

Pesquisa de *Cryptosporidium sp* em águas de fontes naturais e comparação com análises bacteriológicas.

Research on *Cryptosporidium sp* in water from natural springs and comparison with bacteriological analysis.

Aparecida H. de S. GOMES¹ *
Marina A. S. R. PACHECO²
Yara S. K. FONSECA²
Noemi . P. A. CESAR¹
Heloisa G. G. DIAS²
Rosana P. da SILVA²

RIALA6/919

Gomes, A. H. de S et al. Pesquisa de *Cryptosporidium sp* em águas de fontes naturais e comparação com análises bacteriológicas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(1):59-63, 2002

RESUMO: Estudos para verificar a ocorrência, epidemiologia e fatores de risco associados com surtos de doenças intestinais de veiculação hídrica, tais como as gastroenterites bacterianas e virais vem possibilitando estratégias de vigilância e controle destas infecções. No entanto os surtos causados por agentes parasitários ainda necessitam de maior atenção, a inexistência de metodologia padronizada para detecção em alguns alimentos e águas, dificultam o esclarecimento e conseqüentemente há sub-notificação de casos. Este estudo teve por objetivo demonstrar a presença de agentes bacterianos e parasitários nas águas de sete fontes naturais de utilidade pública localizadas nos municípios de Sorocaba e Votorantim - Estado de São Paulo, analisar fatores ambientais e as condições de manutenção das fontes. Para a pesquisa parasitológica foram utilizadas diferentes técnicas de concentração; o sedimento examinado em microscopia óptica, esfregaços corados pela Auramina e Kinyoun observados em objetiva de imersão. No exame bacteriológico utilizou-se os métodos de referência “Standart Methods for the examination of water and wastewater” e “Compendium of methods for the microbiological examination of foods”. No exame bacteriológico todas as amostras apresentaram contaminação por coliformes totais e seis por coliformes fecais. No exame parasitológico 3 amostras apresentaram larvas de diferentes morfologias, sendo que uma delas apresentou oocistos de *Cryptosporidium sp*, ovos pertencentes a superfamília *Oxyuroidea* e cistos de *Endolimax nana*. Outra amostra apresentou formas císticas de amebídeos. Todas as fontes estudadas apresentavam condições precárias de manutenção.

PALAVRAS-CHAVE. *Cryptosporidium sp*, águas de fontes naturais, análises bacteriológicas.

Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Sorocaba
Seção de Biologia Médica – ¹ área de Parasitologia. ² Microbiologia Alimentar

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Sorocaba – Seção de Biologia Médica – área de Parasitologia - Av. Comendador Pereira Inácio, 105 – CEP -18.300-000 – Sorocaba - SP. - e-mail: asgomes.sor@terra.com.br

O protozoário do gênero *Cryptosporidium* foi descrito em 1907 por E.E.TIZZER encontrado parasitando glândulas gástricas de camundongos e denominado *Cryptosporidium muris*²⁰.

Diferentes espécies foram isoladas de diversos hospedeiros tais como suínos, répteis, aves, felídeos, bovinos, eqüinos e humanos^{2, 3, 5, 6}.

A criptosporidiose pode acometer pessoas em seu estado imunológico competente, apresentando quadros de moderada ou nenhuma gravidade, formas assintomáticas ou distúrbios gastrointestinais de curta duração evoluindo espontaneamente para cura. Entretanto em pessoas com o sistema imunológico comprometido, portadores de AIDS, transplantados, doentes auto-imunes, pacientes em tratamento do câncer, provoca sintomas agudos, incluindo diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos, febre, mal estar, problemas respiratórios e infecção persistente, de longa duração, na maioria dos casos de difícil tratamento, podendo levar o paciente à morte^{4, 5}.

A criptosporidiose, considerada uma zoonose, hoje apresenta novo conceito, sendo enquadrada também como uma antropozoonose, devido à descoberta de diferentes genótipos de *C. parvum* em pacientes HIV positivos (genótipo antropozoonótico 1 e genótipo zoonótico 2) onde a transmissão do genótipo 1 ocorre somente de pessoa a pessoa.²³ Os alimentos e água contaminados com oocistos são veículos de transmissão, considerando as condições de saneamento ambiental e a falta de hábitos de higiene^{7, 8, 9}.

