

Determinação da sensibilidade do teste de ELISA para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de águas brutas

Sensitivity of ELISA for detecting *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in raw waters samples

RIALA6/1569

Regina Célia Arantes STANCARI

Endereço para correspondência: Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Bauru, Instituto Adolfo Lutz. Rua Rubens Arruda, quadra 06, Centro, Bauru, CEP: 17015-110. E-mail: rstancari@ial.sp.gov.br

Recebido: 24.05.2013 - Aceito para publicação: 20.09.2013

RESUMO

Os métodos microscópicos para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* são dispendiosos e apresentam reprodutibilidade variável e baixa recuperação, porém a rigorosa padronização da técnica e o controle de qualidade nos testes de recuperação permitem sua utilização em amostras ambientais. Neste estudo foi determinada a sensibilidade do ELISA, analisando-se o limite de detecção. Ademais, foi verificada a viabilidade de utilizá-lo como teste de triagem nos locais em que os métodos microscópicos foram aplicados para confirmar a veiculação de oocistos e cistos íntegros, e que podem representar risco de transmissão da criptosporidiose e/ou giardiase. Os limites de detecção foram altos: 98 cistos e 3.492 oocistos. Do total de amostras ambientais analisadas, 20 % foram positivas para *Cryptosporidium* spp. e nenhuma para *Giardia* spp.. Concluiu-se que ELISA não apresenta sensibilidade adequada como teste de triagem para a finalidade deste estudo, pois as amostras ambientais geralmente apresentam números de cistos e oocistos abaixo daqueles observados em amostras fecais infectadas, para as quais os kits de reagente ELISA foram validados. Além disso, as diluições das soluções estoques dos cistos e oocistos em água destilada podem ter resultado em condições de reações desfavoráveis e ter influenciado na sensibilidade do ELISA.

Palavras-chave. *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., ELISA, limite de detecção.

ABSTRACT

The microscopic methods for detecting *Cryptosporidium* and *Giardia* are expensive, and a variable reproducibility and a low recovery are found. Nevertheless, a rigorous technical standardization and a quality control in the recovery testing give support to use them for analyzing the environmental samples. This study determined the sensitivity of ELISA for analyzing *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in raw water samples. Also, it was investigated whether this assay could be used as a screening test for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw water samples; and to deduce the potential transmission of giardiasis and cryptosporidiosis from these specimens. The detection limits were high, being 98 cysts and 3.492 oocysts. Of the analyzed environmental samples, 20 % showed ELISA positive for *Cryptosporidium* spp., and none for *Giardia* spp.. Therefore, ELISA showed to be unsuitable to be used as screening assay, because in the environmental samples usually occur a lower numbers of oocysts and cysts than those regularly found in infected stool samples, for which these kits have been validated. Furthermore, the dilutions prepared from the stock solutions of cysts and oocysts in distilled water could have resulted in unfavorable reaction conditions, and it has affected the sensitivity of ELISA.

Keywords. *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., ELISA, detection limits.

INTRODUÇÃO

Cryptosporidium e *Giardia* são protozoários patogênicos que parasitam o intestino do ser humano causando infecções que variam desde assintomáticas até doenças severas, podendo causar a morte, dependendo do estado imunológico do indivíduo¹.

Estes protozoários são veiculados pela água e seus oocistos e cistos, além de resistirem ao tratamento pelo cloro, desinfetante mais comumente utilizado pelas Estações de Tratamento de Água (ETAs)², podem vencer as barreiras físicas (filtração) destas instalações e contaminarem a água distribuída para a população¹.

A pesquisa e o monitoramento destes parasitas vêm ganhando importância nas últimas décadas em função dos surtos ocorridos ao redor do mundo e, no Brasil, a publicação da Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, traz a obrigatoriedade deste monitoramento nos mananciais que apresentarem médias geométricas anuais de *Escherichia coli* superiores a 1.000/mL, devendo o mesmo ser realizado por um período mínimo de dois anos³. Tal monitoramento é dificultado por questões metodológicas, pois os métodos atualmente disponíveis para esta pesquisa são considerados caros, trabalhosos, com reprodução variável e baixa recuperação⁴⁻⁶, mas a rigorosa padronização da técnica e a adoção de testes de recuperação de cistos e oocistos nas amostras ambientais possibilitam a obtenção de taxas de recuperação aceitáveis e a introdução dos mesmos na rotina dos laboratórios.

