



I-159 – IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* SPP. E CISTOS DE *Giardia* SP. EM ÁGUAS BRUTA E TRATADA – PRÓS E CONTRAS DO MÉTODO 1623 DA USEPA

Fabiana de Cerqueira Martins⁽¹⁾

Graduanda em Ciências Biológicas pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Estagiária da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA-MG).

Ana Maria Moreira Batista

Bióloga pelo Unicentro Metodista Izabela Hendrix. Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Escola de Engenharia da UFMG (EE/UFMG).

Daniel Adolpho Cerqueira

Biólogo pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-Minas). Mestre em Microbiologia pelo ICB/UFMG. Doutor em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela EE/UFMG. Analista de Saneamento da COPASA.

Valter Lúcio de Pádua

Engenheiro civil pela EE/UFMG. Mestre em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Doutor em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos EESC/USP. Professor adjunto do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Escola de Engenharia da UFMG (DESA/EE/UFMG).

Leo Heller

Engenheiro civil pela EE/UFMG. Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela EE/UFMG. Doutor em Ciência Animal pela UFMG. Pós-doutor pela University of Oxford. Professor do DESA/EE/UFMG.

Endereço⁽¹⁾: Rua Guajajaras, 629, ap. 701 – Centro – Belo Horizonte - MG – CEP: 30180-100 – Brasil - Tel: (31) 9148-7123 - e-mail: fabianaecologia@yahoo.com.br

RESUMO

Muitos fatores influenciam na ocorrência de protozoários patogênicos, como a *Giardia* e o *Cryptosporidium*, em mananciais destinados ao abastecimento público, como, por exemplo, existência de fontes pontuais e difusas de poluição fecal, déficit dos serviços de coleta e tratamento de resíduos líquidos e sólidos, alta resistência desses protozoários aos processos convencionais de tratamento e o fato de existirem animais domésticos e selvagens que servem de reservatório para estes microrganismos. Neste contexto faz-se tão importante o conhecimento e estudo de técnicas que viabilizem a identificação e quantificação de organismos preocupantes do ponto de vista de qualidade sanitária das águas para consumo humano.

Sendo assim, o presente trabalho procura relatar a experiência de utilização de um dos métodos mais seguros e difundidos na comunidade científica que permitem a identificação e quantificação de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas bruta e tratada. A partir disso, também foi feita uma comparação com dados da literatura sobre outros métodos que propõem o mesmo objetivo. Os estudos realizados na Companhia de Saneamento Estadual mostraram que o Método 1623, apesar de suas intrínsecas implicações técnicas e metodológicas, apresenta-se como uma das mais seguras e confiáveis metodologias de estudo dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*. Entretanto, não se isenta a necessidade de pesquisar e desenvolver técnicas alternativas mais baratas e fáceis que permitam a implantação de análises de rotina nos laboratórios responsáveis pelo controle da qualidade das águas fornecidas à população.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium*, *Giardia*, identificação, quantificação, método 1623.

INTRODUÇÃO

A criptosporidiose e a giardiose estão entre as enfermidades de veiculação hídrica originadas por protozoários que têm significado grande impacto ao saneamento e gerado agravos à saúde pública.

O protozoário *Cryptosporidium*, causador da criptosporidiose, é um parasita intracelular obrigatório, que infecta o aparelho gastrointestinal dos vertebrados, incluindo o ser humano, e é transmitido pela via fecal-oral – ingestão ou inalação de oocistos – através de água contaminada, de animais e de alimentos contaminados.



Os oocistos do *Cryptosporidium* são pequenos, esféricos ou ovóides (cerca de 5,0 x 4,5µm para *C. parvum*, e 7,4 x 5,6 para *C. muris*), e contêm quatro esporozoítos livres no seu interior quando eliminados nas fezes (NEVES, 2005). A criptosporidiose surge cada vez em maior número e está associada, especialmente, às pessoas mais vulneráveis, como as pessoas imunodeprimidas, os doentes com AIDS e também crianças e idosos.

A giardiose é causada pela *Giardia*, um gênero que inclui flagelados parasitos do intestino delgado de mamíferos, aves, répteis e anfíbios, tendo sido, possivelmente, o primeiro protozoário intestinal humano a ser conhecido (NEVES, 2005). A doença, causada pela ingestão de cistos, tem uma variedade de sintomas, como diarreia, perda de peso e câimbras abdominais, e é considerada atualmente uma das causas mais comuns de gastroenterites no mundo.

Assim como o *Cryptosporidium*, a *Giardia* foi responsável por vários surtos de veiculação hídrica com registros, principalmente nos Estados Unidos, Europa e Austrália. Juntas, a giardiose e a criptosporidiose representam um dos principais problemas à saúde pública (CACCIO *et al.*, 2003).

