

SANTOS, S. F. O.; SILVA, H. D.; SOUZA Jr, E. S.; ANUNCIACÃO, C. E.; SOUTO, R. L.; SILVA, E. A.; WOSNJUK, L. C.; GARCIA-ZAPATA, M. T. A. Parasitos oportunistas em águas fluviais e de uso humano no município de Goiânia-Goiás, Brasil. CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 2., 2005, Goiânia. Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005. n.p.

PARASITOS OPORTUNISTAS EM ÁGUAS FLUVIAIS E DE USO HUMANO NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GOÍÁS, BRASIL.

SANTOS, Sônia de Fátima Oliveira ¹; **Silva**, Hugo Delleon²; **SOUZA Jr**, Edson Sidião³; **ANUNCIACÃO**, Carlos Eduardo ⁴; **SOUTO**, Rodrigo Lourenço⁵; **SILVA**, Elaine Andrade⁶; **WOSNJUK**, Ludmila Cavalcante⁷; **GARCIA-ZAPATA**, Marco Tulio Antonio⁸

Palavras-chave: Água, coccidioses, marcadores parasitológicos, PCR.

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

A água é uma substância de importância vital para os seres vivos, porém, devido à ação antrópica, inúmeros microrganismos são disseminados para ambientes aquáticos. Sabe-se que os microrganismos dotados de potencial ação patogênica chegam aos ambientes aquáticos através das excreções intestinais do homem e de outros animais. Assim, uma atenção especial deve ser dada às análises de qualidade das águas potáveis, pois a água proporciona um meio de veiculação destes patógenos. Recentes pesquisas têm demonstrado a utilização de outros indicadores bacterianos, como o *Helicobacter pylori*, (bactéria oportunista) que pode gerar além de quadros de gastrite, neoplasias digestivas (SANTANA Jr, 2005). Em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento é notória a precariedade e a ineficiência no tratamento de água e esgoto, acarretando sérios problemas de saúde pública. Neste sentido, uma maior importância deve ser destinada aos parasitos, uma vez que, no Brasil, são os principais agentes causadores das gastroenterites. Dentre os parasitos, os protozoários (oportunistas) ocasionam importantes problemas de contaminação das águas consideradas "potáveis". Alguns protozoários como o *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* são bons exemplos de importantes agentes biológicos contaminantes da água e que acarretam diarreias em várias partes do mundo. (Garcia-Zapata, 2003). No entanto os surtos causados por agentes parasitários ainda necessitam de maior atenção, e a inexistência de metodologia padronizada para detecção em águas, dificultam o esclarecimento e conseqüentemente há sub-notificação de casos. Este estudo tem por objetivo avaliar a qualidade da água de uso humano da cidade de Goiânia-Goiás, com relação à presença de protozoários emergentes oportunistas potencialmente infectantes para o homem, com ênfase na pesquisa dos coccídeos e dos microsporídios intestinais. Será feito ainda o monitoramento de dois lagos da cidade, o Bosque dos Buritis e o Parque Vaca Brava.

2. METODOLOGIA

2.1 Área de estudo

- O **Rio Meia Ponte** nasce na serra dos Brandões, no município goiano de Itauçu de uma região de característica rural com atividades predominantes de pecuária leiteira e pequenas lavouras, denominadas Mato Dentro, na altitude de 983 metros. Localiza-se no centro-sul de Goiás, dando afluência para o Rio Paranaíba na divisa de Goiás e Minas Gerais. O rio tem uma extensão de aproximadamente 432 quilômetros, desembocando no Paranaíba com vazão média em torno de 12 m³/s. Sua importância se dá por ser um dos principais mananciais de abastecimento de Goiânia, capital do Estado, onde, além de suprir cerca de 45% da população da capital, é também o receptor de todo esgoto sanitário ali gerado. É o principal manancial de abastecimento público das cidades de Itauçu, Inhumas e Brazabranes. Além disso, o Rio Meia Ponte está na área mais densamente povoada de Goiás. Seu uso como receptor do esgoto sanitário da capital vem crescendo nos últimos anos, produzindo um impacto negativo na qualidade ambiental de toda essa região.

- O **Ribeirão João Leite**, cuja vazão média situa-se na faixa de 6 m³/s, é um dos principais afluentes, da margem esquerda do Rio Meia Ponte. Nasce na Serra do Sapato Arcado, Município de Ouro Verde, seus principais tributários são o córrego das pedras, a noroeste, e o córrego Jurubatuba, a nordeste, que confluem formando o curso principal. É um dos componentes da bacia hidrográfica do Rio Paranaíba, abrangendo partes dos Municípios de Goiânia, Anápolis, Ouro Verde, Nerópolis e Goianópolis, com uma área de 751,51 km² e extensão aproximada de 130 quilômetros. Os impactos e agressões ambientais, verificadas na sua bacia são resultantes da olericultura na área de suas nascentes, despejos domésticos e industriais originados da cidade de Anápolis e carreados por seu principal afluente (córrego Jurubatuba). No seu trecho médio, registram-se impactos oriundos das atividades relacionadas à agricultura de pequeno porte, pecuária leiteira e de serviços.