As espécies de *Cryptosporidium* possuem características morfológicas semelhantes, entretanto algumas apresentam variação em relação ao diâmetro dos oocistos, permitindo sua diferenciação. Técnicas de maior complexidade devem ser utilizadas para identificação de espécies e subespécies de *Cryptosporidium*. Isto permite melhor compreensão sobre sua epidemiologia.^{2, 3}

Fatores ambientais e geográficos contribuem para que os oocistos de *Cryptosporidium* contaminem águas de nascentes, rios e alimentos (verduras e frutas) lavados ou irrigados pelas mesmas^{7, 9, 12, 25, 27}.

Inúmeros estudos tem sido direcionados para verificar ocorrência, epidemiologia, fatores de risco e associação com surtos das doenças intestinais de veiculação hídrica, as gastroenterites bacterianas (salmonelose e shigelose), parasitárias (criptosporidiose, giardíase e amebíase) e virais^{8, 9, 12, 13, 15, 17, 21, 24, 25, 28}.

Em países onde ocorreram surtos de diarreia, causados por *Giardia* e *Cryptosporidium*, a análise parasitológica da água vem sendo utilizada como um dos critérios para determinar sua potabilidade^{7, 8, 9}. A diversidade de métodos e a complexidade das técnicas para detecção destes parasitas na água têm dificultado e criado muita polêmica entre os estudiosos. Atualmente parece ter-se chegado a um consenso, os resultados obtidos apenas com um único método pode não confirmar a presença de parasita, havendo necessidade de recorrer a outros métodos confirmatórios²⁹.

Este estudo teve os objetivos: 1- verificar a presença de agentes microbianos (coliformes fecais) e parasitários (em especial

do gênero *Cryptosporidium*) nas águas não tratadas de fontes naturais. 2- Comparar e avaliar os resultados bacteriológicos e parasitológicos. 3 – Fornecer subsídios para o serviço de tratamento de águas brutas, indicando e avaliando sua eficácia.

As análises foram realizadas em 7 fontes de água bruta em locais públicos, no período de março a junho de 1996; duas fontes no município de Sorocaba-SP (fonte 1-S e 2-S) e cinco fontes no município de Votorantim - SP (1-V, 2-V, 3-V, 4-V e 5-V).

Para o exame bacteriológico da água foi utilizado o método da membrana filtrante, preconizado pelo “Standart Methods for the Examination of water and wastewater”, para pesquisa de bactérias do grupo coliformes, coliformes de origem fecal e *Salmonella sp*¹⁰.

Para a pesquisa de coliformes totais e fecais foram filtrados 100 ml de cada amostra e para pesquisa de *Salmonella sp*, 3.000 ml da amostra em membranas filtrantes 0,45 mm, estéreis, 47 mm de diâmetro. Após filtração, as membranas foram colocadas em meios específicos para posterior isolamento e identificação das bactérias, segundo metodologia oficial²².

Para a pesquisa de *Salmonella sp* foram utilizadas várias membranas para uma mesma amostra, as quais foram colocadas em caldo pré enriquecido e encubadas a 35° C por 24 horas, segundo metodologia descrita pelo “Compendium of methods for the microbiological examination of foods”^{1, 11}.

A inexistência de metodologia padronizada e as dificuldades encontradas na execução das técnicas recomendadas para análise parasitológica da água^{10, 13}, devido à indisponibilidade de equipamentos, necessidade de grande volume de água e de técnicas alternativas para confirmação, foram feitas algumas adaptações^{1, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 24, 25}.

Para efetuar as coletas das águas, utilizou-se dois procedimentos:

PROCEDIMENTOS

- a) Foram confeccionados e esterilizados sete absorventes, cada um formado por 10 dobras de gaze, de 9,1 cm de largura x 30 cm de comprimento,
- b) Para cada fonte foi determinada a vazão, usando como referência o tempo gasto para encher um galão de 10 litros.
- c) Cada absorvente foi amarrado junto ao cano de saída de água, de maneira que toda água passasse por ele. O tempo de permanência do absorvente na saída da fonte foi determinado de maneira que passassem por ele no mínimo 720 litros e no máximo 1.800 litros.
- d) Os absorventes foram recolhidos em frascos estéreis de vidro, identificados separadamente por fonte e encaminhados ao laboratório.
- e) Foram desfeitas as camadas do absorvente e lavadas individualmente em 1.000 ml de solução (Tween 80 diluído 1/100).
- f) A água resultante da lavagem foi colocada em cálices para sedimentação, por um período de no mínimo 3 e no máximo 12 horas.