Nesse contexto, a Portaria do Ministério da Saúde do Brasil nº 518, de 2004 (BRASIL, 2004), em seus artigos 11 e 12, recomenda a inclusão de pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência, dentre outros, de enterovírus, cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Até 1998, o método recomendado pela USEPA para as análises de protozoários em águas era o ICR (*Information Collection Rule*). Contudo, muitas dificuldades com o ICR eram documentadas, entre elas a baixa taxa de recuperação, a alta taxa de falsos positivos e falsos negativos, além da pouca precisão do método. Devido ao aumento na ocorrência de surtos atribuídos aos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*, em 1997 a EPA desenvolveu um novo método para análise de protozoários em águas, o método 1622 – para detecção de *Cryptosporidium* – e posteriormente o 1623 para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* por filtração, separação imunomagnética (IMS) e imunofluorescência (McCUIN e CLANCY, 2003).

O processo de separação imunomagnética consiste na separação dos oocistos da matéria orgânica contida na amostra, através de uma barra magnética, resultando assim em uma maior purificação da amostra analisada. Esse método se mostrou expressivamente melhor, permitindo uma mais acurada concentração, identificação e quantificação dos (oo)cistos de protozoários (McCUIN e CLANCY, 2003).

No entanto, mesmo após essas mudanças, a metodologia 1623 da EPA ainda tem sido questionada por alguns autores, por ser cara, demorada e depender mão-de-obra especializada. Sua detecção é influenciada pelo número de oocistos presentes na amostra, pela diferença entre analistas, pela sensibilidade da técnica pelo método de concentração dos oocistos na amostra, cujo aperfeiçoamento é fundamental para a precisão da análise e pesquisa do parasita (LIMA e STAMFORD, 2003; FRANCO, 2007; EMELKO *et al.*, 2008).

DiGiorgio *et al.* (2002) fizeram uma avaliação da recuperação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas naturais usando o método 1623 da USEPA. Ao final do estudo, os autores perceberam que em águas com elevada turbidez a recuperação dos organismos era mais baixa do que aquela em águas sem turbidez, e não havia diferenças significativas para os diferentes filtros testados no estudo. Para ambos os organismos, a recuperação variou significativamente de acordo com o local de amostragem.

Além disso, a não identificação das espécies, assim como a incapacidade de determinação da viabilidade ou infecciosidade dos (oo)cistos são mais das algumas limitações do método.

Logo, com o objetivo de suprir essas lacunas, as técnicas de biologia molecular (genotipagem, PCR) também têm sido usadas para detecção de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e de *Giardia*, e como elas permitem a identificação das espécies, alguns laboratórios têm implementado tais técnicas como método de rotina. No caso de um eventual surto de transmissão hídrica, por exemplo, a genotipagem da cepa do surto e da cepa encontrada no ambiente pode esclarecer se a água foi a rota de transmissão responsável pelo surto. Por sua vez, a PCR – reação em cadeia de polimerase – é altamente sensível e vem sendo utilizada juntamente com a purificação, separação imunomagnética e concentração, e pode distinguir espécies e genótipos de *Cryptosporidium*. Embora a PCR não forneça informações acerca da viabilidade ou infecciosidade dos oocistos, essa técnica pode ser precedida por um método que indique a viabilidade através do encistamento ou



cultura de células, mas esses métodos não são nem específicos para oocistos infecciosos nem completamente insensíveis para amostras ambientais (WHO, 2006).

Devido à importância sanitária da ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia*, o presente trabalho tem como objetivo principal demonstrar a tecnologia mais recomendada – o método 1623 desenvolvido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) – que permite a identificação desses protozoários em águas tratada e bruta, indicando as vantagens e desvantagens da utilização desse método e comparando com dados da literatura sobre outros métodos de detecção de protozoários em água, a fim de demonstrar a importância da realização de mais estudos que possibilitem desenvolver tecnologias mais baratas e viáveis de implantação nas rotinas dos laboratórios responsáveis pelo controle da qualidade da água destinada ao consumo humano.

O desenvolvimento desse trabalho contou com o apoio e a participação da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA-MG).

MATERIAIS E MÉTODOS

O método 1623 – *Cryptosporidium* e *Giardia* em água através da Filtração, Separação Imunomagnética e Imunofluorescência Direta – foi preconizado para a determinação desses protozoários em amostras de água bruta ou tratada (USEPA, 2005). Ele compreende as seguintes etapas: filtração, concentração, separação imunomagnética (IMS) e identificação microscópica. A confirmação de *Cryptosporidium* e *Giardia* é feita pelo corante DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) e pelo DIC (microscopia de contraste de interferência diferencial). Apesar de ser um dos mais avançados métodos que permitem a identificação desses protozoários, ele ainda é falho, pois não identifica espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* e não determina a viabilidade ou infectividade dos oocistos e cistos detectados.

