, and 15-kDa *Cryptosporidium* Antigens Following Experimental Infection in Human, *The Journal of Infectious Diseases*, **178**: 827-833.
- MOURA, R.A.A.; PURCHIO, A.; ROSSI, A.R.; STRUFALDI, B.; NOGEIRA, D.M.; HOXTER, G.; COUTINHO, J.O.; ALMEIDA, T.V. (1982) – *Técnicas de Laboratório*, 2ª ed., Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, S. Paulo.
- MÜLLER, H.M.; RANUCCI, L.; POZIO, E. e CRISANTI, A. (1993) – A Method for Collecting Large Quantities of *Cryptosporidium* Parasites, *Parasitology Today*, **9**(7): 261-263.
- NIEMINSKI, E.C.; SCHAEFER III, F.W. e ONGERT, J.E. (1995) – Comparison of Two Methods for Detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Water, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(5): 1714-1719.
- ODA, T.; SAKAGAMI, M.; ITO, H. YANO, H.; RAI, S.K.; KAWABATA, M. (2000) – Size Selective Continuous Flow Filtration Method for Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*, *Water Research*, **34**(18): 4477-4481.
- ONG, C.; MOOREHEAD, W.; ROSS, A. e ISAAC-RENTON, J. (1996) – Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in Two Adjacent Watersheds, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(8): 2798-2805.
- PETERSEN, C. (1993) – Cellular Biology of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology Today*, **9**(3): 87-91.
- PLORDE, J.J. (1987) – Cryptodisiosis and Other Protozoan Infections, in *Harrison's Principles of Internal Medicine* (11ªed.), pp. 801-863.
- PRIEST, J.W.; KWON, J.P.; MOSS, D.M.; ROBERTS, J.M.; ARWOOD, M.J.; DWORKIN, M.S.; JURANEK, D.D. e LAMMIE, P.J. (1999) – Detection by Enzyme Immunoassay of Serum Immunoglobulin G Antibodies That Recognise Specific *Cryptosporidium parvum* Antigens, *Journal of Clinical Microbiology*, **37**(5): 1385–1392.
- RASMUSSEN, K.R.; HEALEY, M.C.; CHENG, L. e YANG, S. (1995) – Effects of Dehydroepiandrosterone in Immunossuppressed Adult Mice Infected With *Cryptosporidium Parvum*, *The Journal of Parasitology*, **81**(3): 429-433.
- REHG, E.J. (1991) – Activity of Azithromycin against Cryptosporidia in Immunossuppressed Rats, *The Journal of Infectious Diseases*, **163**: 1293–1296.
- RENNECKER, J.L.; DRIEDGER, A.M.; RUBIN, S.A. e MARIÑAS, B.J. (2000) – Synergy in Sequential Inactivation of *Cryposporidium parvum* with Ozone/Free Chlorine and Ozone/Monochloramine, *Water Research*, **34**(17): 4121-4130.

- ROBERTSON, L.J.; CAMPBELL, A.T. e SMITH, H.V. (1992) – Survival of *Cryptosporidium parvum* Oocysts under Various Environmental Pressures, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(11): 3494-3500.
- ROBERTSON, L.J.; PATON, C.A.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, P.G.; JACKSON, M.H.; GILMOUR, R.A.; BLACK, S.E.; STEVENSON, D.A. e SMITH, H.V. (2000) – Giardia Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts at Sewage Treatment Works in Scotland, UK. *Water Research*, **34**(8): 2310-2322.
- RODGERS, M.R.; FLANIGAN, D.J. e JAKUBOWSKI, W. (1995) – Identification of Algae Which Interfere with the Detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts and a Method for Alleviating This Interference, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(10): 3759-3763.
- RUFFELL, K.M.; RENNECKER, J.L. e MARÍÑAS, B.J. (2000) – Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts with Chlorine Dioxide, *Water Research*, **34**(3): 868-876.
- SCHOR, G. (2000) – *Germe que Causa Diarreia É Detectado em Água Tratada*, <http://www.estado.estadao.com.br/edicao/pano/00/03/16/cid964.html>.