A metodologia imunoenzimática (ELISA) vem sendo utilizada como método alternativo para o diagnóstico de *Cryptosporidium* e *Giardia* por permitir a realização simultânea de um grande número de análises, tornando-se um método importante para a investigação de surtos e estudos epidemiológicos. Este método foi desenvolvido para pesquisa de antígenos destes protozoários em amostras fecais, porém alguns autores vêm tentando aplicá-lo em amostras ambientais⁷. Ele se baseia na formação do complexo antígeno-anticorpo monoclonal imobilizado na placa de ELISA e, após a formação desse complexo, um anticorpo policlonal (anticorpo detector) ligado a uma enzima é adicionado, o qual se liga ao complexo antígeno-anticorpo, formado anteriormente. A adição de um substrato para a enzima unida ao anticorpo policlonal desenvolve uma coloração que é avaliada visualmente ou medida em espectrofotômetro, em determinado comprimento de onda.

O presente estudo procurou verificar a viabilidade do método de ELISA ser aplicado como

teste de triagem, pois este consegue detectar também antígenos de *Cryptosporidium* e *Giardia* livres e dispersos na água. Para tal, foi determinada a sensibilidade de kits imunoenzimáticos comerciais para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. e pesquisada a ocorrência destes protozoários em amostras de água bruta de alguns municípios abrangidos pelo Grupo de Vigilância Sanitária XV (GVS – XV) de Bauru, no estado de São Paulo, Brasil. O teste de triagem seria utilizado para indicar onde aplicar ensaio microscópico por imunofluorescência, considerando que, em amostras ambientais, as formas infectantes íntegras destes protozoários podem estar dispersas e, geralmente, em quantidade bem inferior à das fezes.

MATERIAL E MÉTODOS

Região de estudo

O GVS - XV compreende 38 municípios dos quais dois têm captação de água exclusivamente superficial, nove contam com captação mista (rios e poços/minas) e os 27 restantes, captação subterrâneas (poços/minas). Foram selecionados para o presente estudo cinco municípios, sendo três com captação mista, um com superficial e um com subterrânea (minas). Outros critérios foram estabelecidos para a escolha das cidades, como a população e a importância econômica regional (para os de captação mista); tratamento convencional da água (captação superficial e mista); tratamento por filtração (captação subterrânea) e órgãos gestores do sistema de abastecimento vinculados às respectivas prefeituras.

Coleta da amostra

Foram coletadas dez amostras de água bruta em frascos de polietileno de 5 L, correspondendo duas amostras para cada um dos cinco municípios estudados. A primeira coleta foi realizada entre os meses de agosto e setembro de 2006 (1ª etapa – período seco) e a segunda entre janeiro e fevereiro de 2007 (2ª etapa – período chuvoso), observando-se a média dos índices pluviométricos destes municípios no período de 2001 a 2006.

Processamento da amostra

Foram filtrados 10 L de água bruta, em membrana de polycarbonato de 293 mm de diâmetro e 1 µm de porosidade, utilizando um sistema de filtração acoplado, por meio de mangueiras, a uma bomba de pressão positiva.

A eluição foi realizada adicionando-se 120 mL da solução de eluição (composta por Laureth a 10 %, Tris 1M, EDTA 0,5M e antifoam A) ao béquer contendo a membrana, seguido pela agitação em agitador de Kline por uma hora, com a rotação de 100 a 120 ciclos/minuto, transferindo-se este volume para tubo cônico de 250 mL. Foi realizado um segundo ciclo de agitação de 30 minutos após a adição de mais 120 mL de solução de eluição e complementada a limpeza da membrana com massageamento por dois minutos, lavagem em banho de ultrassom por dois minutos e novo massageamento. Este segundo volume da solução de eluição foi transferido para o mesmo tubo cônico utilizado inicialmente. A concentração foi realizada por centrifugação em 1.100 x g, por 20 minutos, até a obtenção do sedimento, e o sobrenadante foi aspirado até o volume de 5 mL. Este sedimento (amostra concentrada) foi utilizado na reação imunoenzimática (ELISA).

Método de ELISA

As reações de ELISA para a pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes dos kits, respectivamente, kit *Giardia* II, marca TechLab, lote 0705031, e kit *Cryptosporidium* test marca TechLab, lote 1005046, ambos para 96 reações e custo de R\$ 1.150,00 cada. Foram utilizados, em cada reação de ELISA, 50 µL e 100 µL das amostras concentradas para a pesquisa de *Giardia* e *Cryptosporidium*, respectivamente.

Para a interpretação dos resultados foi considerado o seguinte padrão de leitura, preconizado pelo fabricante dos kits – Leitora bicromática ($\lambda = 450/620$ nm): DO < 0,090 – reação negativa e DO \geq 0,090 – reação positiva.

Local das análises

As análises foram realizadas na Seção de Microscopia Alimentar do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas do Centro de Laboratório Regional de Bauru.

