DESAFIOS NA GARANTIA DA VALIDADE DOS RESULTADOS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *CRYPTOSPORIDIUM* E *GIARDIA* EM ÁGUA BRUTA

Raphaela Rangel da Silva Araujo (1)
Bióloga pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Mestre em Ecologia pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Mestranda em Pesquisa Biomédica (Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias) pelo Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBCCF/UFRJ). Bióloga e Coordenadora do Setor de Biologia do Laboratório Central da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA).
Izabella Nery de Oliveira Ferreira(2)
Bióloga pela PUC Minas e especialista em Engenharia Ambiental pela PUC Minas. Bióloga do Setor de Biologia do Laboratório Central da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA).
Cristina Apolônia Oliveira dos Santos(3)
Bióloga pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Mestre em Ecologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Bióloga e Coordenadora Geral do Laboratório Central da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA).
Leopoldo Capanema de Almeida (4)
Biólogo pela PUC Minas e especialista em Comportamento Animal pela PUC Minas. Biólogo do Setor de Biologia do Laboratório Central da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA).

Endereço(1): BR 356, km 04, s/n – Belvedere - Belo Horizonte – Minas Gerais - CEP 30320-765 – Brasil – Tel: +55 (31) 3250-2382 – e-mail: raphaela.araujo@copasa.com.br

RESUMO

As doenças gastrointestinais transmitidas através da contaminação da água por protozoários, são um dos principais motivos de preocupação da saúde pública. Diante do aumento de casos, gravidade dos sintomas e controle da contaminação dos mananciais superficiais, tornou-se obrigatório no Brasil, a partir de 2011, o monitoramento dos (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* pelas empresas de saneamento. O objetivo deste estudo foi apresentar as dificuldades na implantação deste método na rotina analítica e na correta identificação destes microrganismos em água bruta, assegurando a validade dos resultados obtidos. A metodologia para identificação e quantificação de protozoários empregada neste estudo é descrita no método EPA 1623.1, com filtração através de cápsula Envirocheck® HV. Os resultados analisados foram obtidos de registros de carta de controle entre 2021 e 2023 para branco fortificado e matriz fortificada, que evidenciaram os desafios e obstáculos enfrentados na rotina analítica e na detecção de protozoários em relação às formas interferentes. Conclui-se que a implantação do método e a pesquisa de protozoários em água bruta deve ser realizada de forma específica e criteriosa a fim de se alcançar resultados válidos e satisfatórios para a implantação da metodologia e para a correta identificação dos (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia.*

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium* e *Giardia*, desafios metodológicos, EPA 1623.1

INTRODUÇÃO

A criptosporidiose e a giardíase são doenças gastrointestinais de veiculação hídrica, causadas pela ingestão da forma infectante dos protozoários patogênicos *Cryptosporidium* e *Giardia* pela via fecal-oral. A maioria dos casos são autolimitantes desenvolvendo quadros de diarreia, vômitos, náuseas e cólicas, porém, podem se tornar críticos com risco de óbito quando atingem pessoas gravemente imunocomprometidas (WHO, 2017). Sabe-se que as doenças de veiculação hídrica causadas por protozoários patogênicos e por vírus cada vez mais se tornam relevantes e de extrema preocupação

para a saúde pública, por serem microrganismos altamente resistentes às mais variadas condições ambientais, a tratamentos de água convencionais e por serem aptos a contagiar mesmo em pequenas concentrações de infectantes (GALE & STANFIELD, 2000).

As doenças causadas por *Cryptosporidium* e *Giardia* estão entre as de maior incidência de surtos nos últimos anos pelo mundo, entre 1984 e 2004 foram registrados 325 casos (KARANIS *et al.*, 2007); entre 2004 e 2010 foram 199 ocorrências (BALDURSSON & KARANIS, 2011) e no Brasil, no ano de 2019, aproximadamente 149 pessoas dentre várias idades foram infectadas devido a contaminação da água distribuída na cidade de Cascavel (PR) (MELO *et al.*, 2023). É importante salientar que a infecção pode ser provocada pela ingestão de pequenas concentrações de (oo)cistos: testes realizados em voluntários humanos evidenciam que de acordo com a espécie de *Giardia*, a ingestão de 10 a 25 cistos são capazes de contaminar o ser humano enquanto para *Cryptosporidium* 9 a 1.042 oocistos são suficientes para a infecção (FRANCO *et al.*, 2012; OKHUYSEN & CHAPPELL, 2002).

No Brasil, em decorrência dos crescentes casos de contaminação por ingestão de protozoários por veiculação hídrica, tornou-se obrigatório o monitoramento destes microrganismos a partir de 2011, com a publicação, pelo Ministério da Saúde da Portaria n. 2914. Hoje, as recomendações para monitoramento e tratamento da água dos mananciais superficiais que são pontos de captação para abastecimento público seguem as orientações fundamentadas pela Portaria GM/MS nº 888, de 04 de maio de 2021 (BRASIL, 2021).