As etapas que compõem a metodologia 1623 – para detecção de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas bruta e tratada –, cuja aplicação está sendo estudada no Laboratório Central da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA-MG), estão detalhadas, a seguir, e apresentadas, em resumo, na Figura 1:

1) Coleta de amostras de água

O interior dos galões plásticos com capacidade para 10 L é previamente lavado com Extran diluído e esterilizado por calor úmido, (121°C, 1,5 atmosfera, 15 minutos) em autoclave. Em seguida, os galões são ambientados com 50 mL de solução tampão fosfato com Tween (PBST 1% concentrada, pH 7,4) por agitação manual por 3 vezes. Após isso, deixam-se os galões secarem à temperatura ambiente e o gargalo é vedado com tampa ou filme plástico. O recipiente é identificado com caneta retroprojetor. São coletados 10 L de amostra para água superficial bruta e 100 a 1000 L para água tratada e, para o caso da água tratada, adiciona-se solução 10% de tiosulfato de sódio nas amostras (1 mL/L). O processamento das amostras deve ser realizado dentro de no máximo 24 horas após a coleta e estas devem ser acondicionadas à temperatura de 0 a 8°C. Os galões devem ser limpos e esterilizados antes de serem usados novamente. No local da coleta, são registrados: hora e data da coleta, condições do tempo e dados da turbidez.

2) Filtração das amostras de água

O módulo de filtro em espuma (FILTA-MAX) é conectado ao *filter housing* que está ligado a uma bomba peristáltica. As amostras são filtradas, sob agitação constante, e o tempo monitorado para que não se ultrapasse os 4L/min de vazão. Importante atentar para que a pressão não exceda 8 bar, pois acima disso pode danificar o equipamento.

Para o caso da água tratada, pode-se realizar a filtração em campo, conectando o módulo de filtro em espuma diretamente à saída do filtro de uma ETA, por meio de tubo plástico, e permitindo que uma caixa de 100 ou 1000L seja completamente preenchida após passar a água do filtro da ETA no módulo de filtro em espuma.

3) Eluição das amostras de água

O módulo de filtro é retirado do *filter housing* e inserido na bolsa plástica. Retira-se o parafuso do módulo de filtro usando uma chave Allen de 4 mm, removem-se as tampas de contenção, lavando-as com PBST 1% dentro da bolsa plástica, e expandem-se os discos de espumas na bolsa. Após isso, são adicionados 600 mL de solução PBST 1% para posterior agitação no Stomacher durante 5 minutos. A bolsa plástica é retirada do



Stomacher e a amostra eluída é transferida para um béquer de 2 L, extraindo ao máximo todo líquido retido nos módulos de espuma. Essa etapa é realizada 2 vezes. Enxágua-se 2 vezes a bolsa plástica com PBST 1% e transfere-se o enxaguado para o béquer, espremendo o máximo possível a bolsa plástica. Os discos de espuma são dispensados. Enxágua-se novamente 2 vezes a bolsa plástica com PBST 1% e transfere-se o enxaguado para o béquer.

4) Concentração das amostras de água

Nesta etapa, todo o material particulado da amostra é concentrado no *pellet* formado ao final do processo.

A amostra é vertida do béquer para os tubos cônicos de centrífuga de 250 mL. Os tubos são pesados em balança digital e balanceados aos pares. Em seguida, são centrifugados durante 15 minutos e a 1500 g, o que corresponde a uma rotação de 2700 rpm. Espera-se o rotor cessar movimento e retiram-se os tubos, cuidadosamente. O sobrenadante é aspirado, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur conectada a um sistema à vácuo, até a marca de 10 mL. Agitam-se em vórtex os tubos e lava-se duas vezes com PBST 1%, vertendo os 10 mL de todos os tubos para um só tubo de 250 mL para posterior centrifugação (por 15 minutos, a 1500 g e 2700 rpm). Ao fim da centrifugação, aspira-se o sobrenadante até a marca de 10 mL, agita-se em vórtex e transfere-se a solução do tubo de 250 mL para o tubo de 50 mL. Lava-se 2 vezes com PBST 1% e transfere-se o enxaguado para o tubo de 50 mL. Centrifuga-se o tubo de 50 mL pelo mesmo tempo e sob as mesmas condições (15 minutos, 1500 g e 2700 rpm). O sobrenadante é aspirado até a marca de 5 mL. O volume do *pellet* final é anotado.

5) Separação Imunomagnética (Sistema Dynal/Biobeads)

Esta etapa compreende a adição de um conjugado ‘esferas metálicas-anticorpos anti-*Crypto* e anti-*Giardia*’ à amostra, o qual se ligará aos antígenos (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Ao ser submetido a uma barra imantada, o complexo (oo)cistos-conjugado é arrastado e separado do material particulado restante, que é descartado. Este complexo é então submetido à dissociação térmica, liberando os oocistos e cistos para análise.