- Os dois lagos da cidade, o **Bosque dos Buritis** e o **Parque Vaca Brava**.

- Estação de água tratada da **estação Jaime Câmara**.

2.2 Colheita e processamento das amostras

As amostras estão sendo coletadas em 2 galões para volume de 5,0 Litros cada, perfazendo um total de 10 litros de água, em seis (6) pontos pré – estabelecidos:

-Os dois primeiros pontos de coleta será no Ribeirão João Leite; antes da captação da SANEAGO, e o segundo, ponto é antes do município de Goiânia, nos cruzamentos do córrego Jenipapo com córrego da Posse.

-Outros dois pontos serão no Rio Meia Ponte, com a primeira coleta na jusante e a segunda no montante da E.T.E. (Estação de Tratamento de Esgoto).

-O quinto e sexto pontos são os lagos, Bosque dos Buritis e o Parque Vaca Brava.

-O último ponto de coleta é a Estação de água tratada da estação Jaime Câmara, sendo coletada diretamente de uma torneira de água das ruas que abastece as

caixas de água da capital. As análises serão realizadas pela Unidade de Protozoologia do IPTSP/UFG e no Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular – ICB/UFG.

-O diagnóstico está sendo realizado de acordo com o método da membrana filtrante preconizados pelo 'Standard Methods for the Examination of water and wastewater', para pesquisa de bactérias do grupo coliformes, coliformes de origem fecal e *Salmonella.sp.*

2.3 Procedimentos:

-A água está sendo filtrada imediatamente após a coleta em membrana Millipore HA Éster de celulose, 0,45µ de poro, 47 mm de diâmetro, branca e lisa. Estas são colocadas em frascos de vidro de boca larga com tampa rosqueada contendo 10 ml de solução PBS com 1/100 Tween 80. Após eluição do material retido na membrana por agitação manualmente, a amostra é alíquotada e conservada a -20°C.

-Uma parte, 50 ml da água é dividida em dois cálices de 25 ml para (método de Hoffman Pons e Janner modificado) para pesquisa de ovos, larvas de helmintos e/ou cistos de protozoários.

-Uma alíquota da amostra (10 ml) da água é centrifugada durante 10 minutos a 1.500 rpm em tubos (15 ml) com tampa de vaco.

-Parte do sedimento (10 µl) é feito esfregaço para coloração específica para o diagnóstico de Coccídios (*Cryptosporidios*, *Cyclospora* e *Isopora*) utilizando as técnicas de *Kinyoun* à quente e *Ziehl-Neelsen* modificado e observado em microscopia óptica comum com objetiva de imersão.

-Para pesquisa específica de *Cryptosporidium sp* e *Giardia lamblia* está sendo utilizada a técnica de Imunofluorescência Direta pelo Kit de diagnóstico imunológico MeriFluor®.

-Para a pesquisa de Microsporídios intestinais é utilizada a técnica de Kokoskin et al. (1994) e Gram-Cromótopo (Moura et al., 1996)

-Para análise molecular, uma alíquota do material será tratada com enzima hidrolítica liticase e proteinase k (100 mg/ml), incubados por 3 minutos.

-O DNA será extraído com solução de Isoticianato de Guanidina associado a resinas catiônicas.

-Os Primers V1 (5'-CAC CAG GTT GAT TCT GCC TGA C-3') e PMP2 (5-CCT CTC CGG AAC CAA ACC CTG-3') serão usados para amplificar um fragmento de DNA 250-pb de SSU rRNA do específico do *Enrrocitoozon bieneusi* e outro fragmento de DNA 270-pb específico de *Encephalitozoon intestinalis* anelando a 60°C.¹⁹.

-Os produtos da PCR serão separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo na concentração de 20mg/ml e visualizados diretamente sob luz UV em transluminador.

-Para amplificação diferencial DNA *Cyclospora* e *Cryptosporidium*, serão definidos Primers a partir da análise da seqüência dos rDNAs dos dois Gêneros. O conjunto de Primers assim definido será utilizado para a reação de PCR utilizando uma fração do DNA extraído e analisado em gel conforme descrito acima.