Sensibilidade dos kits de ELISA

Para a determinação da sensibilidade dos kits de ELISA, suspensões estoques de *Cryptosporidium parvum* genótipo bovino, adquiridas do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e de *Giardia duodenalis*, adquiridas da Fundação da Universidade Federal do Paraná (FUNPAR), foram

contadas em câmara de Neubauer e realizadas diluições, em água destilada, de maneira que as alíquotas utilizadas nas reações (100 e 50 µL, respectivamente) contivessem um número determinado e conhecido de oocistos e cistos. Em seguida, a metodologia foi aplicada seguindo os procedimentos das instruções dos fabricantes dos kits.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de sensibilidade dos Kits de ELISA para cistos e oocistos são apresentados na Tabela 1.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que os limites de detecção foram altos e, assim, somente em águas com altas densidades de cistos e oocistos seria possível encontrar os parasitas. Porém a concentração esperada para amostras ambientais é muito menor do que a observada em amostras fecais, além disso, estes protozoários estariam, teoricamente, dispersos na água do manancial, necessitando de concentração de grandes volumes da amostra.

Segundo o fabricante do kit para pesquisa de *Cryptosporidium*, são necessários 1.250 oocistos por poço da placa de ELISA (em amostras fecais) para que comece a ocorrer a positividade da reação. Como no presente estudo foi encontrado um número muito maior de oocistos para iniciar a positividade, novos estudos devem ser realizados para verificar os fatores que estariam provocando este resultado. Como os kits foram desenvolvidos e validados para amostras fecais, um destes fatores pode ter sido a diluição das soluções estoques de oocistos em água destilada, o que pode ter provocado condições desfavoráveis de reação e a interferência na determinação do limite de detecção.

Sales⁷ cita que, pelos resultados obtidos em seu estudo, o método de ELISA poderia ser utilizado como teste de triagem em amostras ambientais, porém, no presente estudo, devido ao elevado limite de detecção e ao pequeno número de amostras ambientais estudadas, esta conclusão ficou prejudicada.

A vantagem da utilização do método de ELISA é que os oocistos e cistos não precisam estar íntegros para que haja positividade na reação. Os antígenos liberados da parede desses protozoários podem formar o complexo antígeno-anticorpo e, assim, é possível detectar os parasitas, mesmo quando estes estejam degenerados pelo estresse ambiental ou pelas injúrias das diversas etapas do método de isolamento (filtração, tratamento químico

Tabela 1. Valores de densidades ópticas (DO) obtidas para suspensões de cistos e oocistos de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum* e resultados do teste ELISA

Suspensão estoque de oocistos (**) (X σ e RSD)	Cistos inoculados	ELISA		Suspensão estoque de oocistos (**) (X σ e RSD)	Oocistos inoculados	ELISA	
		DO 450/620 nm	Resultados			DO 450/620 nm	Resultados
X1, σ1, RSD1	25	0,016	Negativo	X5, σ5, RSD5	809	0,006	Negativo
X2, σ2, RSD2	51	0,044	Negativo	X6, σ6, RSD6	1117	0,014	Negativo
X3, σ3, RSD3	74	0,044	Negativo	X6, σ6, RSD6	1552	0,031	Negativo
X4, σ4, RSD4	98	0,196	Positivo	X6, σ6, RSD6	2060	0,036	Negativo
X4, σ4, RSD4	98	0,189	Positivo	X6, σ6, RSD6	2540	0,050	Negativo
X2, σ2, RSD2	103	0,126	Positivo	X6, σ6, RSD6	2540	0,052	Negativo
X4, σ4, RSD4	118	0,292	Positivo	X6, σ6, RSD6	2940	0,042	Negativo
X4, σ4, RSD4	118	0,282	Positivo	X6, σ6, RSD6	2940	0,061	Negativo
X4, σ4, RSD4	147	0,373	Positivo	X6, σ6, RSD6	3492	0,100	Positivo
X4, σ4, RSD4	147	0,356	Positivo	X6, σ6, RSD6	3492	0,151	Positivo
X4, σ4, RSD4	196	0,412	Positivo	X6, σ6, RSD6	3725	0,151	Positivo
X2, σ2, RSD2	206	0,285	Positivo	X6, σ6, RSD6	5587	0,152	Positivo
X3, σ3, RSD3	247	0,142	Positivo	X6, σ6, RSD6	5587	0,171	Positivo
X1, σ1, RSD1	250	0,132	Positivo	X6, σ6, RSD6	5587	0,097	Positivo

X = média

σ = desvio padrão

RSD = desvio padrão relativo

(*) *Giardia duodenalis*: X1= 260.000; σ1= 25.981; RSD1= 10,0 %
 X2= 124.000; σ2= 18.422; RSD2= 14,9 %
 X3= 58.750; σ3= 8.624; RSD3= 14,6 %
 X4= 47.143; σ4= 5.850; RSD4= 12,4 %

(**) *Cryptosporidium parvum*: X5= 422.500; σ5= 30.822; RSD5= 7,3 %
 X6= 223.500; σ1= 13.838; RSD= 6,2 %

e centrifugação), o que não ocorre com os métodos microscópicos, em que os oocistos e cistos precisam estar íntegros para serem considerados positivos na observação microscópica.

