Encontro Técnico
AESABESP
Congresso Nacional
de Saneamento e
Meio Ambiente



35ETC-06609

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

Raphaela Rangel da Silva Araújo
Izabella Nery de Oliveira Ferreira
Cristina Apolônia Oliveira Santos
Leopoldo Capanema de Almeida
Copasa – raphaela.araujo@copasa.com.br

OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

AESABESP
Associação dos Engenheiros da Sabesp

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;

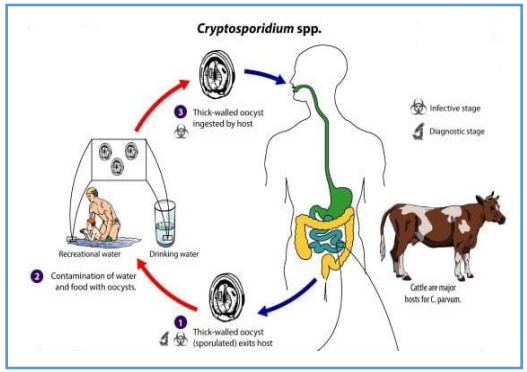


Figura 1 – Ciclo de transmissão da Criptosporidiose
Fonte: conceitosdomundo.pt

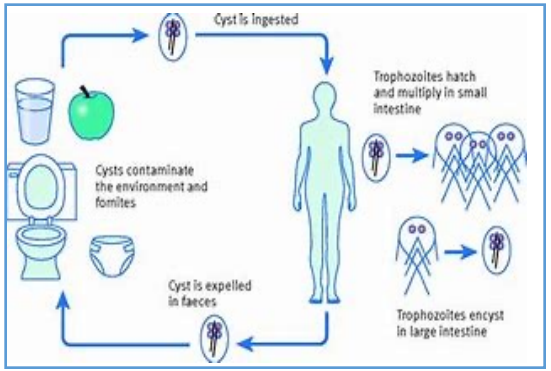


Figura 2 – Ciclo de transmissão da Giardíase
Fonte: conceitosdomundo.pt

- São microrganismos altamente resistentes às mais variadas condições ambientais, a tratamentos de água convencionais e são aptos a contagiarem mesmo em pequenas concentrações de infectantes.

- No Brasil, em decorrência dos crescentes casos de contaminação por ingestão de protozoários por veiculação hídrica, e a importância no controle dessas doenças, é obrigatório o monitoramento destes microrganismos (Portaria GM/MS nº 888/2021);



Ministério da Saúde
Gabinete do Ministro

PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021

Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, 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

O MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE, no uso das atribuições que lhe conferem os incisos I e II do parágrafo único do art. 87 da Constituição, resolve:

Art. 1º Esta Portaria dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, na forma do Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017.

Art. 2º O Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, passa a vigorar na forma do Anexo a esta Portaria.

Art. 3º Esta portaria entra em vigor na data de sua publicação.

§ 10º A concentração média de oocistos de Cryptosporidium spp., referida no § 7º deste Art., deve ser calculada considerando um número mínimo de 12 (doze) amostras uniformemente coletadas ao longo dos 12 meses de monitoramento.

- A pesquisa de (oo)cistos em água bruta apresenta algumas dificuldades e desafios na detecção destes microrganismos, como por exemplo:

1. **Características biológicas** – tamanho e aderência a sujidades das amostras;
2. **Necessário volume elevado de amostra** para se ter uma recuperação considerável;
3. **Ocorrência de resultados falsos positivos e negativos** - causados por interferentes analíticos;
4. **Amplo critério de aceitação estabelecido pela EPA 1623.1** - inclui baixos índices de recuperação;
5. **Perda de organismos** no decorrer do procedimento de análise;
6. **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.



Figura 3: *Giardia sp*
Fonte: conceitosdomundo.pt

- De acordo com o EPA 1623.1 todo laboratório que implanta e desenvolve a metodologia é obrigado a realizar um programa de Garantia e Controle da Qualidade Analítica, tais como:

1. Documentação e análise dos dados obtidos (precisão e recuperação);
2. Controle da manutenção e desempenho dos equipamentos;
3. Qualidade e desempenho dos reagentes;
4. Treinamento e certificação dos analistas envolvidos nas análises;
5. Testes para demonstração de capacidade e recuperação;
6. Utilização de **carta de controle** com a indicação de intervalos de recuperação aceitáveis.