- SHEPHERD, K.M. e WYN-JONES, A.P. (1996) – An Evaluation of Methods for the Simultaneous Detection of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts from Water, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(4): 1317-1322.
- SMITH, H.V. (1998) – Detection of Parasites in the Environment, *Parasitology*, **117**: S113-S141.
- SMITH, H.V. e ROSE, J.B. (1990) – Waterborne Cryptosporidiosis, *Parasitology Today*, **6**(1): 8-12.
- SMITH, N.; ECKERT, J. e BRAUN, R. (1993) – Coccidiosis Research in Europe, *Parasitology Today*, **9**(7): 236-239.
- STINEAR, T.; MATUSAN, A.; HINES, K. e SANDERY, M. (1996) – Detection of a Single Viable *Cryptosporidium parvum* Oocyst in Environmental Water Concentrates by Reverse Transcription-PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(9): 3385-3390.
- SURESH, P. e REHG, J.E. (1996) – Comparative Evaluation of Several Techniques for Purification of *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Rat Feces, *Journal of Clinical Microbiology*, **34**(1): 38-40.
- SWALES, C. e WRIGHT, S. (2000) – Evaluation of a Continuous Flow Centrifuge for Recovery of *Cryptosporidium* Oocysts from Large Volume Water Samples, *Water Research*, **34**(6): 1962-1966.
- THURSTON, J.A.; GERBA, C.P.; FOSTER, K.E. e KARPISCAK, M.M. (2001) – Fate of Indicator Microorganisms, *Giardia* and *Cryptosporidium* in Subsurface Flow Constructed Wetlands, *Water Research*, **35**(6): 1547-1551.
- TOMÁS, A.M.; ANTUNES, F. e ARAÚJO F.C. (1986) – *Cryptosporidium* e Criptosporidiose, *Separata do «Jornal do Médico»*, **CXX** (2154): 5-8.
- TSAI, Y.L. e OLSON, B.H. (1992) – Rapid Method for Separation of Bacterial DNA from Humic Substances in Sedimentes for Polymerase Chain Reaction, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(7): 2292-2295.
- VILLACORTA, I.; ARES, E.; DEL MOLINO, P.L.; BAJO, T. e FANDIÑO-SALORIO, L. (1988) – Criptosporidiosis Experimental en Ratonos, *Revista Ibérica de Parasitología*, **48**(2): 133-137.
- WAGNER-WIENING, C. e KIMMIG, P. (1995) – Detection of Viable *Cryptosporidium parvum* Oocysts by PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(12): 4514-4516.

- WALLIS, P.M.; ERLANDSEN, S.L.; ISAAC-RENTON, J.L.; OLSON, M.E.; ROBERTSON, W.J. e VAN KEULEN, H. (1996) – Prevalence of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts and Characterization of *Giardia* spp. Isolated from Drinking Water in Canada, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(8): 2789-2797.
- WEBSTER, K.A.; SMITH, H.V.; GILES, M.; DAWSON, L. e ROBERTSON, L.J. (1996) – Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Faeces: Comparison of Conventional Coproscopical Methods and the Polimerase Chain Reaction, *Veterinary Parasitology*, **61**: 5-13.
- WEBSTER, K.A. (1993) – Molecular Methods for the Detection and Classification of *Cryptosporidium*, *Parasitology Today*, **9**(7): 263–266.
- WEIL, J.H. (1983) – *Bioquímica Geral*. 4ª ed., trad. do original francês *Biochimie Générale* por Maria Celeste Lechner. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa
- WGWC-Working Group on Waterborne Cryptosporidiosis (1997) – *Cryptosporidium and Water: A Public Health Handbook*. Atlanta, Georgia, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), U.S.
- WIDMER, G.; CARRAWAY, M. e TZIPORI, S. (1996) – Water-borne *Cryptosporidium*: A Perspective from the USA, *Parasitology Today*, **12**(7): 286-290.
- WIDMER, G.; TZIPORI S.; FICHTENBAUM C.J. e GRIFFITHS J.K. (1998) – Genotypic and Phenotypic Characterization of *Cryptosporidium parvum* Isolates from People with AIDS, *The Journal of Infectious Diseases*, **178**: 834–840.