A Tabela 2 apresenta os resultados das amostras de água bruta coletada nos cinco municípios estudados.

Considerando-se como positivas as amostras que apresentaram leituras de densidade óptica (DO) $\geq 0,090$, obteve-se para *Cryptosporidium* 20 % de amostras positivas, nos mananciais dos municípios V (1ª etapa – período seco) e III (2ª etapa – período chuvoso). Quanto aos cistos de *Giardia*, todas as amostras foram negativas pelo ELISA.

Neste caso, o ensaio microscópico (monitoramento) deveria ser realizado nestes municípios para verificar a ocorrência de oocistos íntegros, o que representaria um risco em potencial para a saúde da população.

Siddons et al⁴, ao comparar resultados de amostras inoculadas com oocistos, verificaram que não existe uma concordância entre os métodos microscópicos e imunológicos e atribuem isso ao fato de que este último pode detectar tanto oocistos íntegros quanto antígenos livres e não sofrer interferências dos resíduos presentes nos sedimentos das amostras ambientais após sua concentração.

Sales⁷ analisou 90 amostras de água tratada, utilizando coloração histoquímica (Kinyoun) e métodos imunológicos (ELISA e Imunofluorescência direta) para a detecção de *Cryptosporidium* e encontrou 52,22 % das amostras com estruturas álcool-ácido resistentes, sendo que 15,55 % das amostras foram confirmadas nos testes imunológicos (13 amostras no teste de ELISA e 7 na imunofluorescência). Verificou que houve uma correlação positiva entre o ELISA e a imunofluorescência, em que

46,1 % das amostras positivas no ELISA foram positivas com a imunofluorescência. Concluiu que a metodologia imunoenzimática ELISA poderia ser utilizada como teste alternativo em amostras ambientais. No presente estudo, devido ao pequeno número de amostras avaliadas, à pequena porcentagem de amostras positivas e aos limites de detecção obtidos para estes parasitas, não é possível afirmar com segurança que este método pode ser aplicado na detecção destes protozoários em amostras ambientais.

Tabela 2. Valores de densidade óptica (DO) obtidos pelo método de ELISA para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de água bruta

Municípios	Período	DO 450/620 nm	
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
I	Seco	SR	0,069
II	Seco	0,010	0,010
III	Seco	0,049	0,019
IV	Seco	0,010	0,014
V	Seco	0,117	0,028
I	Chuvoso	0,085	0,014
II	Chuvoso	0,016	0,020
III	Chuvoso	0,112	0,011
IV	Chuvoso	0,089	0,060
V	Chuvoso	0,021	0,070

SR – Sem resultado

Michel e colaboradores compararam um teste de aglutinação (*co-agglutination test*) com os métodos de ELISA e Kinyoun para a confirmação de *Cryptosporidium* em fezes, soro e amostras ambientais e, como resultado, obtiveram que o teste de aglutinação e o ELISA detectaram a presença do parasita em amostras de água que foram negativas na coloração de Kinyoun, fato atribuído à baixa concentração de oocistos (necessários para positividade em ensaios microscópicos) ou à presença de antígenos solúveis liberados da parede dos oocistos degenerados.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que, devido aos altos limites de detecção obtidos no presente estudo, o método de ELISA não seria um bom teste de triagem para a pesquisa destes protozoários em águas e que, embora apresente limitações, o método microscópico preconizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA 1623.1) deve ser adotado para o monitoramento das amostras ambientais, sendo também útil a ferramenta de biologia molecular (PCR) para o estudo da epidemiologia destes parasitas.

REFERÊNCIAS

1. Franco RMB. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em Saúde Pública. *Rev Panam Infectol*. 2007;9(4):36-43.
2. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts. *Water Res*. 2004;38:818-62.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 Dez 2011. Seção I, p.39-46.
4. Siddons CA, Chapman PA, Rush BA. Evaluation of an enzyme immunoassay kit for detecting *Cryptosporidium* in feces and environmental samples. *J Clin Pathol*. 1992;45:479-82.
5. Cantusio Neto R. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
6. Francy DS, Simmons OD, Ware MW, Granger EJ, Sobsey MD, Schaefer FW. Effects of seeding procedures and water quality on recovery of *Cryptosporidium* oocysts from stream water by using U.S. Environmental Protection Agency Method 1623. *Appl Environm Microbiol*. 2004;70(7):4118-28.
7. Sales TFSM. Detecção de enteroparasitas e organismos do zooplâncton em água de consumo humano: risco à saúde pública [dissertação de mestrado]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 2006.
8. Michel MY, Khalifa AM, Ibrahim JR. Detection of *Cryptosporidium parvum* antigen by co-agglutination test and ELISA. *East Medit Health J*. 2000;6(5/6):898-907.