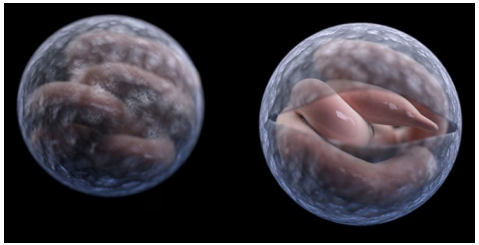


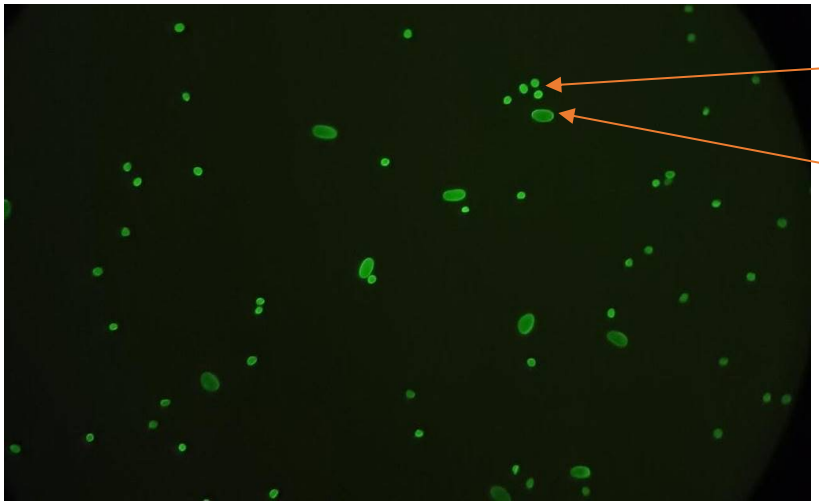
Figura 4: Oocisto de *Cryptosporidium sp*
Fonte: www.cdc.gov/cryptosporidium/about/index.html

- A **carta de controle** é uma importante ferramenta utilizada com a finalidade de demonstrar o controle sobre o sistema analítico. Sendo possível:

1. Identificar os desvios dos padrões e como essa ocorrência pode ser evitada e corrigida;
2. Identificar possíveis causas dos erros nos processos, beneficiando a busca por soluções nos procedimentos e a previsão de desempenhos futuros;
3. A análise crítica das cartas de controle promove a geração de novas ideias para aperfeiçoar os processos a partir das análises obtidas;
4. A observação de pontos fora de suas previsões possibilita a investigação das causas raízes e a definir de suas soluções.

Objetivos

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



***Cryptosporidium sp*: 4 a 6 µm**

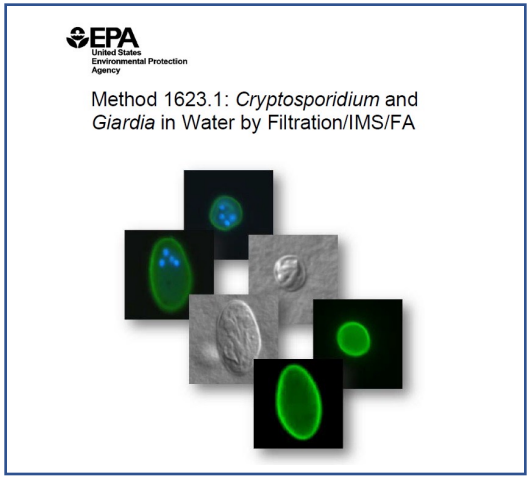
***Giardia sp:* 8 a 18 µm de comprimento**
5 a 15 µm de largura

Figura 5 – (oo)Cistos de *Cryptosporidium sp* e *Giardia sp*
Fonte: Mabub, 2022

Metodologia

- 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**.

