

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA ANÁLISE E MONITORAMENTO DE ÁGUA

Clênio Bezerra de Melo^{1,2}; Maria Regina Pires Carneiro^{1,3}; Jairo Pizzi de Assis¹; Marcelo Vieira Santos²; Luciano Ricardo Braga Pinheiro¹; Alexandre Luna Cândido^{1,2}.

Resumo - A transmissão de doenças pela água é uma questão de grande importância, que demanda esforços globais e tecnologias modernas para análise e monitoramento das reservas de água potável. Para proteger os consumidores das doenças veiculadas pela água, seria ideal que todos os patógenos fossem monitorados. Entretanto, isto não ocorre. Atualmente as técnicas moleculares constituem uma importante ferramenta utilizada no controle e monitoramento de água. Tais técnicas combinam rapidez, grande sensibilidade, especificidade e possibilita uma análise epidemiológica molecular. A amplificação de moléculas de DNA ou RNA *in vitro*, bem como de hibridização e análise filogenética, garantem uma avaliação mais adequada de possíveis contaminantes e suas interações epidemiológicas. O propósito deste trabalho é de criar uma maior compreensão das aplicações de técnicas moleculares para a análise e monitoramento da qualidade das águas utilizadas para o consumo humano e animal e estimular o desenvolvimento de novas biotecnologias empregadas em diagnóstico molecular aplicado ao controle de qualidade da água, estabelecendo estratégias que resolvam problemas específicos ou genéricos relacionados.

Abstract - The transmission of water-borne diseases is a very important matter, that requests global efforts and modern technologies for drinkable water resources analysis and monitoring. To protect consumers against water-borne diseases, it would be ideal that kinds of pathogens were monitored. However, it doesn't happen. Nowadays, molecular techniques are helpful implements used on water monitoring and control. These techniques arrange rapidity, high sensitivity, specificity and providing an epidemiological molecular analysis. The DNA or RNA molecule amplification techniques *in vitro*, as well as, hybridization and phylogenic analysis, assure an adequate evaluation

¹ Universidade Federal de Sergipe (UFS); Depto de Morfologia; Campus Universitário Prof. José Aloísio de Campos, Jardim Rosa Elze s/n; Cep: 49.100.000; São Cristovão; SE; Brasil; Fone: 79 – 212 6618; Fax: 79 – 212 6660; E-mail: virologiacomparada@bol.com.br.

² Faculdade Pio Décimo; Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva; Av. Tancredo Neves, 5655, Jabutiana; Cep: 49.095-000; Aracaju; SE; Brasil; Fone: 79 – 3041-0819; Fax: 211 3363; E-mail: cleniomelo@bol.com.br.

³ Universidade Tiradentes (UNIT); Centro de Ciências Biológicas e da Saúde; Av. Murilo Dantas 300, Farolandia; Cep: 49.027-300; Aracaju; SE; Brasil; Fone 79- 218 2116; Fax: 79 – 223 2546; E-mail: profregina@hotmail.com

of possible pathogens and their epidemiological interaction.. This project propose is to create a better understanding for molecular techniques application on animal and human-beings drinking water analysis and monitoring and stimulate new technologies development on molecular diagnosis used on water quality control, settings up techniques that solve specific or general problems related.

Palavras-Chave: qualidade de água; monitoramento molecular.

INTRODUÇÃO

Na era da globalização a qualidade assume papel relevante em vários setores, principalmente no que se refere à água. É de extrema importância à saúde pública a análise e monitoramento das reservas de água para o conhecimento das doenças de veiculação hídrica, que atinge proporções alarmantes nos países industrializados e em desenvolvimento (Kramer et al.,1996). Este problema mundial retrata a situação onde o tratamento da água é inadequado ou inexistente. A contaminação durante o armazenamento é devido à falta de aplicação das normas vigentes e limitado esclarecimento da população (AAM, 1996). Falhas mecânicas, erro humano ou deterioração da água da fonte de origem pode conduzir à ineficiência até mesmo nos melhores sistemas de tratamento e processos de desinfecção (MacKenzie et al., 1994; Roefer et al., 1996). Análises de rotina para o monitoramento da qualidade microbiológica da fonte e da água tratada, portanto, permanecerá como recurso indispensável no controle de doenças humanas e animais (Sobsey et al., 1993).

Para proteger os consumidores das doenças veiculadas pela água, seria ideal que todos os patógenos fossem monitorados. Entretanto, atualmente esta não ocorre. Muitos patógenos estão presentes sob condições específicas, em baixos níveis, comparados com outros microrganismos; conseqüentemente a maioria dos métodos utilizados na detecção destes, não indica o nível da contaminação mas unicamente se o patógeno está presente (Gray, 1994). Muitos dos métodos de detecção utilizados são laboriosos e onerosos, consomem muito tempo, requerem equipamentos sofisticados e grande perícia técnica (WHO, 1996).