Antes de iniciar o processo, liga-se o banho seco a fim de que este atinja a temperatura adequada a tempo. Identificam-se os tubos de lado chato (*Leighton*) com o número da amostra. Agita-se em vórtex o material centrifugado do tubo de 50 mL e transfere-o para o tubo de lado chato (*Leighton*). Enxagua-se o tubo de centrífuga com 5,0 mL de água destilada (2 vezes de 2,5 mL), para trazer de volta o volume de 10 mL. Agita-se em vórtex, por 10 segundos, os reagentes de imunoseparação magnética (*Crypto*-Combo e *Giardia*-Combo. Acrescenta-se 100 µL de cada reagente e 1,0 mL do tampão-A 10x e do tampão-B 10x no tubo de lado chato contendo a amostra. Este é, então, levado para o agitador rotativo à 18 rpm e retirado após 1 hora.

O tubo é acoplado no concentrador magnético MPC-1, com o lado chato direcionado ao ímã, na posição horizontal e agita-se com as mãos (movendo para frente e para trás), fazendo um ângulo de 90°, por 2 minutos. Após isso, o MPC-1 é retornado para a posição vertical e o sobrenadante descartado em um recipiente para descarte. O tubo é então retirado do MPC-1 e a amostra é ressuspensa em 1,0 mL (2 vezes de 500 µL) de solução tampão-A 1x. O material ressuspensa é transferido para o tubo Eppendorf. Lava-se o tubo de lado chato com 0,5 mL de água destilada transfere-se o lavado para o tubo Eppendorf. Este é colocado no MPC-S junto à barra magnética. O MPC-S é agitado manualmente (para frente e para trás), fazendo um ângulo de 180°, por 1 minuto. O sobrenadante é aspirado do tubo Eppendorf, com auxílio de uma pipeta de Pasteur acoplada a uma base de conta-gotas. Retira-se o tubo Eppendorf do MPC-S para posterior adição de 100 µL de água destilada e agitação em vórtex. O tubo Eppendorf é incubado no banho seco a 80°C, por 10 minutos.

6) Imunofluorescência e coloração com DAPI das amostras de água

São acrescentados à amostra anticorpos anti-*Crypto* e anti-*Giardia* marcados com fluoresceína (FITC) para que somente os oocistos e cistos sejam visualizados na microscopia. E para confirmar a análise de epifluorescência, adiciona-se o corante de núcleos DAPI e analisa-se também em DIC.

O tubo Eppendorf contendo a amostra é retirado do banho seco e agitado em vórtex. Volta-se o tubo Eppendorf para o MPC-S. Adicionam-se 30 µL dos controles positivo e negativo nos dois primeiros poços da lâmina do kit Merifluor, respectivamente. Transfere-se todo o sobrenadante do tubo para o 3º poço da lâmina. Deixa-se a lâmina secar à temperatura de 35 a 37°C, caso se proceda à microscopia imediatamente. Caso



contrário, deixa-se a lâmina secar “overnight” à temperatura ambiente. Adiciona-se 50 µL de metanol absoluto nos poços da lâmina contendo a amostra e os controles positivo e negativo. Deixa-se secar de 3 a 5 minutos, à temperatura ambiente, até que o metanol tenha evaporado. Adiciona-se uma gota do anticorpo anti-*Crypto*/anti-*Giardia* marcado com fluorescência (FITC) e uma gota do contra-corante sobre os poços da lâmina. Misturam-se os dois componentes com uma ponteira de micropipeta. A lâmina é, então, incubada em uma câmara úmida, à temperatura ambiente, por 30 minutos, em local escuro (por exemplo, dentro de um armário). Retira-se a lâmina da câmara úmida e adiciona-se uma gota de solução tampão fosfato sem Tween (PBS 1%) em cada poço da lâmina. Aspira-se, à vácuo, o material lavado usando uma pipeta de Pasteur. Adiciona-se 50 µL do corante DAPI em cada poço da lâmina. Deixa-se a lâmina à temperatura ambiente, por 1 minuto. Adiciona-se uma gota de PBS 1% e aspira-se o excesso à vácuo, com uma pipeta de Pasteur. Adiciona-se uma gota de meio de montagem (glicerol) em cada poço da lâmina e, em seguida, a lamínula sobre a lâmina. Retira-se o excesso do meio de montagem com lenço de papel, cuidadosamente. Sela-se a lamínula com base de unhas.

7) Microscopia de epifluorescência e contraste de interferência diferencial

A lâmina é analisada em microscópio dotado de epifluorescência e contraste de interferência diferencial sob luz ultravioleta e a quantificação dos (oo)cistos é realizada por campo visual.