- Este método apresenta caminhos distintos para a pesquisa de protozoários, e a seleção do mesmo deve levar em conta fatores como **custo**, **logística analítica** e **atendimento aos critérios de aceitação** para a implantação da metodologia e consequentemente monitoramento adequado destes microrganismos;



- As etapas analíticas envolvem os processos de **filtração**, **eluição**, **concentração**, **detecção** e **enumeração de (oo)cistos** desses protozoários.



Figuras 6 a 14 – Etapas analíticas da metodologia
Fonte: Louro, 2022

•O método foi validado pelo Laboratório Central em 2018, com alteração na etapa de eluição e acreditado pela **CGCRE** – Inmetro em 2020 na norma ISO/IEC 17025 (ABNT, 2017);

•**Insumos** utilizados e aprovados pelo método EPA 1623.1:

1.Cápsulas Envirocheck® HV;

2.Padrão ISO 17034:2016 para spike BTF EasySeed™ ;

3.Kit Dynabeads® GC Combo;

4.Reagente de coloração Aqua-glo™;

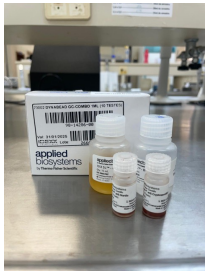
5.DAPI fabricado pelo próprio Laboratório Central da Copasa.



Cápsula Envirochek - 1 µm de **porosidade**



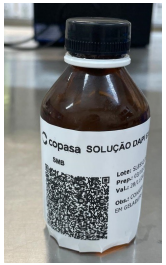
EasySeed - Padrão Quantitativo para Análises de Crypto e Giárdia



Kit Dynabeads



Aqua-glo



DAPI

- 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):

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

Tabela 1: Parâmetros de desempenho e Critérios de aceitação (recuperação)
Fonte: EPA 1623.1

→ A finalidade do **branco fortificado (BF)** é verificar o comportamento do método, em termos de recuperação e precisão, na ausência de interferências de matriz;

→ O objetivo da **matriz fortificada (MF)** é verificar o efeito das características da matriz (água bruta, sob influência de lançamentos de esgotos domésticos e industriais) sobre a recuperação de organismos;

→ O propósito de analisar a **matriz** é 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.

- Os dados apresentados 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 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.*

Resultados

- Entre os anos de 2021 a 2023, foram analisadas 119 amostras de **branco fortificado** para *Cryptosporidium* e *Giardia.* Sendo 38 amostras no ano de 2021, 43 em 2022 e 38 em 2023.

- Conforme pode ser verificado, 15 amostras ficaram abaixo do limite de recuperação recomendado pela EPA 1623.1 (33%) para *Cryptosporidium:*

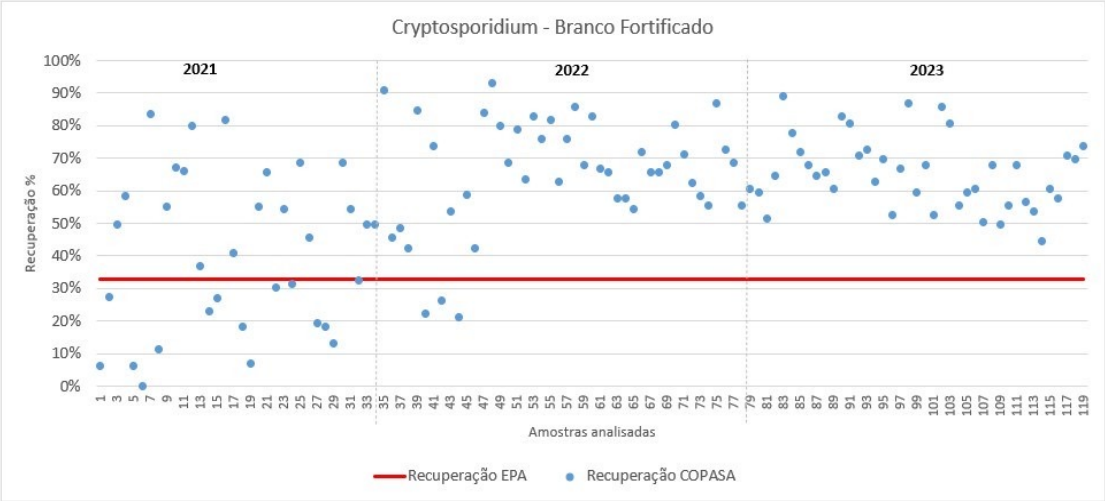


Figura 15: Resultados da recuperação (%) para as amostras de branco fortificado para *Cryptosporidium* realizadas pelo Laboratório Central da Copasa e a recuperação mínima preconizada pelo método EPA 1623.1, para os anos de 2021 a 2023.