Atualmente a metodologia utilizada internacionalmente para a detecção de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* é orientada pelo método 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA" - Método EPA 1623.1 (USEPA, 2012). Este método apresenta caminhos distintos para a pesquisa de protozoários, e a seleção do mesmo deve levar em conta vários fatores tais como custo, logística analítica e atendimento aos critérios de aceitação para a implantação da metodologia e consequentemente monitoramento adequado destes microrganismos.

Adicionalmente às questões que devem ser levadas em conta para a seleção da metodologia mais adequada, é importante mencionar que a pesquisa de (oo)cistos em água bruta possui outras dificuldades e desafios no que diz respeito a obtenção de protozoários, as quais pode-se citar: as características biológicas destes microrganismos sendo necessário um volume elevado de amostra para se ter uma recuperação considerável (HELLER *et al.*, 2004), a ocorrência de resultados falsos positivos e negativos causados por interferentes analíticos (FRANCO *et al.*, 2012), o amplo critério de aceitação estabelecido pela EPA 1623.1, que inclui baixos índices de recuperação, a perda de organismos no decorrer do procedimento de análise e a variabilidade do resultado encontrado pelo analista, a qual é a maior fonte de incerteza do método por depender de capacitação e aprimoramento contínuo das técnicas de identificação.

De acordo com o EPA 1623.1 todo laboratório que implanta e desenvolve a metodologia é obrigado a realizar um programa de Garantia da Qualidade (base documental que descreve as medidas globais que um laboratório utiliza para assegurar a qualidade de suas operações – processo analítico) e um programa de Controle da Qualidade (especificamente aplicado para garantir conformidade dos resultados em relação a critérios ou padrões estabelecidos e adotar ações corretivas quando esses padrões não são atendidos – resultado analítico). O EPA 1623.1 indica como fatores a serem controlados para assegurar a garantia e o controle da qualidade: documentação e análise dos dados obtidos (precisão e recuperação), controle da manutenção e desempenho dos equipamentos, qualidade e desempenho dos reagentes e treinamento e certificação dos analistas envolvidos nas análises. Testes para demonstração de capacidade e recuperação também são requeridos.

Afim de demonstrar o controle sobre o sistema analítico com a verificação contínua de parâmetros de desempenho, são utilizadas cartas de controle com limites definidos para a recuperação do analito

(protozoários) para amostras de branco fortificado e matriz fortificada. O próprio método EPA1623.1 preconiza a utilização dessas cartas de controle e indica os intervalos de recuperação aceitáveis.

O ensaio de recuperação constitui uma importante ferramenta para avaliação de processos analíticos. A recuperação relaciona-se com a exatidão, refletindo a quantidade de determinado analito, recuperado na análise, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (GONZALES *et al.*, 1999).

A carta de controle é utilizada para controlar a qualidade analítica dos dados obtidos, por meio da visualização de seus processos e suas variações. Com ela, é possível identificar os desvios dos padrões e como isso pode ser evitado e corrigido. A identificação de padrões também permite encontrar possíveis causas dos erros nos processos, beneficiando a busca por soluções nos procedimentos e a previsão de desempenhos futuros. Uma análise crítica das cartas de controle promove a geração de novas ideias para aperfeiçoar os processos a partir das análises obtidas. A observação de pontos fora de suas previsões possibilita a investigação das causas raízes e, assim, definir como elas podem ser resolvidas (TURUTA, T.B, 2015).

OBJETIVOS

Apresentar as dificuldades na pesquisa de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* através do Método EPA 1623.1 e analisar de forma crítica as possíveis implicações para o alcance de resultados válidos, assim como demostrar os resultados analíticos que tornam o Laboratório Central da Copasa apto para a análise de detecção e quantificação desses protozoários em água bruta.

METODOLOGIA UTILIZADA

A metodologia utilizada neste estudo é a orientada no método normalizado e aceito internacionalmente EPA 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA, 2012. As etapas analíticas envolvem os processos de filtração, eluição, concentração, detecção e enumeração de (oo)cistos desses protozoários. O método foi validado pelo Laboratório Central em 2018, com alteração na etapa de eluição (Ferreira *et al*., 2024), e acreditado pela CGCRE – Inmetro em 2020 na norma ISO/IEC 17025 (ABNT, 2017).

Na etapa de filtração foram utilizadas cápsulas Envirocheck® HV e o padrão utilizado no procedimento de fortificação foi a suspensão para spike BTF EasySeed™ (padrão ISO 17034:2016 contendo uma média de 98 a 102 (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* inativados, com um desvio padrão menor ou igual a 2,5). Na etapa de imunosseparação magnética, utilizou-se o kit Dynabeads® GC Combo, o qual apresenta esferas magnéticas revestidas por anticorpos purificados que se ligam aos (oo)cistos destes protozoários; na etapa de coloração empregou-se o reagente de detecção Aqua-glo™ e DAPI fabricado pelo próprio Laboratório Central. O uso de todos os insumos é aprovado pelo método EPA 1623.1.