Devem ser seguidos os seguintes procedimentos para se operar o microscópio:

a) *Uso da epifluorescência*

Esperar de 15 a 20 minutos para ligar a epifluorescência e todos os filtros devem ser tirados

1º passo: desligar a iluminação (tampar luz com papelão)

2º passo: abaixar o filtro Stop

3º passo: usar disco de filtro 3

4º passo: visualizar e quantificar os (oo)cistos por campo visual (aumentos de 200x e/ou 400x)

b) *Uso do DIC*

1º passo: introdução do filtro 1 (posicionar o disco superior no nº 1 – correspondendo ao filtro 1)

2º passo: movimentar o polarizador

3º passo: definir o prisma intermediário (20/40)

4º passo: prisma giratório deslizante

5º passo: colocar os dois filtros

6º passo: visualizar

c) *Como passar da epifluorescência para o DIC*

1º passo: desligar a luz (Stop)

2º passo: colocar disco de filtro 1

3º passo: verificar objetiva a ser utilizada colocando o disco no mesmo aumento

4º passo: colocar os dois filtros

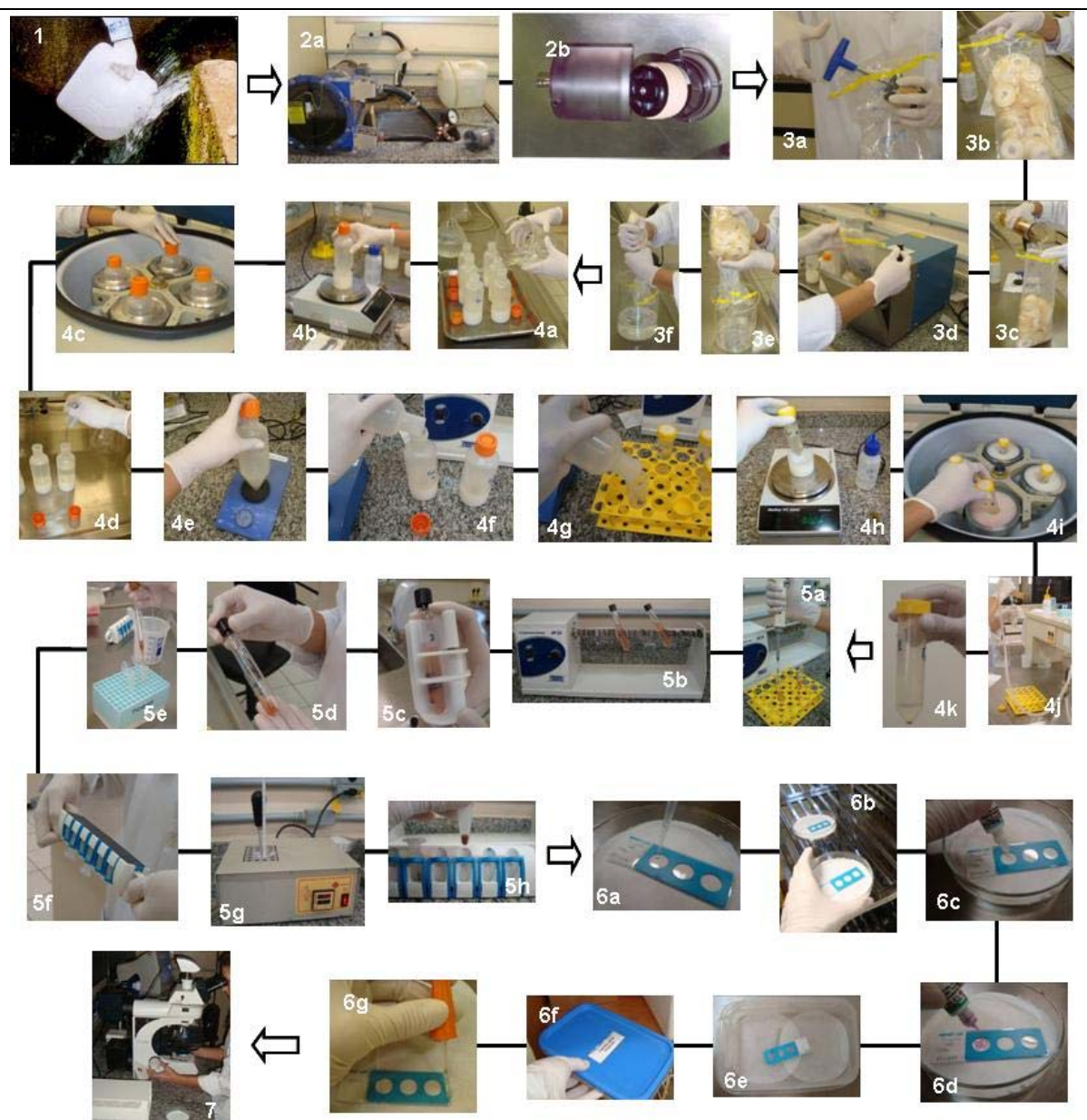
5º passo: visualizar

d) *Como desligar o microscópio*

1º passo: diminuir a intensidade de luz

2º passo: desligar o microscópio

3º passo: desligar a epifluorescência



1 – Coleta da amostra: 10 L de água bruta em galão de polietileno previamente homogeneizado com solução PBST 1% ou 100 a 1000 L de água tratada. **2a – Filtração** em bomba peristáltica a 4L/min: módulo de filtro em espuma (FILTA-MAX); ou diretamente em campo. **2b – Retenção** do material particulado nos discos de espuma. **3a – Retirada** das tampas de contenção do módulo de espuma com auxílio de uma chave Allen 4mm. **3b – Expansão** dos discos de espuma para promover o desprendimento do material retido. **3c e 3d – Eluição** das amostras. Adição de 600 mL de solução PBST 1% (2 x) e processamento em *Stomacher* durante 5 min. (cada vez). **3e e 3f – Transferência** do líquido eluído para um béquer de 2,0 L, espremendo o máximo as espumas na bolsa plástica. **4a – Transferência** da amostra eluída para os tubos de centrifuga de 250 mL. **4b – Equilibração** dos tubos de centrifuga de 250 mL. **4c – Concentração** das amostras: 15 min de centrifugação, a 1500 g e 2700 rpm. **4d – Aspiração** do sobrenadante, até a marca dos 10 mL de todos os tubos de 250 mL. **4e e 4f – Agitação** em vórtex e transferência do sobrenadante de todos os tubos para apenas um tubo de 250 mL; submetendo novamente à centrifugação (15 min.; 1500 g e 2700 rpm). **4g – Transferência** do sobrenadante do tubo de 250 mL, após aspiração até 10 mL, para o tubo de 50 mL. **4h – Equilibração** dos tubos de centrifuga de 50 mL. **4i – Centrifugação**: 15 min., a 1500 g e 2700 rpm. **4j e 4k – Aspiração** do sobrenadante até a marca de 5 mL e obtenção do *pellet* final (até 0,5 mL). **5a – Separação imunomagnética**. Ressuspensão do *pellet* com uso do vórtex, transferência da amostra para o tubo de lado chato e posterior adição dos reagentes de separação Sistema Dynal/Biobeads. **5b – Rotação** em homogeneizador a 18 rpm, durante 1 hora, para promoção da reação de separação (os anticorpos presentes no kit Biobeads vão reagir com os antígenos



contidos na amostra – oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*). **5c** – Tubo de lado chato colocado no MPC-1 e com a rotação manual de 90°, durante 2 min., é promovido o arraste do conjugado – Biobeads-(oo)cistos – para a parede do tubo. Após isso, o sobrenadante é descartado. **5d** – O tubo de lado chato é lavado com 1,0 mL de solução tampão-A 1x e 0,5 mL de água destilada. **5e** – O lavado é transferido para um tubo Eppendorf. **5f** – O tubo Eppendorf é colocado no MPC-S e agitado a 180°, por 1 min. O sobrenadante é descartado e são colocados 100 µL de água destilada no tubo Eppendorf. **5g** – Etapa de **dissociação térmica**: O tubo Eppendorf é submetido ao banho seco a 80°C durante 10 min. Nessa etapa o conjugado – Biobeads-(oo)cistos – se desprende. **5h** – Tubo Eppendorf novamente colocado no MPC-S, dessa vez somente os Biobeads serão arrastados, deixando, assim, os (oo)cistos livres na amostra. **6a** – Amostra com os (oo)cistos transferida para um dos poços da lâmina. **6b** – A lâmina é levada à secagem em estufa, à temperatura de 35 a 37°C. **6c e 6d** – **Imunofluorescência**. Os reagentes do kit Merifluor são acrescentados ao poço da lâmina contendo a amostra. **6e e 6f** – A lâmina é levada à câmara úmida, por 30 min., em local escuro. **6g** – O excesso de reagentes e PBS 1% são sugados e a lâmina é selada com lamínula e esmalte. **7** – A lâmina é levada ao microscópio óptico com epifluorescência para **quantificação**.

Figura 1 – Resumo do Método 1623 desenvolvido pela USEPA (2005) para identificação de (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas bruta e tratada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os (oo)cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são identificados e quantificados em microscópio de epifluorescência, dotado com contraste de interferência diferencial (DIC), sendo visualizados conforme mostrado na Figura 2, a qual foi retirada do site da EPA.

