

# COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO, POR *Giardia*, DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO PORTO DE RIO GRANDE, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

RAMOS, T.S.<sup>1</sup>; HUAPENTAL, L.E.<sup>2</sup>; FURTADO, R.D.<sup>2</sup>; MARQUES, F.G.<sup>3</sup>; ROCHA, A.S.R.<sup>4</sup>; SILVA, P.E.A.<sup>5</sup>; MENDONZA-SASSI, R.A.<sup>5</sup>; SCAINI, C.J.<sup>6\*</sup>

## INTRODUÇÃO

A poluição da água é um grave problema para saúde humana e dos animais (KARANIS *et al.*, 2006), pois pode veicular uma série de agentes infecto-parasitários. Dentre os parasitos transmitidos pela água, destaca-se o protozoário *Giardia duodenalis*, que pode permanecer viável por vários meses na água entre 4 e 10°C (HSU *et al.*, 1999). As águas marinhas também são constantemente contaminadas pela descarga de esgotos, compostos químicos e dejetos de atividades agropecuárias (AGENDA 21, 1992).

Estudos de biologia molecular e filogenética têm sido importantes ferramentas para diferenciação entre os genótipos de *G. duodenalis* (Sinonímias: *G. lamblia*; *G. intestinalis*) (THOMPSON *et al.*, 2000). Atualmente, são reconhecidos sete genótipos desta espécie (A, B, C, D, E, F e G), sendo que os genótipos A e B parasitam o homem e diversas espécies de animais domésticos e silvestres, enquanto que os demais genótipos são específicos de animais (MONIS *et al.*, 1999; READ *et al.*, 2004).

Diante do exposto, a pesquisa de *Giardia* na água é de extrema relevância, porém não há uma técnica considerada padrão para detecção

---

<sup>1</sup> Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande - FURG;

<sup>2</sup> Bolsista de Iniciação Científica, Laboratório de Parasitologia – Departamento de Patologia (DPAT) – FURG;

<sup>3</sup> Bióloga, Laboratório de Parasitologia – DPAT - FURG;

<sup>4</sup> Doutoranda do Programa de Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas - UFPEL;

<sup>5</sup> Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – FURG;

<sup>6</sup> Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; Laboratório de Parasitologia – Departamento de Patologia (DPAT) – Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Área Acadêmica do Hospital Universitário – FURG. Rua General Osório, S/N, CEP: 96.200-190, centro, Rio Grande, RS. [cjscaini@yahoo.com.br](mailto:cjscaini@yahoo.com.br)

deste protozoário em amostras de água. Dentre os métodos para pesquisa de cistos de *G. duodenalis* em amostras de água, são empregados o exame microscópico direto (GOMES *et al.*, 2002) e o método de centrifugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Técnica de Faust) (CARDOSO *et al.*, 2003). Além destes métodos tradicionais de microscopia, a Imunofluorescência com anticorpos monoclonais, e a reação em cadeia da polimerase - PCR (CACCIO *et al.*, 2003; PAULINO *et al.*, 2005), têm sido utilizados por diversos autores por apresentarem maior sensibilidade dos que os métodos tradicionais (GASPARI *et al.*, 2006).

A diversidade e complexidade de métodos para detecção destes parasitos na água têm dificultado e criado polêmica entre os pesquisadores. Entretanto, é consenso que a identificação de um determinado parasito, deve ser confirmada com outro método (GOMES *et al.*, 2002). Como a veiculação hídrica é uma forma importante de transmissão de *G. duodenalis*, torna-se relevante a realização de trabalhos que visam estabelecer metodologias com maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade para a detecção deste parasito em amostras de água.

Este estudo teve como objetivo comparar técnicas parasitológicas de microscopia que permitem identificar cistos de *Giardia*, com o ensaio imunoenzimático (ELISA) usado para pesquisa de antígenos de superfície dos cistos do protozoário, em amostras de água do Porto do Rio Grande, RS, Brasil.

## **METODOLOGIA**

### **Local do estudo**

O estudo foi realizado no Porto da cidade do Rio Grande, RS, localizado no sul do Brasil (32° 03' S, 52° 05' W), situado na margem oeste do Canal do Rio Grande, que liga a Laguna dos Patos com o Oceano Atlântico Sul.