- Na figura abaixo percebe-se que para *Giardia* 7 amostras ficaram abaixo do limite de recuperação indicado pela EPA 1623.1 (22%).

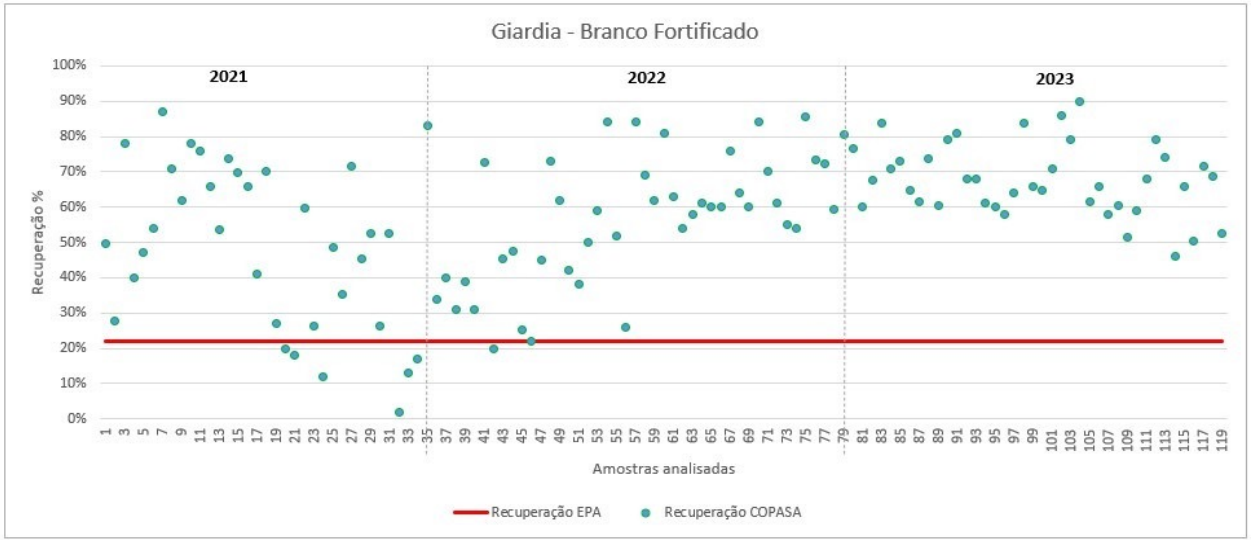


Figura 16: Resultados da recuperação (%) para as amostras de branco fortificado para *Giardia* realizadas pelo Laboratório Central da Copasa e a recuperação mínima preconizada pelo método EPA 1623.1, para os anos de 2021 a 2023.

- Entre os anos de 2021 a 2023, foram analisadas **119** amostras de **matriz fortificada** para *Cryptosporidium* e *Giardia.* Sendo 38 amostras no ano de 2021, 43 em 2022 e 38 em 2023.

- Conforme pode ser verificado, 9 amostras ficaram abaixo do limite de recuperação orientado pela EPA 1623.1 para *Cryptosporidium* (32%)