- g) Os sedimentos foram armazenados em frascos identificados com o nome da fonte coletada.

PROCEDIMENTO II

- a) Foram coletados 10 litros de água em cada fonte, acondicionados em galão de polietileno novo e limpo.
b) Os dez litros foram passados em membrana filtrante – Membrana HÁ Ester de celulose, 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro, branca e lisa; a membrana foi trocada quando se encontrava saturada; estas foram colocadas em frasco de vidro de boca larga com tampa rosqueada, contendo 200 ml de Tween 80 diluído 1/100, agitados manualmente para desprender o sedimento.
c) O caldo resultante das lavagens das membranas foram centrifugados durante 20 minutos a 1.500 rpm em tubos cônicos de plásticos (50ml) com tampa rosqueada . Foi desprezado o sobrenadante e o sedimento foi armazenado como no procedimento I etapa (g).

Uma parte do sedimento foi submetida à técnica de exame direto com e sem lugol e outra ao sistema de concentração pelo sistema folmol éter modificado e confecção de esfregaço, corado primeiramente pela Auramina, observado em microscopia de fluorescência com aumento de 400X e posteriormente corado pelo Kinyoum, observado em microscopia óptica comum com objetiva de imersão.

Os resultados são apresentados na tabela 1.

Os resultados bacteriológicos demonstraram a contaminação de coliformes totais em todas as amostras analisadas. O isolamento de coliformes fecais foi obtido nas amostras provenientes das fontes 2S, 1V, 2V, 3V, 4V e 5V.

Os resultados obtidos no exame parasitológico foram negativos nas fontes 1S, 1V e 4V; para ambos procedimentos. Presença de larvas de diferentes morfologias nas fontes 2S, 3V e 5V; formas císticas de amebídeos na fonte 2V; presença de ovos da superfamília *Oxyuroidea*, cistos de *Endolimax nana* e oocistos de *Cryptosporidium sp* na amostra da fonte 3V. O procedimento I foi mais promissor que os do procedimento II, pois a quantidade de água passada pelo absorvente foi fundamental pois aumentou as chances de reter juntamente com os resíduos, cistos, oocistos, larvas e ovos.

As fontes se encontravam em diferentes localizações, mas fatores comuns foram observados: a proximidade com vegetação, com encostas de barrancos e presença de animais diversos (cavalos, cães, aves, etc.); condições precárias de proteção, manutenção, limpeza do local, alvenaria de sustentação dos canos e saída de água, com exceção da fonte 1-S que apresentava condições melhores, mas não adequadas.

A presença de coliformes totais, nematóides e protozoários na água, necessariamente não indicam a relação com espécies encontradas em humanos, podem fazer parte do ciclo de decomposição dos solos e foram arrastados até as nascentes de água. Entretanto, algumas observações devem ser consideradas, a semelhança que existe entre a morfologia dos ovos, larvas, cistos e oocistos encontrados em humanos e

em outros animais, ovos de Ancilostomídeos, *Enterobius* e *Ascaris*, larvas de *Strongyloides*, cistos de amebídeos e *Giardia* ou oocistos de *Cryptosporidium*. As condições precárias de preservação e manutenção das nascentes de água; sua trajetória até a bica onde a população local se serve e o fato de que alguns parasitos, antes descritos somente em animais ou que raramente causavam infecção em humanos como *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e outros, hoje emergem, sendo agentes causadores de surtos de diarreia. Isto leva a uma reflexão sobre novos conceitos de agentes saprófitas e patógenos, sobretudo do rompimento do equilíbrio entre simbioses.

Os regulamentos que dispõem sobre normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas, saneamento ambiental e preservação da saúde, são aprovados através de portarias do Ministério da Saúde; tem por objetivo fazer com que os órgãos (Secretárias de Saúde e do Meio Ambiente dos Estados, do Distrito Federal e dos municípios), promovam e acompanhem as adequações necessárias a seu cumprimento. As Vigilâncias Epidemiológica e Sanitária são ferramentas fundamentais neste sistema, pois estabelecem diretrizes e executam planos de ações para monitorar os níveis de contaminação e conseqüentemente os fatores de risco para a ocorrência de doenças associadas a alimentos e água.