Os parâmetros de desempenho (branco fortificado – BF, e matriz fortificada - MF) foram determinados de acordo com o método e testados segundo o procedimento operacional de controle de qualidade do Laboratório Central da Copasa para análise de protozoários utilizando a Cápsula Envirocheck® HV - Filtração, Adição de Dispersante, Eluição, Concentração, Purificação e Coloração da Amostra.

Para o branco fortificado o objetivo é verificar o comportamento do método, em termos de recuperação e precisão, na ausência de interferências de matriz. Foram utilizadas amostras de 10L de água grau reagente, contaminada artificialmente com uma suspensão padronizada de cistos e oocistos (EasySeed™) adquirida comercialmente.

Para a matriz fortificada foram utilizadas amostras de água bruta provenientes de mananciais superficiais do estado de Minas Gerais, uma vez que o objetivo era verificar o efeito das características da matriz (água bruta, sob influência de lançamentos de esgotos domésticos e industriais) sobre a recuperação de organismos. Da amostra da matriz, 1L foi separado e contaminado artificialmente com uma suspensão padronizada de cistos e oocistos (EasySeed™) adquirida comercialmente. O volume restante (9L) foi analisado sem a adição do padrão. Dessa maneira é possível verificar a provável quantidade de (oo)cistos na matriz fortificada que é de origem ambiental, avaliando o efeito de matriz da água sobre a sensibilidade e precisão da metodologia.

A metodologia EPA 1623.1 estabelece critérios de aceitação para a recuperação dos (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* a fim de que a metodologia seja eficiente para a detecção e identificação destes protozoários (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros de Desempenho e critérios de aceitação (recuperação)

Parâmetro de desempenho	Matriz	*Cryptosporidium* (%Recuperação)	*Giardia* (%Recuperação)
Branco Fortificado (BF)	Água grau reagente	33-100	22-100
Matriz Fortificada (MF)	Água bruta	32-100	8-100

Os dados utilizados compreendem os resultados para branco fortificado e matriz fortificada obtidos durante rotina analítica nos anos de 2021, 2022 e 2023 no Setor de Biologia do Laboratório Central da Copasa, totalizando 119 amostras de BF e 119 amostras de MF. Esses dados foram inseridos em cartas de controle e analisados criticamente após cada rodada analítica. Os resultados insatisfatórios foram evidenciados nas próprias cartas de controle e as tratativas, após análise crítica das mesmas, foram evidenciadas em documentos internos do sistema de gestão.

Para visualizar com que constância ocorrem as menores e maiores recuperações em matriz, calculou-se a distribuição de frequência das recuperações para matriz fortificada, tanto para *Cryptosporidium* quanto para *Giardia* e comparou-se com a distribuição de frequência das recuperações de matriz fortificada apresentada pela EPA 1623.1.

RESULTADOS OBTIDOS

As Figuras 1 e 2 abaixo indicam os resultados do branco fortificado para *Cryptosporidium* e *Giardia*, respectivamente, no período de 2021 a 2023. Foram analisadas 38 amostras no ano de 2021, 43 em 2022 e 38 em 2023, totalizando 119 amostras de BF. Conforme pode ser verificado, 15 amostras ficaram abaixo do limite de recuperação recomendado pela EPA (33%) para *Cryptosporidium*: 12 amostras em 2021 e 3 amostras em 2022. Para *Giardia* 7 amostras ficaram abaixo do limite de recuperação indicado pela EPA 1623.1 (22%): 6 amostras em 2021e 1 amostra em 2022.

Figura 1: Resultados da recuperação (%) para as amostras de branco fortificado para *Cryptosporidium* realizadas pelo Laboratório Central da Copasa e a recuperação mínima preconizada pelo método EPA 1623.1, para os anos de 2021 a 2023.