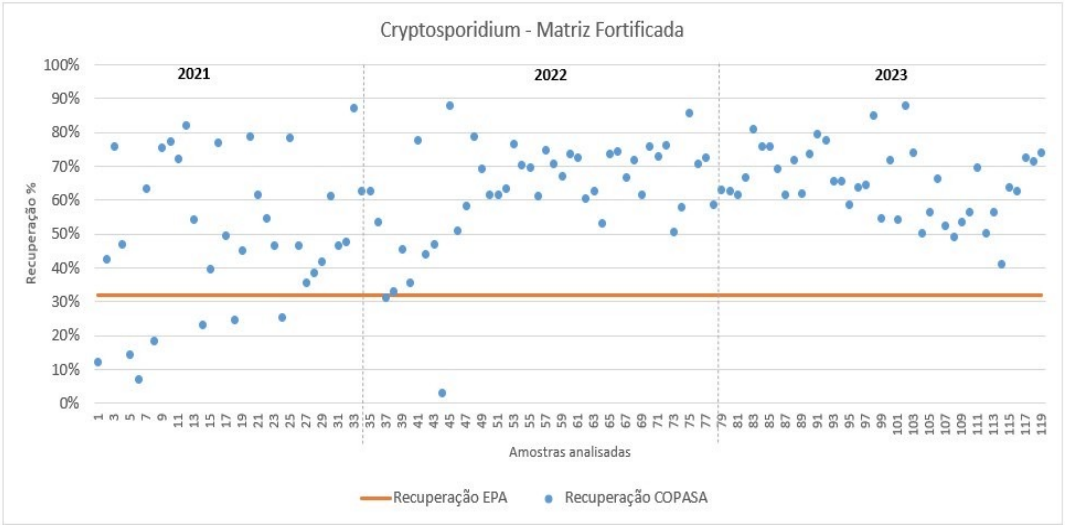


Figura 17: Resultados da recuperação (%) para as amostras de matriz fortificada para *Cryptosporidium* realizadas pelo Laboratório Central da Copasa e a recuperação mínima preconizada pelo método EPA 1623.1, para os anos de 2021 a 2023.

- Na figura abaixo percebe-se que para *Giardia* 1 amostra ficou abaixo do limite de recuperação indicado pela EPA (8%) em 2022.

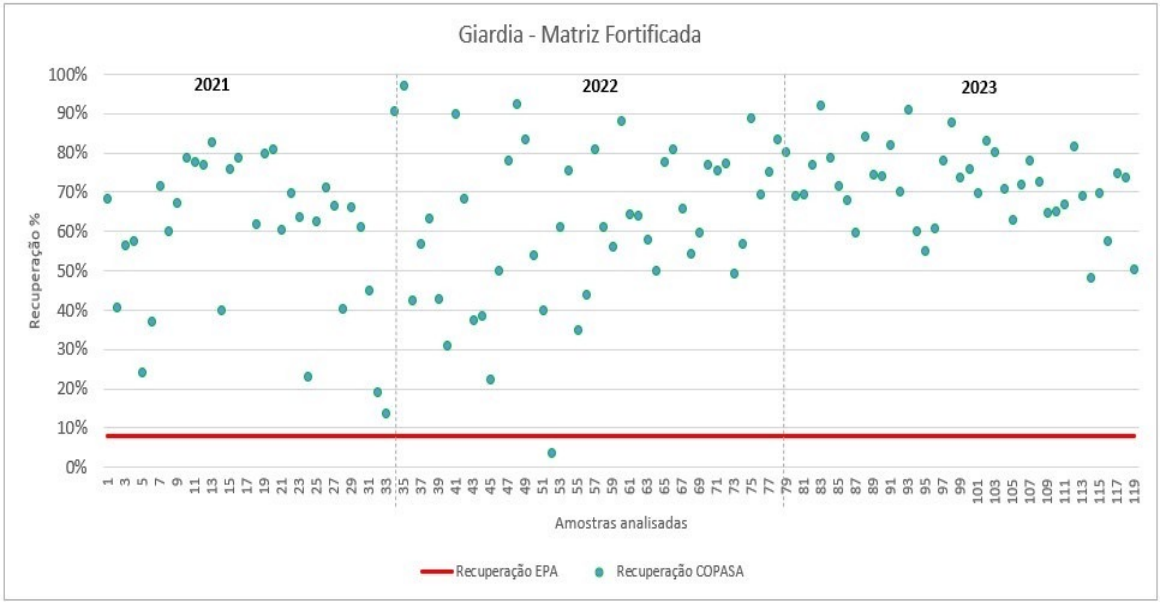


Figura 17: Resultados da recuperação (%) para as amostras de matriz fortificada para *Giardia* realizadas pelo Laboratório Central da Copasa e a recuperação mínima preconizada pelo método EPA 1623.1, para os anos de 2021 a 2023.

