



MONITORAMENTO DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia duodenalis* EM AMOSTRAS DE LODO E ÁGUA DE RETROLAVAGEM DE FILTRO DE UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUA EM LONDRINA, PARANÁ, BRASIL.

Ladeia, W. A.¹; Rosolen e Silva, C. F.¹; Martins, F. D. C.¹; Freire, R. L.^{1*}

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. * e-mail: rlfreire@uel.br.

Área de Conhecimento: Saúde Única.

Palavra-chave: Protozoário; Flocculação, PAC, PCR, ETA.

Introdução

Cryptosporidium spp. e *Giardia duodenalis* são os parasitas que mais causam surtos de veiculação hídrica no mundo. A presença desses protozoários em água representa risco à saúde humana e animal, pois possuem potencial zoonótico. Dos 554 surtos de veiculação hídrica causados por protozoários, do início do século XX até 2010, *Cryptosporidium* spp. foi responsável por 55% e *Giardia duodenalis* por 38% (BALDURSSON e KARANIS, 2011).

C. parvum e *G. duodenalis* foram encontrados em água de captação de uma Estação de Tratamento de Água (ETA) em Londrina, PR, comprovando que há contaminação de águas superficiais (ALMEIDA et al., 2015). Há grande preocupação quanto as ETAs, pois os oocistos de *Cryptosporidium* spp. e os cistos de *Giardia* spp., não são removidos em sistemas simplificados de tratamento de água. Acredita-se que, nas ETAs, a forma mais eficaz para impedir que esses protozoários atinjam a água tratada seja o processo de retenção por densidade nos decantadores (MACIEL e SABOGAL-PAZ, 2016). Neste sentido, objetivou-se neste estudo verificar a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em amostras de lodo de decantação e de água de retrolavagem de filtro em uma ETA.

Materiais e Métodos

O estudo foi realizado em uma ETA da Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) no município de Londrina, PR, no ano de 2015. Esta ETA utiliza o Cloreto de Polialumínio (PAC) como agente flocculante.

Foram realizadas 11 coletas quinzenais, sendo que 5 L de lodo residual de tanque de decantação e 5 L de água residual de retrolavagem de filtro foram coletados. Destas, três amostras foram separadas para a realização de diferentes metodologias: i) 11 amostras da água residual da retrolavagem do filtro, concentradas por



floculação e centrifugação (ARF); ii) 11 amostras do lodo residual de decantação, concentradas por floculação e centrifugação (LDF); iii) 11 amostras do lodo residual de decantação, concentradas por centrifugação (LDC); totalizando 33 amostras.

Foi realizada floculação por carbonato de cálcio (CaCO_3), segundo metodologia adaptada de Greinert et al. (2004). Utilizou-se 2L de ARF e de LDF e, adicionou-se 1% das soluções de NaHCO_3 (1M) e CaCl_2 (1M). A solução foi homogeneizada, o pH ajustado para 10 e decantada *overnight*. Após, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 20% do volume total de H_3NSO_3 (10% m/v). Homogeneizou-se até degradação dos flocos de CaCO_3 formados. A solução residual foi transferida para tubos de 50 mL com 5% de solução Tween 80 (0,1%) e centrifugada a 3000 x g por 10 min; o sobrenadante foi descartado e a etapa de centrifugação se repetiu. O pellet foi armazenado a -20°C para análises moleculares.

Para a centrifugo-concentração, o volume de 550 mL do LDC foi distribuído uniformemente em 12 tubos de 50mL contendo 5% de solução Tween 80 (0,1%), posteriormente foram centrifugados a 1500 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspensionado em solução Tween 80 (0,1%) e centrifugado novamente. Após, o sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado a -20°C para análises moleculares.

A extração de DNA foi feita por kit comercial NucleoSpin Tissue® (Macherey-Nagel) de acordo com protocolo do fabricante, com adição de três ciclos de gelo e degelo para maior eficiência na degradação da parede do (oo)cisto. Realizou-se a *nested*-PCR em triplicata para a detecção de DNA de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis*. Para detecção de *Cryptosporidium* spp. utilizou-se a amplificação de um fragmento de DNA entre 819 e 825 pb, proveniente do gene 18SSU rRNA descrito por Xiao et al. (1999). Para detecção de *Giardia duodenalis* foi utilizada a amplificação de um fragmento de DNA de 530 pb, proveniente do gene TPI (Triose Fosfato Isomerase) descrito por Sulaiman et al., (2003). O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR® Safe (DNA Gel Stain, Invitrogen, Brasil) e visualizado em luz ultravioleta.

Resultados e Discussão

Todas as amostras foram negativas para *Cryptosporidium* spp. e duas foram positivas para *G. duodenalis*, sendo as duas amostras de LDC.

O resultado negativo para *Cryptosporidium* spp. não confirma a ausência desse protozoário no rio Tibagi ou na ETA, pois se a contaminação do recurso hídrico ocorrer com baixa quantidade de oocistos, esta pode ser menor que o limite de detecção do teste (ALMEIDA et al., 2015). A presença de *G. duodenalis* em duas de 11 amostras coletadas, evidencia que houve contaminação do rio, com carga parasitária detectável. *Giardia* spp. é um protozoário endêmico no Brasil e no Paraná.



A positividade nas amostras de LDC, indica que a centrifugo concentração foi a metodologia mais simples e eficaz. Sugere-se que os cistos estejam livres dos flocos do agente floculante Cloreto de Polialumínio (PAC), e que haveria a possibilidade deles avançarem para outros processos na ETA. A ausência de *G. duodenalis* em todas as amostras de água de retrolavagem de filtro, não permite constatar ou descartar essa possibilidade.

Há a necessidade de novos estudos para avaliar a presença de (oo)cistos nos flocos de PAC e seu potencial de agregação. Caso uma alta taxa de detenção nos flocos de PAC for comprovada, uma nova abordagem para o monitoramento de protozoários em recursos hídricos e ETAs poderia ser utilizada, facilitando a detecção e tornando a prevenção mais eficaz.

Conclusões

Cryptosporidium spp. foi ausente nas amostras de lodo de decantação e água de retrolavagem. *G. duodenalis* foi detectada em duas amostras de lodo de decantação centrifugo-concentrado.

Houve a presença de protozoários somente em amostras de lodo de decantação centrifugo-concentrado, que é o método mais simples e sugerindo, pelos resultados, que seja o mais eficaz para a recuperação de (oo)cistos.

Suporte financeiro

CNPq e CAPES pela concessão de bolsa; e FUNASA (Convênio 313/2012; processo 25100.031.386/2012-46) pelo fomento da pesquisa.

Referências

ALMEIDA, J. C.; MARTINS, F. D. C.; FERREIRA NETO, J. M.; et al. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 303–308, 2015.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6603–6614, 2011. Elsevier Ltd.

GREINERT, J. A.; FURTADO, D. N.; SMITH, J. J.; MONTE BARARDI, C. R.; SIMÕES, C. M. O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in swimming pool filter backwash water concentrates by flocculation and immunomagnetic separation. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 14, n. 6, p. 395–404, 2004.

MACIEL, P. M. F.; SABOGAL-PAZ, L. P. Removal of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. from water supply with high turbidity: analytical challenges and perspectives. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 3, p. 369–378, 2016.



SULAIMAN, I. M.; FAYER, R.; BERN, C.; et al. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1444–1452, 2003.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; et al. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3386–3391, 1999.