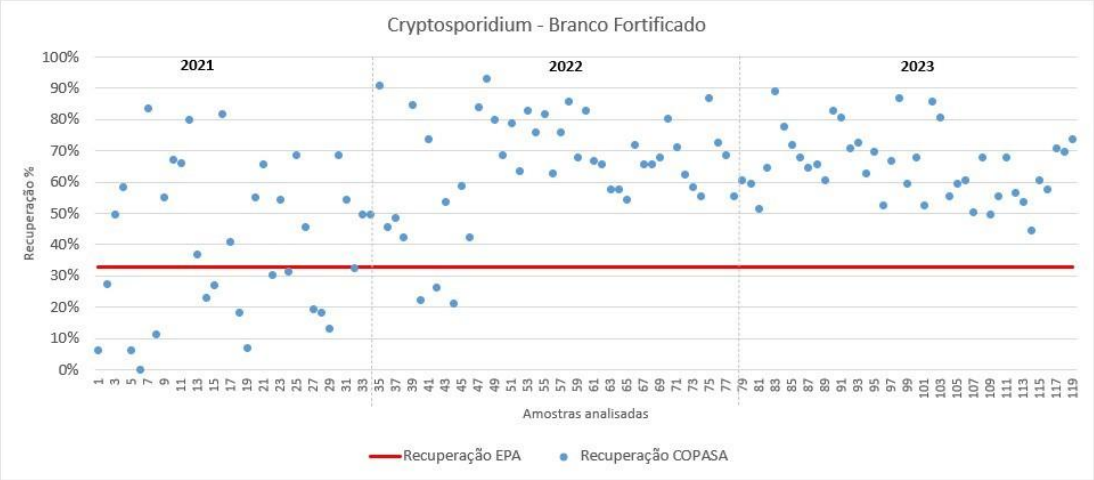
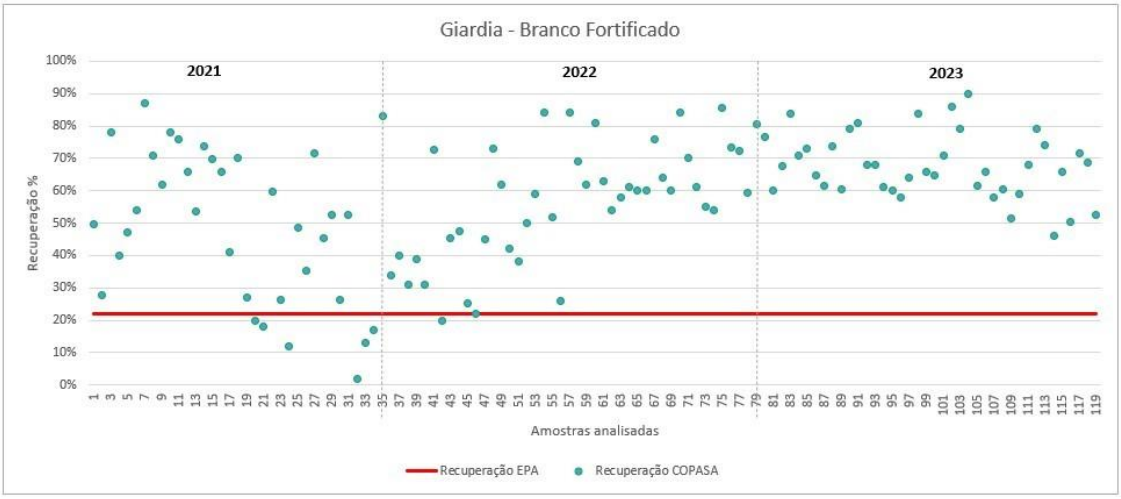


Figura 2: Resultados da recuperação (%) para as amostras de branco fortificado para *Giardia* realizadas pelo Laboratório Central da Copasa e a recuperação mínima preconizada pelo método EPA 1623.1, para os anos de 2021 a 2023.



As Figuras 3 e 4 abaixo indicam os resultados para matriz fortificada para *Cryptosporidium* e *Giardia*, respectivamente, no período de 2021 a 2023. Foram analisadas 38 amostras no ano de 2021, 43 em 2022 e 38 em 2023, totalizando 119 amostras de MF.

Conforme pode ser verificado, 9 amostras ficaram abaixo do limite de recuperação orientado pela EPA 1623.1 para *Cryptosporidium* (32%): 8 amostras em 2021 e 1 amostra em 2022. Para *Giardia* 1 amostra ficou abaixo do limite de recuperação indicado pela EPA (8%) em 2022.

Figura 3: Resultados da recuperação (%) para as amostras de matriz fortificada para *Cryptosporidium* realizadas pelo Laboratório Central da Copasa e a recuperação mínima preconizada pelo método EPA 1623.1, para os anos de 2021 a 2023.