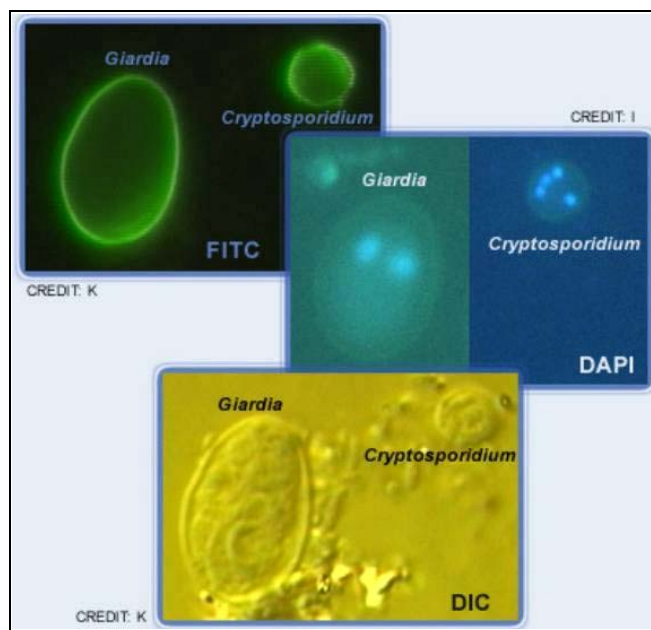


Figura 2 – Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* sp. em microscópio com Epifluorescência e DIC. (Fonte: USEPA, 2008)

Com a aplicação do método 1623 da USEPA (2005) é possível distinguir claramente os cistos de *Giardia* spp. e os oocistos de *Cryptosporidium* spp., não resultando em análises errôneas e/ou confusas. Além disso, é um método seguro, na medida em que aplica anticorpos específicos dos protozoários em questão, descartando qualquer tipo de falso-positivo.

Entretanto, a metodologia apresenta algumas desvantagens que podem até inviabilizar sua execução, como o fato de ser cara – os reagentes, equipamentos e materiais em geral são de difícil obtenção e preço elevado –, cansativa de executar – para 2 amostras, por exemplo, são necessários de 1 a 2 dias para seu completo processamento – e ser passível de perdas – em praticamente todas as etapas há possibilidade de perda de informação, como, por exemplo, na eluição, em que é necessária a aplicação de força para se retirar por completo o líquido das espumas, o que, muitas vezes, limita a execução do método, uma vez que necessita de



esforço físico, o qual, dependendo do estado de saúde e até mesmo do sexo da pessoa pode ser crítico. Tudo isso dificulta sua implementação na rotina nos laboratórios destinados ao controle da qualidade de água para consumo humano.

Como não existe ainda uma padronização da metodologia de pesquisa dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), a escolha do método é de responsabilidade do pesquisador analista, que deve usar de experiência e bom senso levando em consideração as características da amostra (LOPES, 2009).

Uma considerável desvantagem nos atuais métodos de concentração se refere ao fato de que muitos fatores na amostra ambiental (presença de sólidos suspensos e algas) e também a idade dos oocistos, pode ter significativo efeito na eficiência de recuperação. Os oocistos podem ser perdidos nos passos de purificação e concentração subsequentes, eles não são eluídos a partir do material filtrante ou não são capturados pela IMS. Os sólidos suspensos e cátions bivalentes influenciam na ligação dos anticorpos-IMS aos oocistos, além disso, o envelhecimento dos oocistos e o tratamento oxidante podem retirar os antígenos determinantes dos anticorpos da parede dos oocistos. A concentração real dos oocistos na amostra de água é, portanto, muito superior à concentração medida. Para estimar a concentração real dos oocistos as contagens desses precisam ser corrigidas pela eficiência de recuperação, o que é complicado pelo fato de que a eficiência de recuperação pode variar entre as amostras (WHO, 2006).

Outros métodos, como o método da floculação com carbonato de cálcio tem sido bastante adotado, por ser simples e econômico, pois utiliza equipamentos mais básicos e requer consideravelmente menos trabalho e especialização do que outros métodos (VESEY *et al.*, 1993; VIEIRA *et al.*, 2004).

No entanto, alguns autores afirmam que mesmo diante de tantas restrições, o método 1623 é ainda a mais adequada técnica para detecção de protozoários em amostras de água, sobretudo se for utilizado juntamente com técnicas de biologia molecular, pois embora tenha uma taxa de recuperação relativamente baixa, a faixa de variação é mais estável. Além de ser a mais difundida técnica na literatura, o que possibilita uma maior comparação de dados e busca de melhorias que minimizem as dificuldades atribuídas ao método. Ademais, foi incorporado ao método 1623 o sistema Filta-Max da IDEXX implementado pela primeira vez no Reino Unido, como forma de aperfeiçoar a taxa de recuperação do método SCA (*Standing Committee of Analysts*). Segundo os pesquisadores envolvidos na pesquisa, essa melhoria ocorre por aumentar a concentração e recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água bruta e tratada (MCUIN e CLANCY, 2003).