- Utilizando somente os dados referentes à matriz fortificada para *Cryptosporidium* e *Giardia*, calculou-se a distribuição das recuperações das 119 amostras analisadas;

- Comparou-se com a distribuição de frequência das recuperações de matriz fortificada (430 amostras) apresentada pela EPA 1623.1 obtidas em análises interlaboratoriais utilizadas na validação da metodologia;

- 50% das recuperações realizadas pela EPA 1623.1 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 também obteve resultados semelhantes.

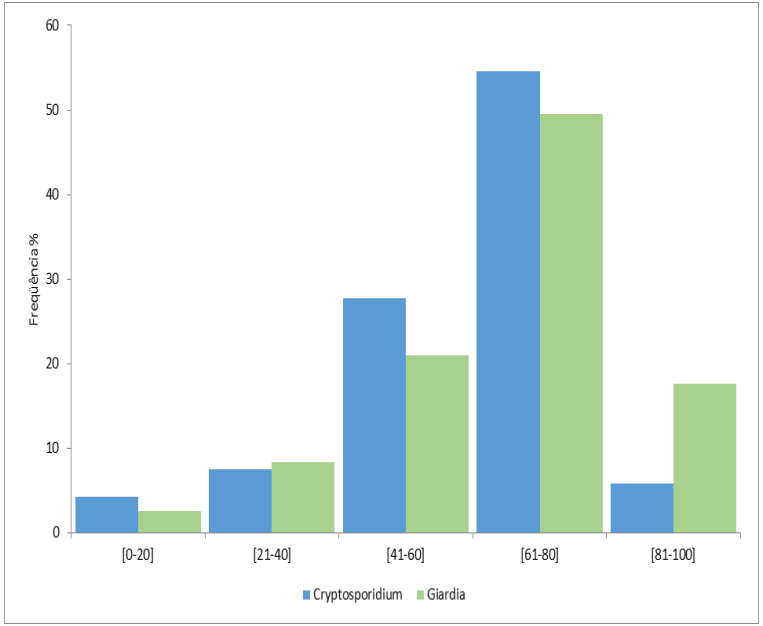


Figura 19: Distribuição dos percentuais de recuperação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras analisadas para matriz fortificada entre os anos de 2021 a 2023.

- Mais de 50% de todas as matrizes fortificadas obtiveram recuperação na faixa de 61 a 80%;

- Menos que 10% das amostras apresentaram recuperação abaixo de 20%;

- A recuperação de *Giardia* foi superior a de *Cryptosporidium* na faixa superior a 81%, sendo aproximadamente 20% das amostras analizadas se encontram nessa faixa.

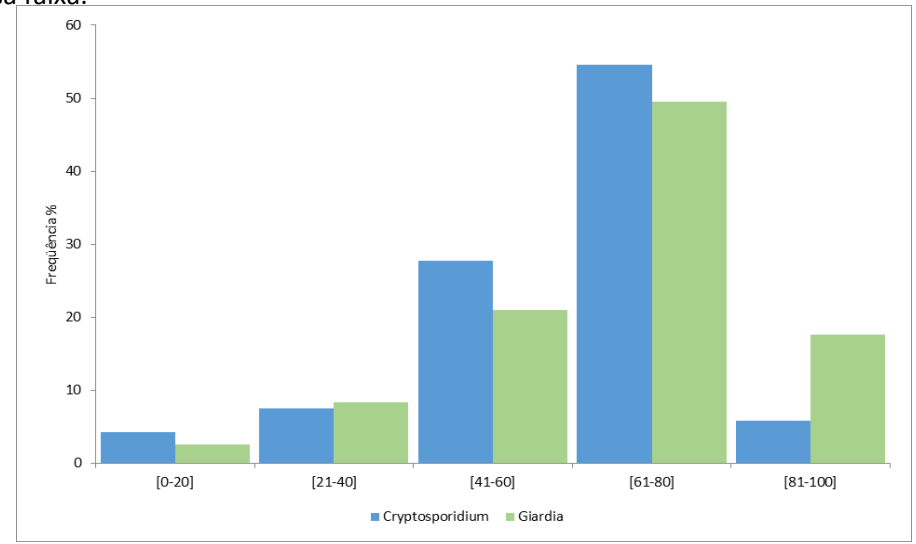


Figura 20: Distribuição dos percentuais de recuperação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras analisadas para matriz fortificada entre os anos de 2021 a 2023.