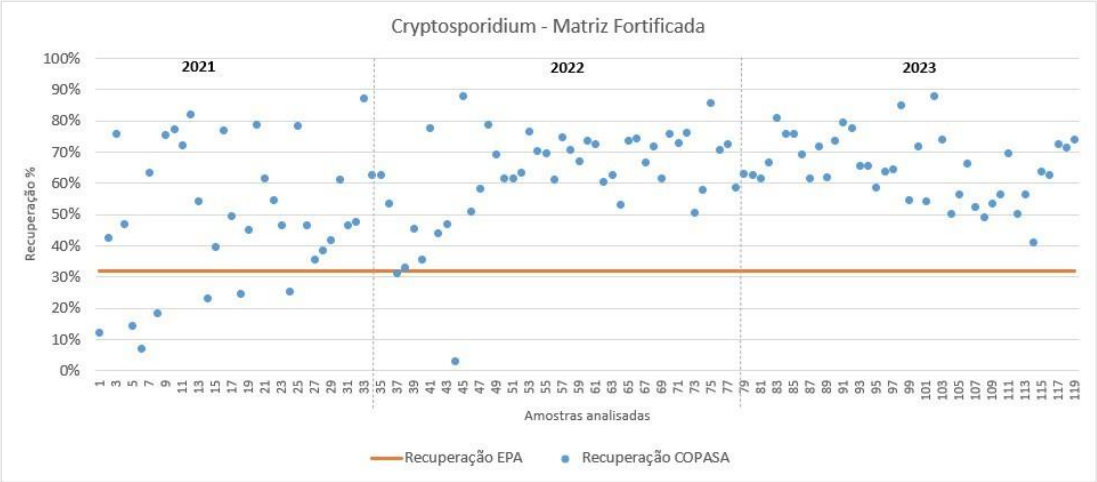
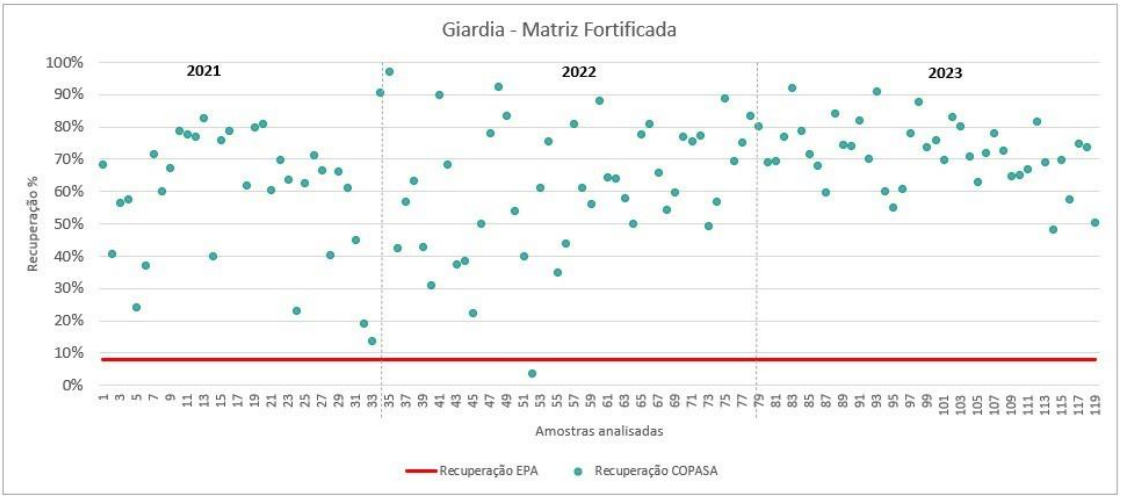
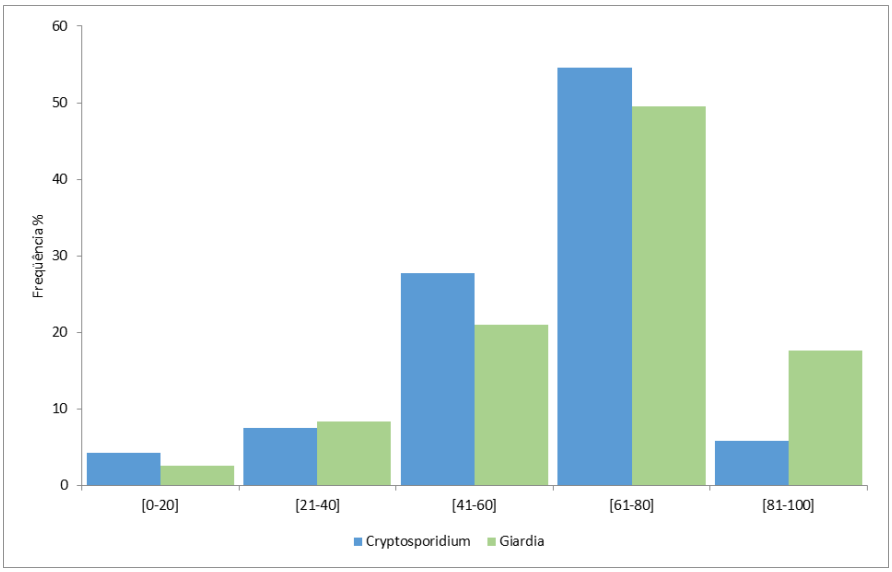


Figura 4: Resultados da recuperação (%) para as amostras de matriz fortificada para *Giardia* realizadas pelo Laboratório Central da Copasa e a recuperação mínima preconizada pelo método EPA 1623.1, para os anos de 2021 a 2023.



Utilizando somente os dados referentes à matriz fortificada para *Cryptosporidium* e *Giardia*, calculou-se a distribuição das recuperações das 119 amostras analisadas. O resultado pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5: Distribuição dos percentuais de recuperação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras analisadas para matriz fortificada entre os anos de 2021 a 2023.



De acordo com a Figura 5, mais de 50% de todas das matrizes fortificadas obtiveram recuperação na faixa de 61 a 80%. Menos que 10% das amostram apresentaram recuperação abaixo de 20%. A recuperação de Giardia foi superior ao Cryptosporidium na faixa superior a 81%, com aproximadamente 20% das amostras nessa faixa.