Para superar os problemas anteriormente mencionados, organismos têm sido amplamente utilizados como padrão para indicar a qualidade microbiológica da água (Pipes, 1982), como bactérias (grupo dos coliformes, enterococos, etc.), vírus (bacteriófagos coliphagos) e leveduras (*Candida* spp.) (IAWPRC, 1991). Os organismos indicadores empregados na aferição do grau de poluição fecal são utilizados como modelo para avaliar a eficácia de processos de tratamento, ou

fornecer informação sobre a disponibilidade de nutrientes presentes na água capazes de suportar o crescimento bacteriano contaminante (WHO, 1996). Tais análises fornecem informações indiretas das condições de contaminação sendo passíveis de erro, subestimando a contaminação por um microrganismo específico.

Atualmente as técnicas moleculares constituem-se em importantes ferramentas no controle e monitoramento de água, uma vez que combinam rapidez, grande sensibilidade, especificidade e possibilitam uma análise epidemiológica molecular. As técnicas de amplificação *in vitro* de moléculas de ADN ou ARN, bem como de hibridização e análise filogenética, garantem uma avaliação mais adequada de possíveis contaminantes e suas interações e implicações epidemiológicas.

O propósito deste trabalho é criar maior compreensão das aplicações de técnicas moleculares para análise e monitoramento de águas de consumo humano e animal; estimular outros pesquisadores interessados no desenvolvimento de novas biotecnologias de diagnóstico molecular aplicado ao controle de qualidade da água para resolução problemas específicos ou genéricos relacionados.

TÉCNICAS MOLECULARES CORRENTES

As técnicas moleculares aplicadas ao monitoramento da água de consumo, necessitam atender as seguintes condições: disponibilidade dos reagentes (soluções ultra puras, iniciadores específicos, sistemas comerciais de amplificação, etc), tratamento especial das amostras (para eliminação de possíveis inibidores da reação), equipamentos especiais (termociclador, transluminador ultra violeta, etc), ambiente adequado livre de contaminantes e analista treinado.

Para ser utilizada, a técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR), se faz necessário o conhecimento prévio de uma seqüência de gene específico para um grupo de organismos ou uma única espécie. Tal conhecimento será utilizado na confecção dos iniciadores sintéticos que flanquearam a região a ser amplificada. Os iniciadores sintéticos podem ser desenhados com o auxílio de programas informatizados específicos para este fim, como *primers detect* e *oligo I e II*. A seqüência amplificada pode facilmente ser detectada por meios de técnicas tal como eletroforese em gel de agarose e acrilamida, hibridização, cromatografia de alta performance ou ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Esta técnica tem recentemente recebido maior atenção por permitir o estabelecimento de detecção rápida, grande especificidade, sensibilidade, aplicabilidade para qualquer grupo de microrganismo e facilidade de análise dos resultados. A PCR tem sido ainda muito utilizada para detecção direta de bactérias, fungos e parasitas em água (Bej et al., 1991a;

Toranzos e Alvarez, 1992; Mahbubani et al., 1991; Mayer e Palmer, 1996, Rochelle et al., 1997a; Alvarez et al., 1993).

A principal contribuição do uso das técnicas PCR-derivadas tem sido a da direta detecção de todos os tipos de microrganismos em amostras de água, avaliando sua viabilidade ou infectividade. A PCR é capaz de detectar qualquer região alvo no ácido nucléico intacto. Estudos utilizando técnicas PCR-derivadas foram capazes de detectar células bacterianas não-viáveis em uma amostra de água ambiental por até três semanas (Josephson et al., 1993). Estudos da viabilidade de vírus RNA detectados por PCR permitiram diferenciar partículas virais infectantes daquelas desnudas que não sobrevivem por longos períodos em água (Tsai et al., 1995). Atualmente tal análise de infectividade pode ser realizada por PCR quando apenas poderia ser determinada pelo uso de culturas de célula ou modelos animais. Alguns pesquisadores têm afirmado que a seleção de uma grande região alvo no DNA molde pode resultar na detecção de organismos unicamente viáveis (Bej et al., 1991a). O uso de transcriptase reversa PCR (RT-PCR) tem sido utilizado na detecção de organismos viáveis (Rochelle et al., 1997b; Kaucner e Stinear, 1998).