-Para amplificação diferencial DNA *Cyclospora* e *Cryptosporidium*, serão definidos Primers a partir da análise da seqüência dos rDNAs dos dois Gêneros.

-O conjunto de Primers assim definido será utilizado para a reação de PCR utilizando uma fração do DNA extraído e analisado em gel conforme descrito acima.

2.4 - Análise estatística: Os resultados obtidos serão repassados para um banco de dados, com posterior análise pelo Programa EPINFO versão 6.4d. A análise estatística realizada será através do Teste χ^2 , com margem de erro de 0,5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados preliminares apresentados correspondem ao período de fevereiro a agosto de 2006 num total de 26 amostras coletadas 11(42,3%) estavam positivas para ovos e/ou larvas de helmintos (método de Hoffman), os quais estão sendo identificados, sendo que desses, 1(2,6%) foi identificado como sendo ovo de *Hymenolepis diminuta*. As lâminas que foram coradas para os coccídeos, e microsporídios e analisadas, 15(57,6%), foram negativas. Para a técnica de Mariflour, 8(30,7%) foram negativas. Espera-se que com o desenvolvimento e aprimoramento dessas técnicas esse estudo seja viável para determinação, identificação e especificação desses parasitos.

4. CONCLUSÃO

Nas análises realizadas, até o momento, foram encontrados ovos de helmintos e dentre os já identificados verificou-se ovos de *Hymenolepis diminuta*, e apesar de não ter sido verificados ainda nenhuma amostra positiva para os protozoários oportunistas, talvez seja necessário uma melhor adaptação às técnicas empregadas. Outro ponto relevante é quanto à dificuldade no reconhecimento desses parasitos devido a alterações morfológicas em consequência de fatores ambientais adversos que podem alterar a morfologia dos cistos e oocistos. É possível, ainda, um maior índice de positividade devido às contaminações, impactos, e agressões ambientais verificadas nas extensões dos rios em estudos e que são resultantes da olericultura na área de nascentes, despejos domésticos e industriais, bem como esgotos clandestinos observados nas extensões desses rios. Espera-se, então, uma contribuição no conhecimento da biologia destes parasitos, permitindo melhor investigação dos casos clínicos das criptosporidioses, bem como a ocorrências destes parasitos no meio ambiente, estabelecendo novos parâmetros qualitativos para a caracterização das águas pluviais e tratadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GARCIA-ZAPATA, Marco Túlio A; PASSO, Alverne; RUANO, Ana Lucia; SOUZA JÚNIOR, Edson Sidião; CECHETTO, Fátima Helena; MANZI, Ricardo S. ciclosporíase intestinal: relato dos primeiros casos humanos no estado de goiás, brasil. Revista de Patologia Tropical, GOIÂNIA, v. 32, p. 121-130, 2003.

Henriksen S A; Pohlenz, J F L. 1981. *Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique*. Acta vet. Scand. 22: 594-596

Hoffman, B.; Chauret, C.; Stanbridge, J. & Peterson, L. Evaluation of four commercial antibodies. AWWA, 91: 69-78, 1999.

Santana junior, C. A. S. Estudo molecular dos microrganismos emergentes *Helicobacter pilori*, *Campilobacter jejuni* e *Campilobacter coli*, nas águas fluviais do município de Goiânia. Goiás. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biológicas da UFG, 2005.

Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. Pub. by American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation, 1998.

FONTE DE FINANCIAMENTO – Os recursos até agora obtidos são remanescentes de projetos prévios do CNPq e Ex-CONCITEG/FUNAPE-UFG. Que não foram renovados. No momento, está sendo submetido a outras agências financeiras.

¹ Mestranda/Ciências da Saúde/ Núcleo de Pesquisas e Estudos de Agentes Emergentes e Reemergentes/IPTSP/UFG. soniaoliveira@yahoo.com.br

² Bolsista IC/PIBIC de Diagnóstico Genético e Molecular/ UFG. hugo_bioufg@yahoo.com.br.

³ Doutorando/ Núcleo de Pesquisas e Estudos de Agentes Emergentes e Reemergentes/UFG. sidiao@hotmail.com

⁴ Professor/Co-Orientador - Lab Diagnóstico Genético e Molecular/ UFG. carloze@icb.ufg.br.

⁵ Graduando/estagiário/Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular/ UFG. rodrigo_lourencosouto@hotmail.com.

⁶ Graduada/estagiária/ Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular/ UFG. elaineandrade82@yahoo.com.br.

⁷ IC/PIVIC - Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular/ UFG. ludicida@yahoo.com.br.

⁸ Orientador/pesquisador/Núcleo de Pesquisas e Estudos de Agentes Emergentes e Reemergentes/IPTSP/UFG. mctulian@yahoo.com.br.