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O presente estudo evidenciou a grande variedade de resultados que foram considerados satisfatórios devido à larga faixa de aceitação estabelecida pelo método para a recuperação de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* para o branco fortificado e matriz fortificada, onde uma baixa recuperação, na qual o resultado próximo ao limite inferior, ainda é permitido podendo afetar diretamente no resultado analítico.

Nota-se que no ano de 2021 foram obtidos resultados insatisfatórios que diminuíram de incidência até serem ausentes no ano de 2023. Tais resultados foram analisados criticamente e realizou-se ações e testes que viabilizaram a melhora na recuperação de protozoários alcançando os critérios desejáveis para a continuidade do monitoramento de forma satisfatória. Nota-se que para matriz fortificada, os resultados têm sido satisfatórios desde 2022, com exceção de uma única amostra de *Giardia* e duas de *Cryptosporidium*, o que está possivelmente relacionado mais às características da matriz do que ao processo.

Dentre as propostas consideradas após a análise crítica das cartas de controle, citam-se:

1. Teste de eficiência do padrão: Avalia-se se nas etapas iniciais (filtração e eluição) há perda de protozoários ou se a mesma ocorre na etapa de imunosseparação magnética. Neste teste adiciona-se o conteúdo do padrão diretamente no tubo leighton e realiza-se a análise microscópica. Nossos resultados não indicaram diferença de recuperação entre as etapas envolvidas;
2. Teste de validade do padrão: verificou-se uma diminuição da recuperação de (oo)cistos quando se aproxima a data de expiração da validade.
3. Vistoria de reagentes e insumos utilizados para a fabricação das soluções usadas na

metodologia e produzidas pelo Laboratório Central: não se verificou a utilização de reagentes e insumos vencidos;
4. Acompanhamento dos testes por uma especialista da empresa fabricante da cápsula Envirocheck®: verificou-se o correto uso da mesma;
5. Aquisição de novos concentradores de partículas magnéticas (MPC5 e MPC6) para a etapa de imunosseparação magnética: verificou-se um aumento da recuperação tanto para branco fortificado quanto para matriz fortificada. O correto acoplamento entre os tubos e o MPC permite uma melhor atração entre as esferas magnéticas ligadas aos anticorpos e o imã presente nesses equipamentos.
6. Teste da força G das centrífugas: o método indica a força mínima de rotação de 1500 G (o que era utilizada pelo Laboratório Central), porém permite uso de até 2000 G, sugerindo que pode ocorrer melhoria da recuperação entre 1800 e 2000 G: foram verificadas melhorias nas recuperações utilizando-se a rotação com força G de 1700.

Além dessas alterações, outras foram propostas, levando-se em consideração as propriedades intrínsecas dos protozoários, como tamanho e aderência. Sendo:
1. Troca periódica das bombonas de coleta;
2. Troca periódica dos tubos de centrífuga;
3. Troca periódica dos tubos leighton;
4. Troca periódica da mangueira utilizada nas etapas de filtração e concentração das amostras;
5. Revisão do Procedimento de Preparação de Solução de Hexametafosfato de Sódio 5% PV;
6. Alteração na validade da solução Tampão de Eluição passando a ser de 15 dias (anterior, 30 dias).

Em 2023, o Laboratório Central da Copasa recebeu a visita técnica da especialista representante do fabricante do padrão de desempenho. A mesma orientou a necessidade de o padrão ser aclimatado em temperatura ambiente por um período de 15 a 30 minutos antes de ser utilizado a fim de que os (oo)cistos dos protozoários se desprendam da parede do tubo. Notou-se uma melhora na recuperação, porém, não significativa como a que foi evidenciada na alteração da força de centrifugação e na troca dos concentradores de partículas magnéticas.

O método EPA 1623.1 apresenta o resultado para a distribuição da recuperação em matriz fortificada para 430 amostras de *Cryptosporidium* e *Giardia*, cujos dados foram obtidos em análises interlaboratoriais utilizadas na validação da metodologia. Esses dados indicam que mais de 50% das recuperações encontram-se na faixa de 40-80% tanto para *Cryptosporidium* quanto para *Giardia*, resultados semelhantes aos obtidos pelo Laboratório Central da Copasa. Quando comparamos a frequência de recuperação na faixa inferior a 20%, o Laboratório Central da Copasa obteve melhores resultados: 4% e 3% para *Cryptosporidium* e *Giardia*, respectivamente, e o EPA 1623.1, 13% e 10% para *Cryptosporidium* e *Giardia*, respectivamente.