Devido a sua grande sensibilidade sua aplicação é limitada a pequenos volumes de reação e isto pode unicamente ser aplicado na detecção direta de microrganismos em águas poluídas. A técnica também necessita otimizar as concentrações de seu tampão de reação. Uma limitação da técnica da PCR é que esta indica apenas presença ou ausência, sendo necessárias variações da técnica para outras análises. Tais métodos permitem quantificação dos produtos amplificados pela PCR. Para maior contribuição diversas técnicas tem sido combinadas. A sensibilidade de métodos de detecção de bactérias podem ser melhoradas pela incorporação de uma etapa de pré-enriquecimento aumentando a viabilidade, e permitindo que mesmo em pequeno número sejam detectáveis (Koenraad et al., 1995).

A técnica cultura-celular-PCR combinada foi utilizada para detecção de enterovírus, onde os resultados estiveram disponíveis em 24 horas (Reynolds et al., 1996; Murrin e Slade, 1997). Recentemente, anticorpos fluorescentes-PCR tem sido combinado com o método de cultivo celular para detectar a infectividade de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em amostras de água (Slifko et al., 1997, Rochelle et al., 1997b).

A fim de minimizar os problemas de volume das amostras principalmente na detecção de vírus tem sido empregada a filtração em membranas especiais (Bej et al., 1991b; Payment, 1991). Para obter a sensibilidade requerida, muitos destes métodos incorporam uma concentração inicial ou procedimento de separação seletivo ou ainda combinações destas (Bej et al., 1991b); outras técnicas têm sido incorporadas, como cromatografia e separação por imunomagnetismo (Sidorowicz e Whitmore, 1995; Paul et al., 1991). O uso de algumas destas técnicas é ainda limitada por seu custo e aplicabilidade em procedimentos com volumes muito grandes acima de 25 litros.

A hibridização usando vários tipos de sondas tem sido utilizadas na detecção de bactérias patogênicas específicas, vírus e parasitas em água (Abbaszadegan et al., 1991; Dubrou et al., 1991). Dada sua baixa sensibilidade, tem sido usada principalmente para identificação de microrganismos em águas poluídas, e como um método confirmativo dos resultados da PCR (Bej et al., 1991a). A hibridização *in situ* tem sido utilizada na detecção direta de bactérias em amostras de água. Neste caso somente bactérias ativas seriam detectadas, já que a sonda é direcionada ao rRNA da bactéria; após a hibridização, os organismos podem ser detectados pela microscopia ou citometria de fluxo (Manz et al., 1993; Manz et al., 1995). Recentemente foi descrito a utilização de sondas para determinar a presença de *Cryptosporidium parvum*.

Muitos são os agentes patogênicos monitorados atualmente por técnicas moleculares, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Organismos analisados em água por técnicas moleculares.

Microrganismos	Técnica	Aplicação	Autor
Bactéria			
Escherichia (enteropatógena)	RT-PCR	Detecção e análise qualitativa e quantitativa	Espinosa-Urgel, 1999
Salmonella	RT-PCR	Detecção e análise qualitativa e quantitativa	Grant et. al., 1989
Shigella	RT-PCR	Detecção e análise qualitativa e quantitativa	Grant et. al., 1989
Vibrio	RT-PCR	Detecção e análise qualitativa e quantitativa	Grant et. al., 1989
Leptospira	RT-PCR	Detecção e análise qualitativa e quantitativa	Grant et. al., 1989
Mycobacterim	RT-PCR	Detecção e análise qualitativa e quantitativa	Grant et. al., 1989
Francisella	RT-PCR	Detecção e análise qualitativa e quantitativa	Grant et. al., 1989

Virus				
Enterovirus	ICC-PCR	Detecção de enterovirus em ambientes aquáticos		Reynolds et. al., 2001
Hepatite A	RT-PCR	Detecção de hepatite em cultura celular		Reynolds et. al., 2001
Adenovirus	RT-PCR	Detecção de adenovirus por transcriptase reversa		Cho et. al., 2000
Coxsackie A e B	RT-PCR	Detecção, qualificação e quantificação de RNA viral		Vilaginès, et. al.,1997
Rotavirus	RT-PCR	Detecção do rotavirus em água potável		Gratacap-Cavallier et. al., 2000
Retrovirus	RT-PCR	Detecção em amostra de água de rio utilizando transcriptase reversa		Cho et. al., 2000
Parvovirus	RT-PCR	Detecção de RNA pela transcriptase reversa através da reação em cadeia pela polimerase		Riddell et. al., 1999
Protozoários e Metazoários				
Entamoeba	RT-PCR	Detecção de RNA		Yvone et. al.,1999
Giardia	PCR	Identificação e análise de DNA através da reação em cadeia pela polimerase		Jaykus, 1997
Schistosoma	RT-PCR	Identificação e análise de RNA através da transcriptase reversa		Kalpa et. al.,1998
Ascaris	RT-PCR	Identificação e análise de RNA através da transcriptase reversa		Selim et. al., 1999
Trichuris	RT-PCR	Identificação e análise de RNA através da transcriptase reversa		David, et. al., 1999
Cryptosporidium	PCR-RFLP	Detecção e controle de parasitas em água		Xiao et. al., 2001
Legionella	PCR	Detecção e identificação de organismos patológicos em ambiente		Atlas, 1999
Bacteroides fragilis	PCR	Descrição de DNA amplificado produzido para detecção de bacteriofagos		Puig et.al., 2000