Muitos pesquisadores ao estudarem técnicas para detecção desses agentes, conseguiram demonstrar a resistência de alguns parasitos ao hipoclorito de sódio e a outros agentes químicos e radioativos, hoje empregados nas estações de tratamento de água, demonstrando a ineficácia destes agentes sobre *Giardia* e *Cryptosporidium*, revelando situações de descontrole e insegurança .

As medidas de controle das doenças de veiculação hídrica estão diretamente ligadas à preservação e manutenção dos mananciais hídricos, ao saneamento básico e principalmente à educação para a saúde. Há necessidade de recursos financeiros, destinados à aquisição de tecnologias de ponta, pesquisa de investigação, tratamento da água e avaliação da sua eficácia, capacitação de equipes multiprofissionais para atuarem nos planejamentos e ação -estratégicas de saúde.

Este estudo, realizado com técnicas de baixa sensibilidade nos métodos parasitológicos, obteve resultados importantes que evidenciaram a contaminação ambiental nos locais estudados e contribuiu para as ações da Vigilância Epidemiológica e Sanitária do município de Votorantim e Sorocaba.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os funcionários que auxiliaram nas coletas e na execução das análises da água.

Funcionários do IAL – Sorocaba: Izabel Madornado Armelin; Salvador Antonio Cano; Vera Lúcia Palhares Cândido e Funcionários da Vigilância Sanitária / Epidemiológica de Votorantim – SP.

Tabela 1. Distribuição dos resultados bacteriológicos e parasitológicos segundo fonte de água natural.

FONTE	RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS		RESULTADOS PARASITOLÓGICOS
	Coliformes totais	Coliformes fecais	
1-S	<i>Enterobacter sp</i> <i>Citrobacter sp</i>	Negativa	Negativo
2-S	<i>Enterobacter sp</i> <i>Citrobacter sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	Larvas de diferentes morfologias
1-V	<i>Enterobacter sp</i> <i>Citrobacter sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	Negativo
2-V	<i>Proteus sp</i> <i>Klebsiella sp</i> <i>Proteus sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	Formas císticas de amebídeos
3-V	<i>Enterobacter sp</i> <i>Citrobacter sp</i> <i>Klebsiella sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	Ovos da superfamília <i>Oxyuroidea</i> Cistos <i>Endolimax nana</i> Larvas de diferentes morfologias Oocistos de <i>Cryptosporidium sp</i>
4-V	<i>Enterobacter sp</i> <i>Citrobacter sp</i> <i>Klebsiella sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	Negativo
5-V	<i>Enterobacter sp</i> <i>Citrobacter sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	Larvas de diferentes morfologias

Todas amostras apresentaram- se negativas para pesquisa de *Salmonella sp*

RIALA6/918

Gomes, A. H. de S et al Research on *Cryptosporidium sp* in water from natural springs and comparison with bacteriological analysis.. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(1):59-63, 2002

ABSTRAT. Studies that are accomplished to check the occurrence, epidemiology and risk factors to outbreaks of intestine diseases of hydric transmission such as the bacterial and viral gastroenteritis have made it possible to use strategies and control of these infections. However, the outbreaks caused by parasitic agents still need more attentions. The lack of standard methodology to detect them in different foods and water makes it difficult to clarify and, as a consequence, to subnotify the cases that have occurred. This study aimed to demonstrate the presence of bacterial and parasitic agents in seven water from natural springs of public utility located in Sorocaba and Votorantim cities – São Paulo state, analyzing environmental factors and source maintenance conditions. For the parasitological research were used different techniques of concentration: sediment was observed by optical microscopy; smears were prepared and stained by auramina and Kinyoun and were examined with oil immersion objective. The bacteriological methods were used the “Standart Methods for the examination of water and wastewater” and “Compendium of methods for the microbiological examination of foods”. The bacteriologic results showed the contamination of total coliforms in all samples, the presence of fecal coliforms was in 6 samples. The parasitologic results showed presence of larvae from different morphologies in 3 samples, one of them showed *Cryptosporidium sp.* oocysts, *Endolimax nana* cysts and *oxyuroidea* eggs. Another sample showed amoeboid cysts. All the sources showed precarious conditions of maintenance.

KEY WORDS. *Cryptosporidium sp*, water from natural springs, bacteriologic analysis.