Esses e outros melhoramentos devem ser cada vez mais desenvolvidos e implantados pelas companhias que fazem análises de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas, pois a dificuldade e custo da análise para detecção de (oo)cistos restringe o monitoramento desses protozoários (LOPES, 2009).

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

A contaminação dos mananciais de abastecimento de água por microrganismos patogênicos determina desafios aos serviços de tratamento. Isso é particularmente crítico para aqueles microrganismos que são classificados como emergentes (aqueles que já existiam, mas somente agora se mostraram capazes de infectar e causar doenças) segundo suas características de persistência ambiental e resistência aos processos convencionais de tratamento. Por isso, tem-se tornado tão necessária a pesquisa de microrganismos como *Giardia* e *Cryptosporidium*, a fim de amenizar o risco microbiológico das águas utilizadas para abastecimento público.

Apresentando-se como uma metodologia eficaz na pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia*, o método 1623, apesar de ser relatado como desvantajoso por vários pesquisadores por apresentar elevado custo de implantação e por análise, exigir mão de obra especializada, sua execução ser demorada e não permitir a identificação das espécies e sua viabilidade, ainda sim é uma técnica vantajosa, na visão de outros estudiosos, na medida em que apresenta taxa de recuperação com pouca variação, é muito relatada na literatura e é



utilizada em vários países onde há obrigatoriedade de monitoramento de protozoários patogênicos na água destinada ao abastecimento público.

Portanto, o desenvolvimento de tecnologias que permitam a identificação e quantificação desses organismos é tão importante quanto o estudo sobre ocorrência, comportamento e remoção destes nas águas destinadas ao consumo humano. Entretanto, é mais importante ainda a criação de uma metodologia mais acessível e menos onerosa para que se torne uma prática diária e constante nos laboratórios de controle da qualidade da água de todos os países.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 21st ed. Washington: APHA: AWWA: WEF, 2005.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial, Poder Executivo*, Brasília, DF, 2004.
3. CACCIÒ, S. M.; DE GIACOMO, M.; AULICINO, F. A.; POZIO, E. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3393-3398, junho de 2003.
4. DIGIORGIO, L. C.; GONZALEZ, A. D.; HUITT, C. C. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using environmental protection agency method 1623. *Environmental Microbiology*, v. 68, n.12, p. 5952-5955, 2002.
5. EMELKO, M.; SCHMIDT, J. P.; ROBERSON, A. J. Quantification of uncertainty in microbial data – reporting and regulatory implications. *Journal American Water Works Association*, v. 100, n. 3, p. 94-104, 2008.
6. FRANCO, B. M. G. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em Saúde Pública. *Panam Infectol*, v. 9, n. 4, p. 36-43, 2007.
7. LIMA, E. C.; STAMFORD, T. L. M. *Cryptosporidium* spp no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 8, n. 3, p. 791-800, 2003.
8. LOPES, A. M. M. B. *Avaliação da ocorrência de oocistos de Cryptosporidium spp. e de cistos de Giardia spp. e sua associação com indicadores biológicos e turbidez na represa de Vargem das Flores – MG*. 2009. [Dissertação de Mestrado]. Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
9. MCCUIN, R. M.; CLANCY, J. L. Modifications to United States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 1, p. 267-274, janeiro de 2003.
10. NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. São Paulo: Atheneu, 11^a ed., 2005. 494 p.
11. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. (EPA 815-R-05-002). 76 p. Office of Water (4607). Office of Ground Water and Drinking Water Technical Support Center, Cincinnati, OH. December 2005. Disponível em: <<http://www.epa.gov/microbes/1623de05.pdf>>
12. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Módulo de treinamento online – Method 1623: *Giardia* and *Cryptosporidium*. Disponível em: <http://www.epa.gov/ogwdw/lt2/training/module_microscopy/crypto/gandcrypto/crypto0030.html>. Acesso em março de 2008.
13. VESEY, G.; SLADE, J. S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; FRICKER, C. R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 75, p. 82-86, 1993.
14. VIEIRA, M. B. C. M.; COURA, V. C.; SILVA, M. C. C.; SOARES, R. C. G.; SALVADOR, D. P. *Monitoramento da balneabilidade e dos protozoários Cryptosporidium e Giardia das águas da represa de vargem das flores – MG - Brasil*. 2004. Disponível em: http://www.lapecco.com.br/vargem_flores.htm. Acesso em: 12 de dezembro 2008.
15. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for Drinking Water Quality. *Cryptosporidium*. EHC *Cryptosporidium* draft 2. 02 January, 2006.