### **Coleta e concentração das amostras de água**

As coletas foram realizadas conforme a metodologia para a coleta de águas superficiais (CETESB, 1992), sendo coletadas 36 amostras de água de seis pontos do Porto do Rio Grande. A concentração do material foi realizada através de filtração em membrana de acetato de celulose (Millipore®) e pelo método de raspagem de membrana (método RM), seguido da eluição em Tween 80. A suspensão resultante da eluição foi centrifugada e o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de água ultrapura.

### **Pesquisa de cistos de *Giardia* por técnicas de microscopia**

Para a pesquisa de cistos de *Giardia*, alíquotas dos *pellets* foram submetidas a duas técnicas de microscopia: técnica de centrifugo-flutuação em solução de sulfato de zinco, densidade 1,18 (Técnica de Faust) e a técnica de centrifugo-sedimentação em formalina-eter (Técnica de Ritchie).

### **Pesquisa de antígenos de superfície de cistos de *Giardia***

Para pesquisa de antígeno de cistos de *Giardia* nas amostras de água do porto do Rio Grande foi utilizado o ensaio imunoenzimático-ELISA (*Giardia*

II - TechLab<sup>®</sup>), método que utiliza anticorpos monoclonais contra antígeno de superfície de cisto de *Giardia*. Após execução do ensaio a placa foi lida em em leitor de ELISA (Dynatech MR 700<sup>®</sup>) em comprimento de onda de 450 nm. De acordo com as normas técnicas do fabricante o ponto de corte (*cut off*) foi de 0,150. No total, foram analisadas 36 amostras, em duplicata, além dos controles positivos e negativos.

### Análise estatística

Para comparar os resultados das técnicas de microscopia com os do ensaio imunoenzimático (padrão ouro) foram calculadas a sensibilidade, especificidade e acurácia, com intervalo de confiança (IC) de 95%.

### RESULTADOS

Das 36 amostras de água coletadas de seis pontos do Porto do Rio Grande, foi detectada positividade para *Giardia*, pelo ELISA, em sete amostras. Enquanto que com as técnicas de microscopia (técnicas de Faust e de Ritchie), foi detectada uma amostra positiva para o protozoário.

Na Tabela 1, podem ser observadas a sensibilidade, especificidade e acurácia da metodologia baseada na identificação de cistos de *Giardia*, tendo o ELISA como padrão ouro.

| Técnica de Faust /<br>Técnica de Ritchie | ELISA    |          | Total |
|--|----------|----------|-------|
|  | Positivo | Negativo |       |
| Positivo                                 | 01       | Zero     | 01    |
| Negativo                                 | 06       | 29       | 35    |
| Total                                    | 07       | 29       | 36    |

Sensibilidade –  $a/a+c \times 100 = 14,29\%$ . IC= 95% - 6,99% - 21,59%

Especificidade –  $d/b+d \times 100 = 100\%$ . IC= 95% - 98,28% - 100%

Acurácia –  $a+d/a+b+c+d \times 100 = 82,86\%$ . IC= 95% - 81,35% - 84,36%

**Tabela 1** – Comparação da metodologia baseada na identificação de cistos de *Giardia* por microscopia, considerando o ensaio imunoenzimático (ELISA) como padrão ouro (n=36).

### DISCUSSÃO

Neste estudo, com a utilização do ensaio imunoenzimático (ELISA), foi possível detectar positividade para *Giardia* em 19,4% (7/36) das amostras examinadas, enquanto que com as técnicas de microscopia apenas em 2,8% (1/36).

Estes dados são compatíveis com os encontrados por outros autores que também comparam técnicas na pesquisa de cistos de *Giardia* em amostras clínicas. Vidal & Catapani (2005) observaram que o teste de ELISA apresentou resultados positivos mesmo quando as técnicas de microscopia

eram negativas. Berne (2007) observou maior chance de detecção do protozoário, em amostras de fezes humanas, com ELISA do que com as técnicas de centrífugo-flutuação e centrífugo-sedimentação.

O ensaio imunoenzimático, apesar de pouco utilizado em amostras de água, neste trabalho apresentou alta sensibilidade comparado com os métodos de microscopia. A diferença na capacidade de detectar amostras positivas (sensibilidade) pode ser explicada, provavelmente, pelo fato que no método de microscopia é pesquisado o cisto do protozoário, enquanto que no ELISA são pesquisados antígenos de superfície, não sendo necessário a integridade do cisto.