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 BF e MF, onde uma baixa recuperação, ainda é permitida podendo afetar diretamente no resultado analítico;

- 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;

- Com relação à 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;
2. **Teste de validade do padrão:** diminuição na recuperação quando o insumo está próximo da validade;
3. **Vistoria de reagentes e insumos utilizados para a fabricação das soluções usadas na metodologia e produzidas pelo Laboratório Central;**
4. **Acompanhamento dos testes por uma especialista da empresa fabricante da cápsula Envirocheck®:** o insumo estava sendo usado corretamente;
5. **Aquisição de novos concentradores de partículas magnéticas (MPCS e MPC6) para a etapa de imunosseparação magnética:** evidenciado uma melhor recuperação tanto para o BF quanto para MF;
6. **Teste da força G das centrífugas:** foram verificadas melhorias nas recuperações utilizando-se a rotação com força G de 1700.

- Além das alterações citadas, 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).

•Ressalta-se a grande importância do **conhecimento técnico do método** pelos analistas responsáveis pelas análises - os analistas do Laboratório Central da Copasa realizaram um longo estudo da metodologia (EPA 1623.1), treinamento de identificação microscópica dos protozoários, pesquisas bibliográficas relacionadas às propriedades dos protozoários e outros métodos analíticos pertinentes;

•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 nos limites aceitáveis.

- Além das alterações de insumos e equipamentos, salienta-se que a recuperação de *Cryptosporidium* e *Giardia* nas matrizes fortificadas e consequentemente nas amostras de água bruta também pode ser afetada por algumas situações, como:

1. **Concentração de ferro**;
2. **Turbidez e pH da água bruta**;
3. **Sujidade** com a mesma dimensão dos (oo)cistos, as quais podem encobrir os mesmos e dificultar a sua detecção;
4. **Presença de organismos e partículas interferentes** que apresentam formatos, tamanhos similares aos dos protozoários e afinidade pelos corantes fotossensíveis (FITC e DAPI).

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 nas estações de tratamento de água;

- 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;

- Tendo-se em vista a baixa densidade recomendada pelo método para a recuperação dos protozoários**, quanto maior a recuperação do método** e consequentemente a exatidão analítica**, mais representativo** é o resultado que irá embasar tais alterações operacionais.

- Diante do apresentado, podemos salientar características importantes sobre a metodologia:

Alta especificidade e **custo**: uso de insumos, em sua maioria, importados;

A detecção pode ser afetada pelas características **biológicas** e **físico-químicas** da amostra de água: obtenção de resultados variáveis e de baixa recuperação;

Necessária **alta sensibilidade metodológica** e **capacitação dos profissionais** para detectar desde pequenas a altas incidências de (oo)cistos usualmente presentes nas amostras ambientais.

- Conclui-se que, apesar da metodologia apresentar limitações e dificuldades na implantação e no alcance de resultados desejáveis, é possível que o método seja estabelecido de forma eficiente na rotina analítica, desde que o laboratório:

1. Utilize os devidos equipamentos e insumos orientados;
2. Realize testes e validações seguidos da análise da Demonstração Inicial de Capacidade (DIC);
3. Execute o Controle de Qualidade (CQA) da coloração a fim de atestar a eficiência dos corantes para identificação dos protozoários;
4. Proceda com a contínua capacitação dos profissionais envolvidos nas análises visando o alcance dos critérios de aceitação e limites de recuperação estabelecidos pela metodologia.

→ Todas as ações citadas têm 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.

Encontro Técnico AESABESP
Congresso Nacional de Saneamento e Meio Ambiente

Obrigada!

Izabella Nery de Oliveira Ferreira

Bióloga do Setor de Biologia do Laboratório Central da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (Copasa).



izabella.ferreira@copasa.com.br