Além das alterações de insumos e equipamentos, é importante salientar que a recuperação de *Cryptosporidium* e *Giardia* nas matrizes fortificadas e consequentemente nas amostras de água bruta também pode ser afetada pelos volumes de amostra utilizados (1L e 9L, para matriz fortificada e para a matriz respectivamente) e também por interferentes presentes na matriz (efeito de matriz). Para efeito de volume, a heterogeneidade da amostra (Incerteza da dispersão de Poisson) (ROCHA, 2018), pode levar a um aumento da concentração de protozoários na amostra de menor volume (matriz fortificada), além do fato de que a perda de organismos em 1L tende a ser menor do que nos 9 L, o que também pode causar uma estimativa maior na matriz fortificada do que na amostra (matriz). Para o efeito de matriz, algumas situações podem dificultar a identificação precisa e correta dos protozoários nas amostras, diminuindo a detecção e influenciando de forma significativa no resultado final, como por exemplo a concentração de ferro, turbidez e pH da água bruta, presença de sujidades com a mesma dimensão dos (oo)cistos, as quais podem encobrir os mesmos e dificultar a sua detecção (YAKUB & STADTERMAN-KNAUER, 2000; DI GIORGIO *et al.*, 2002; KUHN *et al.*, 2002), presença de organismos e partículas interferentes que apresentam formatos, tamanhos similares aos

dos protozoários (Franco *et al.*, 2012) e que também possuem afinidade pelos corantes fotossensíveis que conferem as cores verde-maçã e azul nos filtros FITC e DAPI , respectivamente.

Outra questão a ser enfatizada é a importância do conhecimento do método pelos analistas responsáveis pelas análises. Apesar de a maioria das ações propostas quando analisadas separadamente não terem efeito significativo sobre a recuperação, quando verificadas em conjunto aumentaram e mantiveram a recuperação do método acima dos limites aceitáveis. Para que tais ações fossem propostas, os analistas realizaram um longo estudo da metodologia (EPA 1623.1) e pesquisas bibliográficas relacionadas às propriedades dos protozoários e outros métodos analíticos pertinentes. Tais ações foram importantes para aumentar a acurácia analítica durante todo o processo, e não somente referente ao treinamento de identificação microscópica dos protozoários. FRADETTE & CHARETTE (2022), em um trabalho sobre alterações dos protocolos de eluição e imunosseparação magnética do método EPA 1623.1 relatam que a inexperiência dos analistas com a metodologia pode contribuído com as taxas de recuperação relativamente baixas em alguns resultados obtidos.

O limite estabelecido pela Portaria GM/MS nº 888/21 para *Cryptosporidium* em água bruta é 1,0 oocistos/L, resultado obtido através do cálculo da média aritmética da incidência deste microrganismo após um monitoramento mensal pelo período de 12 meses. Acima desse valor, alterações significativas no padrão de turbidez da água filtrada obtido pela estação de tratamento de água devem ser realizadas, a fim de que haja uma remoção eficiente desses microrganismos. Tendo-se em vista a baixa densidade recomendada para o protozoário, quanto maior a recuperação e consequentemente a exatidão analítica, mais representativo é o resultado que irá embasar tais alterações operacionais.

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O monitoramento de protozoários e, consequentemente, o cumprimento da legislação vigente é de extrema importância e se torna imprescindível no controle destes microrganismos e na tomada de decisões eficientes para a remoção dos mesmos nas estações de tratamento de água.

Por outro lado, a metodologia para pesquisa de (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* é caracterizada por ser de alta especificidade e custo, sendo necessária a utilização de insumos em sua maioria importados. Além do mais, a recuperação pode ser consideravelmente afetada por características biológicas e físico-químicas da amostra de água, o que acarreta a obtenção de resultados variáveis e de baixa recuperação.

Considerando-se que a dose mínima infectante para o ser humano, tanto no caso da criptosporidiose como na giardiose, é baixa, é importante que as metodologias de detecção de protozoários em água apresentem sensibilidade e especificidade efetivas no sentido de concentrar pequenos números de (oo)cistos usualmente presentes nas amostras ambientais.

Estudos recentes têm evidenciado uma melhora na recuperação a partir de alterações de protocolo nas etapas iniciais (filtração e eluição) do método EPA1623.1 (FRADETTE & CHARETTE, 2022), assim como nanotecnologia e biosensoriamento associados à análise molecular melhoram tanto a recuperação quanto diminuem o tempo analítico (LUKA G, *et al.*, 2023).

Conclui-se, portanto, que apesar da metodologia apresentar limitações e dificuldades na implantação e no alcance de resultados desejáveis, é possível que a mesma seja implantada de forma eficiente na rotina analítica, desde que o laboratório utilize os devidos equipamentos e insumos orientados, realize testes e validações seguidos da análise da Demonstração Inicial de Capacidade (DIC), execute o Controle de Qualidade (CQA) da coloração a fim de atestar a eficiência dos corantes para identificação dos protozoários e proceda com a contínua capacitação dos profissionais envolvidos nas análises

visando o alcance dos critérios de aceitação e limites de recuperação estabelecidos pela metodologia tendo como propósito assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, sendo estes essenciais para a avaliação do risco de contaminação e diminuição da ocorrência dos surtos de doenças gastrointestinais ocasionados por protozoários.