O ELISA é menos oneroso do que a imunofluorescência, que é o método mais freqüentemente empregado para análise de amostras de água. Entretanto, apesar de não incluir em sua metodologia oficial, a USEPA (*Environmental Protection Agency*) cita o método de ELISA, como uma metodologia rápida e fácil, porém ainda pouco testada para amostras ambientais (USEPA, 2001). Para monitoramento da qualidade da água ou para investigação da contaminação ambiental (como foi feito neste estudo), a simples detecção de antígenos de *Giardia* pode indicar risco de infecção e, principalmente, indicar a ocorrência de contaminação de origem fecal, com possível presença outros patógenos de origem fecal.

## CONCLUSÃO

O teste de ELISA apresenta maior sensibilidade para pesquisa de *Giardia* em amostras de água quando comparado com os métodos de microscopia tradicionais. Porém são necessários estudos comparando ELISA com imunofluorescência, para indicar este método para investigação da contaminação por *Giardia* em amostras de água.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENDA 21. Proteção dos oceanos, de todos os tipos de mares – inclusive mares fechados e semifechados – e das zonas costeiras, e proteção, uso racional e desenvolvimento de seus recursos vivos. *Suplemento das águas*, 1992. Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov/agenda21/ag17.htm>>. Acesso em: 25 de maio 2007.

BERNE, A. C. *Prevalência de enteroparasitoses na população atendida em uma creche pública do Rio Grande, RS, e comparação de métodos de diagnósticos para giardíase*. 2007. 71 f. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós – Graduação em Parasitologia) - Universidade Federal de Pelotas, 2007.

CACCIÓ, 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.3391-3398, 2003.

CARDOSO, L. S.; DE CARLI, G. A.; LUCA, S. J. *Cryptosporidium e Giardia em efluentes biologicamente tratados e desinfetados*. *Engenharia Sanitária e Ambiental* v.8, n.4, p.285-290, 2003.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Coliformes totais: determinação em amostras de água pela técnica de membrana filtrante. Norma técnica L5.214, São Paulo, 1992.

GASPARI, E.N.; RISTORI, C.A.; ROWLANDS, E.G.; IRINO, K; TORRES,D.D.; AMPLIN, M. Aplicação de anticorpos monoclonais na detecção de enteropatógenos em amostras de origem clínica, alimentar e ambiental para a produção de kits para imunodiagnóstico. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v.3, n.35, 2006.

GOMES, A.; PACHECO, M.; FONSECA, Y.; CESAR, N.; DIAS, H.; SILVA, R. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em águas de fontes naturais e comparação com análises bacteriológicas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.61, n.1, p.59-63, 2002.

HSU, B.; HUANG, C.; HSU, C. L.; HSU, Y. F.; YEH, J. H. Occurrence of Giardia and Cryptosporidium in the Kau-Ping river and its watershed in Southern Taiwan. *Water Research*, n.33, n.11, p.2701-2707, 1999.

KARANIS, P.; SOTIRIADOU, I.; KARTASHEV, V.; KOURENTI, C.; TSVETKOVA, N.; STOJANOVA, K.; Occurrence of Giardia and Cryptosporidium in water supplies of Rússia and Bulgária, *Environmental Research*, v.102 p. 260-271, 2006.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Molecular systematics of the parasitic protozoan Giardia intestinalis. *Molecular Biology and Evolution*, v.16, p.1135-1144, 1999.

PAULINO, R. C.; COSTA, A. O.; THOMAZ-SOCCOL, V. PCR como ferramenta para detecção de Giardia duodenalis em água. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, Porto Alegre, 2005. Anais...*Sociedade Brasileira de Parasitologia*, Porto Alegre, 2005.

READ, C. M.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. Discrimination of all genotypes of Giardia duodenalis at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 4, p. 125-130, 2004.

THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of Giardia infecting mammals. *Parasitology Today*, v.16, n.5, p.210-213, 2000.

USEPA - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. *Office of Water*. Washington DC 20460, nº EPA-821-R-01-025, U.S. 2001.

VIDAL, A. M. B.; CATAPANI, W. R. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *Revista São Paulo Medical Journal*, v.123, n.6, 2005.