REFERÊNCIAS:

1. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. vol. 3, 1.972
2. Balatbat, A. B. et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. **J.Clin. Microbiol.**, 34(7): 1769-1772, 1996.
3. Baker, J.; Muller, R.; Rollinson, D. Opportunistic protozoa in humans. **Advances in Parasitology**. San Diego, Academic press, 1998. v. 40.
4. Baraldi, S. R.; Marque, E. G. L.; Dias, R. M. D. S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isoospora belli* na região de Campinas, SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58 (1): 97-103, 1999.
5. Carli, G. A. De.; Saraiva, P.J. Diagnóstico de laboratório da criptosporidiose humana. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, 23(2): 26-30, 1991.
6. Cimerman, S.; Cimerman, B.; Lewi, D. S. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. **Int. J. Infect Dis.**, 3(4): 203-6, 1999.
7. Czaczyk, T.K. et al. Environmental and geographical factors contributing to watershed contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Environ res**, 82(3): 263-71, 2000.
8. Deng, M. Q.; Cliver, D. O. Comparative detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from apple juice. **Int. J. Food Microbiol**, 54(3): 155-62, 2000.
9. Dolej, S. P. et al. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Czech drinking water sources. **Schriftenr. Rev. Wasser Boden Lufthyg.**, 105: 147-51, 2000.
10. Eaton, A. D.; Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**, 19th ed., 1995. 9711 A, 9711 B, 9711 C, 10200 C – 9-109 –117.
11. Edwards, P. R.; Ewing, W. H. **Identification of enterobacteriaceae**, 3rd ed., Minneapolis, Burges publ., 1978. p. 338
12. Fayer, R. et al. Waterborne and foodborne parasites. **Food safety: Foodborne illness**, 42: 789-808, 1998.
13. Gallaher, M. M. et al. *Cryptosporidium* and surface water. **A. J. P.H January**, vol.79, n° 1, 1989.
14. Guerrant, D. L. Cryptosporidiosis: An emmerging, highly infectious threat. **Emmerging Infect Dis.**, 3(1), 1997.
15. Gelli, D. S. et al. Condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, S.P., Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 39(1): 37-43, 1979.
16. Ignatius, R. et al. Efficacy of different methods for detections of low *Cryptosporidium parvum* oocyst numbers or antigen concentrations in stool specimens. **Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis**, 16(10): 732-6, 1997.
17. Kaku, M et al. Surto alimentar por Salmonella enteritidis no Noroeste do Estado de São Paulo. **Brasil. Rev. Saúde Pública**, 29 (2): 127-31, 1995.
18. Kehl, K. S.; Cicirello, H.; Havens, P. L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. **J. Clin. Microbiol**, 33(2): 416-8, 1999.
19. Llinares, F. J. B. et al. Identifications of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Apr.1999, p1455-1458.
20. Neves, D. P. **Parasitologia Humana**, 8ª ed., Rio de Janeiro, ed. Atheneu, 1991. Cap. 17, p. 177-82.
21. Ooi, P. L. et al. A shipyard outbreak of salmonellosis traced to contaminated fruits and vegetables. **Ann Acad Med. Singapore**, 26 (5): 539 – 43, 1997.
22. Pessoa, G. V. A.; Silva, E. A. M. Milieu pour l'identification presomptive rapide des enterobacteries, des Aeromonas e des Vibrions. **Ann. Microbiol., Paris**, Seccion A 125: 341-7, 1994.
23. Pieniazek, N. J. et al. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV – infected persons. **Emerging infectious Diseases**, 5: 444-449, 1999.
24. Ryan, M. J. et al. Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. **Rev. Commun. Dis.Rep. CDR**, 6 (13): R 179-83, 1996.
25. Silva, J. P. et al. Estudo da contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nos supermercados da cidade do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 28(3): 273-41, 1995.
26. Spano, F. et al. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 3255-3259.
27. Tapia De Daza, M. S.; Diaz, R. V. Consideraciones ecologicas y de inocuidade alimentaria en productos de origen vegetal. **Arch latinoam. Nutri**, 44(4): 232-41, 1994.
28. Tymenestsky, M. C. S. T. et al. Rotavírus, adenovírus, astrovírus, calicevírus e “small round virus particles” em fezes de crianças com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na grande São Paulo. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 35(3): 275-280, 1993.
29. Widmer, G. Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. **Adv. Parasitol.**, 40: 223-39, 1998.

Recebido em 04/04/2001; Aprovado em 01/08/2002.