REFERÊNCIAS BIBILIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇAO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 17025: Requisitos Gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**, Rio de Janeiro, 2017.

2. BALDURSSON , S., KARANIS , P. **Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010**. Wat Res, 2011. 6603-6614 p. v. 45.

3. BRASIL. Ministério da saúde. **Portaria MS/GM no 888, 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Diário Oficial, Brasilia, DF. 2021.

4. DI GIORGIO, C. L. , GONZALEZ, D.A. , HUITT C. C. ***Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using EPA method 1623.** Appl Environ Microbiol, 2002. 5952-5955 p. v.5

5. FERREIRA, I.N.O., ARAUJO, R.R.S., VALEF, C.N. MABUB, M.O. A., SANTOS, C.A.O. Validação da modificação do método "1623.1: **Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/ims/fa" - método epa 1623.1**. 3°Congresso Internacional de Engenharia Ambiental. Porto Alegre, 2024. *No prelo.*

6. FRADETTE, M-S., CHARETTE, S. J. **Working toward improved monitoring of Cryptosporidium and Giardia (oo)cysts in water samples: testing alternatives to elution and immunomagnetic separation from USEPA Method 1623.1.** [doi.org/10.1186/s13104-022- 06118-9] BMC Research Notes**,** 2022. [acesso 2024.5.23]

7. FRANCO, R. M. B., BRANCO, N., LEAL, D. A. G. **Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de C*ryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água** [doi: 10.5216/rpt.v41i2.19320]**.** Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology, Goiânia, v. 41, n. 2, 2012. Disponível em: https://revistas.ufg.br/iptsp/article/view/19320. [acesso 2024.04.26].

8. GALE, P. , STANFIELD, G. ***Cryptosporidium* during a simulated outbreak**. J Am Water Works Assoc, 2000. 105-116 p.

9. GONZÁLEZ, A. G., HERRADOR, M. A., ASUERO, A. G. **Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays**. Talanta, 1999. 729-736 p. v. 48.

10. HELLER, L., BASTOS, R.K.X, VIEIRA, M. B. C. M. , BEVILACQUA, P.D. , DE BRITO, L. L.A. MOTA, S. M. M. , OLIVEIRA, A. A. , MACHADO, P.M., SALVADOR, D.P., CARDOSO, A. B. **Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*:circulação no ambiente e riscos à saúde humana.** Epidemiol Serv Saúde, 2004. 13: 79-92 p. v. 13.

11. KARANIS, P., KOURENTI, C., SMITH, H. **Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt**. J Wat Health, 2007. 1-38 p. v.5.

12. KUHN, R. C., ROCK, C. M., OSHIMA, K. H. **Effects of pH and magnetic material on immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from concentrated water.** Appl Environ Microbiol, 2002. 2066-2070 p. v.68.

13. LUKA, G., SAMIEI, E. , TASNIM, N. , DALILI, A., NAJJARAN, H., HOORFAR, M. **Comprehensive review of conventional and state-of-the-art detection methods of Cryptosporidium.** [doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126714]**.** Journal of Hazardous Materials, 2022. ISSN 0304-3894. v.421. [acesso 2024.05.23]

14. MELO, A. R. F. F. RIBEIRO, F. S. , ALCANTARA , Y. N. G., CALLAÑAUPA Y. , J., SOARES, C.S.B., KAMINICE, T. M., DE MORAIS, J. C. L., & ZANONI, R. D. **Análise epidemiológica de óbitos por diarreia e gastroenterite de origem infecciosa presumível em crianças menores de 10 anos no Brasil e suas macrorregiões.** Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences, 2023. 608–617 p. v.5(4).

15. OKHUYSEN, P. C. , CHAPPELl, C. L. ***Cryptosporidium* determinants- are we there yet?** Int J Parasitol, 2022. 514-525 p. v.32.

16. ROCHA, D.F. **Pontos aleatórios na natureza: uma introdução aos processos de Poisson e suas aplicações.** Dissertação (Mestrado em Ciências – Mestrado Profissional em Matemática em Rede Nacional) – Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2018. 75p.

17. TURUTA, T. B. **Aplicação de cartas de controle como ferramenta de melhoria frente às dificuldades operacionais de laboratórios acreditados na ABNT NBR ISO/IEC 17025** [doi:10.11606/D.75.2015.tde-20052015-094414]. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015. Dissertação de Mestrado em Química Analítica e Inorgânica. [acesso 2024-05-21].

18. USEPA - Environmental Protection Agency. Office of Water. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA**. US Environmental Protection Agency. Washington DC, EEUU, 2012.

19. WHO - World Health Organization. **World Health Statistics 2017 Monitoring Health for the SDGs, Sustainable Development Goals.** WHO, Geneva. 2017.

20. YAKUB, G.P., STADTERMAN-KNAUER, K.L. **Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium* parvum and *Giardia* duodenalis from high-iron matrices**. Appl Environ Microbiol, 2000. 3628-3631 p. v.66.