Embora muito possa ser desenvolvido para resolver problemas no monitoramento adequado de água potável, sem dúvida as técnicas moleculares, constituem-se uma alternativa viável para o controle de qualidade. O Grupo de Pesquisa em Microbiologia e Imunologia do DMO-CCBS-UFS, com o apoio da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe, atualmente desenvolve projeto de implantação do Laboratório de Controle de Qualidade Molecular de Água, para auxiliar entidades públicas e privadas envolvidas com o gerenciamento de recursos hídricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbazadegan, M., Gerba, C.P. and J.B. Rose. 1991. Detection of *Giardia* cysts with a cDNA probe and applications to water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 927–931.
- Alvarez, A.J., Hernandez-Delgado, E.A. and G.A. Toranzos. 1993. Advantages and disadvantages of traditional and molecular techniques applied to the detection of pathogens in waters. *Wat. Sci. Tech.* **27** (3–4): 253–256.
- American Academy of Microbiology (AAM). 1996. A global decline in microbiological safety of water: A call for action. American Society of Microbiology, Washington.
- Atlas, R.M. 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ. Microbiol.* **1**(4): 283-293.
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H. and R.M. Atlas. 1991a. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 597–600.
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Dicesare, J.L. and R.M. Atlas. 1991b. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3529–3530.
- Cho, H.B. et al. 2000. Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Can. J. Microbiol.* **46**(5):417-424.
- David, A., Christopher S. Potten, Kathryn J. Else, Fred D. Finkelman and Richard K. Grencis. 1999. *Trichuris muris*: host intestinal epithelial cell hyperproliferation during chronic infection is regulated by interferon. *Experimental Parasitology* **92**, 144-153.
- Diddell, M. 2001. Optimal specimen type and sampling time for recovery of measles virus RNA. *Victorian infectious diseases bulletin.* **4**(1): 7-8.
- Dubrou, S., Kopecka, H., Lopez Pila, J.M., Maréchal, J. and J. Prévot. 1991. Detection of hepatitis A virus and other Enteroviruses in wastewater and surface water samples by gene probe assay. *Wat. Sci. Tech.*: **24**(2): 267–272.

- Espinosa-Urgel, M., Kolter, R. 1999. A novel system for efficient gene expression and monitoring of bacteria in aquatic environments. *Environ. Microbiol.* **1**(2): 175-182.
- Grant, W. D., Long, P. E. 1989. *Microbiologia ambiental*. Acribia: Zaragoza.
- Gray, N.F. 1994. *Drinking water quality: Problems and solutions*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Hibler, C.P. 1988. An overview of the techniques used for detection of *Giardia* cysts in surface water. In: *Advances in Giardia research*. (P.M.Wallis and B.R. Hammond, Eds). University of Calgary Press, Calgary.
- Hurst, C.J. 1991. Presence of enteric viruses in freshwater and their removal by the conventional drinking water treatment process. *Bull. WHO.* **69**: 113–119.
- IAWPCR Study Group on Health-Related Water Microbiology. 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Wat. Res.* **25**: 529–545.
- Josephson, K.L., Gerba, C.P. and I.L. Pepper. 1993. Polymerase chain reaction of nonviable bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3513–3515.
- Kalpa, K. 1998. Identification of darlin, a dictyostelium protein with armadillo-like repeats that binds to small GTPases and is important for the proper aggregation of developing cells. *molecular biology of the cell. Microbiol.* **8**: 3095-3106.
- Kaucner, C. and Stinear, T. 1998. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1743–1749.
- Koenraad, P.M.F.J., Giesendorf, B.A.J., Henkens, M.H.C., Beumer, R.R. and W.G.V. Quint. 1995. Methods for the detection of *Champylobacter* in sewage: Evaluation of efficacy of enrichment and isolation media; applicability of polymerase chain reaction and Latex agglutination assay. *J. Microbiol. Meth.* **23**: 309–320.
- Kramer, M.H., Herwaldt, B.L., Craun, G.F., Calderon, R.L. and D.D. Juraneck. 1996. Waterborne disease: 1993–1994. *J. AWWA.* **32**: 66–80.
- MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B. and J.P. Davis. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New Eng. J. Med.* **331** (3): 161–167.
- Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Perlin, M., Schaeffer, F.W., Jakubowski, W. and R.M. Atlas. 1991. Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3456– 3461.

- Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K.-H. and T. Stenström. 1993. In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Microbiol* **59**: 2293–2298.
- Manz, W., Amann, R., Szewzyk, R., Szewzyk, U., Stenström, T.A, Hutzler, P. and K-H. Schleifer. 1995. *In situ* identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiol.* **141**: 29–39.
- Marshall, M.M, Naumovitz, D., Ortega, Y. and C.R Sterling. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 67–85.
- Mayer, C.L. and C.J. Palmer. 1996. Evaluation of PCR, nested PCR and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2081–2085.
- Murrin, K. and J. Slade. 1997. Rapid detection of viable enteroviruses in water by tissue culture and semi nested Polymerase Chain Reaction. *Wat. Sci. Tech.* **35** (11–12): 429–432.
- Paul, J.H., Jiang, S.C. and J.B. Rose. 1991. Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vor-tex flow filtration. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2197–2204.
- Payment, P. 1991. Elimination of coliphages, *Clostridium perfringens* and human enteric viruses during drinking water treatment: Results of large volume samplings. *Wat. Sci. Tech.* **24**:213.
- Pipes, W.O. 1982. Bacterial indicators of pollution. CRC Press, Boca Ranto, Florida, USA.
- Reasoner, D.J., Blannon, J.C. and E.E. Geldreich. 1979. Rapid seven-hour fecal coliform test. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 229–236.
- Puig, M. et al. 2000. Description of DNA amplification procedure for the detection of bacteriophages of *Bacteriodes fragilis* HPS40 in environmental samples. *J. Virol. Methods* **89**(1-2):159-166.
- Reynolds, K.A., Gerba, C.P. and I.L. Pepper. 1996. Detection of infectious Enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1424–427.
- Reynolds K.A. 2001. ICC/PCR Detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Can. J. Microbiol.* **47**(2):153-157.
- Rochelle, P.A., de Leon, R., Steward, M.H. and R.L. Wolfe. 1997. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:106–114.
- Rochelle, P.A., de Leon, R., Steward, M.H. and R.L. Wolfe. 1997a. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:106–114.
- Roefler, P.A., Monscvitz, J.T. and D.J. Rexing. 1996. The Las Vegas cryptosporidiosis outbreak. *J. AWWA.* **88**: 95–106.

- Selim Terhzaz, F. 1999. Isolation and characterization of a leucokinin-like peptide of *Drosophila melanogaster*. The Journal of Experimental Biology. **20** (2): 3667-3676.
- Sidorowicz, S.V. and T.N. Whitmore. 1995. Prospects for new techniques for rapid bacteriological monitoring of drinking water. J. IWEM. **9**: 92–98.
- Slifko, T.R., Friedman, D.E., Rose, J.B., Upton, S.J. and W. Jakubowski. 1997. Unique cultural methods used to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental samples. Wat. Sci. Tech. **35** (11–12): 363–368.
- Sobsey, M.D., Dufour, A.P., Gerba, C.P., LeChevallier, M.W. and P. Payment. 1993. Using a conceptual framework for assessing risks to health from microbes in drinking water. J. AWWA. **85**: 44–48.
- Toranzos, G.A. and A.J. Alvarez. 1992. Solid-phase polymerase chain reaction - Applications for direct detection of enteric pathogens in waters. Can. J. Microbiol. **38**: 365–369.
- Tsai, Y-L., Sobsey M.D., Sangermano, L.R. and C.J. Palmer. 1993. Simple method of concentrating Enteroviruses and Hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase–polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 3488–3491.
- Vilaginès, A., Suarez, A., Sarratte, B., Vilagenès, R.. 1997. Optimisation of the PEG reconcentration procedure for virus detection by cell culture or genomic amplification. Water Science and Technology. **35** (11-12): 455–459.
- WHO. 1996. Guidelines for drinking-water quality, Volume 2: Health criteria and other supporting information. Second edition. World Health Organization, Geneva.
- Xiao, L. et al. 2001. Molecular characterization of cryptosporidium oocysts in sample of raw surface water and wastewater. Appl. Environ. Microbiol. **67**(3):1097-1101.
- Yvone, B. 2000. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belém, Brazil. ICDDR