



7^{mo}
Congreso de
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE HOMOGENEIZAÇÃO DE SOLO PARA DETECÇÃO DE CISTOS DE *GIARDIA DUODENALIS*

Evaluation of soil homogenization techniques for detection
of *Giardia duodenalis* cysts

Clarisse M Boni de Oliveira ^{a*}, Regina M Bueno Franco ^a

^a Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, SP, Brasil.

* clarisse.maria@gmail.com

Palavras chaves: Protozoário, recuperação, metodologia, separação imunomagnética

Keywords: Protozoan, recovery, methods, immunomagnetic separation

Título abreviado: Detecção de cistos em solo

ABSTRACT

The soil is an important vehicle for the transmission of the protozoan *Giardia duodenalis*, which causes the global disease giardiasis, gastroenteritis of changeable severity. The objective of this study was to evaluate different process of homogenization soil samples in order to know which of them is most effective for cysts detection and recovery. Four treatments of homogenization were performed with four replicates of each one. Each replicate contained 10g of soil contaminated with a 500 cysts, moistened with phosphate-buffered saline and shaken according to the following

treatments: vortex for 2 minutes; magnetic stirrer for 10 minutes, homogenization during 30 minutes in a rotary mixer; and manual homogenization for 5 minutes. After homogenization, the samples remained resting for 5 minutes on the bench in order to sediment and separate the coarser soil particles. Then the supernatant and the finer particles were centrifuged at $1050 \times g$ for 10 minutes and the immunomagnetic separation was performed in the resulting pellet. The cysts were labeled and enumerated by immunofluorescence assay. There was no significant difference found in the mean value of magnetic stirrer (81.07), rotary mixer (70.40) and manual homogenization (49.60). However, the replicates of rotary mixer showed themselves more homogeneous when separating the coarser particles from the finer ones that would be taken to centrifugation. Therefore, this treatment was chosen as the most effective and reproducible process. The mean from the vortex samples was the lowest (8.45) showing a significant difference from the others.

RESUMO

O solo é uma das vias de transmissão do protozoário *Giardia duodenalis*, que pode causar a doença global giardiose, gastroenterite de severidade variável. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes formas de homogeneização de amostras de solo visando saber qual delas é mais eficiente para detecção e recuperação de cistos. Foram realizados quatro tratamentos de homogeneização com quatro réplicas cada. Cada réplica continha 10 g de solo contaminado com uma concentração 500 cistos, umedecidas em PBS e agitadas conforme os tratamentos: vórtex por 2 minutos; agitador magnético por 10 minutos; homogeneização durante 30 minutos em mixer rotatório e homogeneização manual por 5 minutos. Após a homogeneização as amostras permaneceram em repouso na bancada durante 5 minutos para sedimentação e separação de partículas mais grossas do solo. Em seguida o sobrenadante líquido e as partículas mais finas foram centrifugadas a $1050 \times g$ por 10 minutos e ao pellet resultante foi realizada a separação imunomagnética. Os cistos foram marcados e enumerados mediante a reação de imunofluorescência direta. As médias entre agitador magnético (81.07), mixer rotatório (70.40) e homogeneização manual (49.60) não apresentaram diferenças significativas, porém as réplicas do tratamento mixer rotatório se mostraram mais homogêneas em relação à separação de partículas mais grossas

daquelas mais finas que seriam levadas à centrifugação. Dessa forma elegeu-se esse tratamento como o mais efetivo e reprodutível. A média das réplicas do tratamento vórtex foi a mais baixa (8.45) sendo significativamente diferente das outras.

INTRODUÇÃO

Giardia duodenalis é um protozoário não invasivo que se localiza na superfície luminal. É o agente causador mais comum de diarreias e, por ano, são infectadas 280 milhões de pessoas. A giardiose, gastroenterite de severidade variável, ocorre no mundo inteiro e é responsável por morbidade em humanos e perdas econômicas relacionadas à produção bovina (Ortega-Pierres *et al.*, 2009), sendo uma parasitose com grande potencial zoonótico por acometer diversos hospedeiros (Geurden *et al.*, 2011). Seus principais sintomas são: diarreia crônica ou aguda, desidratação, dor abdominal, perda de peso (Thompson *et al.*, 2000).

A transmissão desta parasitose ocorre pela rota fecal oral, devido à ingestão do cisto, de tamanho entre 8µm a 12µm, que é eliminado junto com as fezes dos indivíduos infectados. A parede externa do cisto é totalmente impermeável para soluções aquosas o que permite a sobrevivência deste em águas ou desinfetantes (Dumètre *et al.*, 2012), e impede o ressecamento em ambientes secos. A parede possui espessura entre 300 e 500 nm e é constituída principalmente por uma rede densa de fibrilas enroladas da proteína N-acetil galactosamina, que pode criar um potencial de atração ou repulsão de forças, favorecendo a adesão do protozoário em diferentes substratos como grãos de solos,

superfícies de alimentos, entre outros (Dumètre *et al.*, 2012). Dependendo do pH do meio, os cistos adquirem maior ou menor carácter hidrofóbico (Dai *et al.*, 2004).

A veiculação desse protozoário pode ser hídrica, alimentar ou através do solo contaminado, sendo esta última uma das hipóteses mais comuns de rotas para o carregamento de parasitos para as fontes de água (Madore *et al.*, 1987). Quando essas águas são utilizadas para abastecimento público ou irrigação de alimentos podem ocasionar surtos epidêmicos envolvendo grande diversidade de patógenos, com severas consequências para a saúde pública. Dentre esses surtos, apenas considerando os ocorridos devido à veiculação hídrica, já foram notificados mais de duzentos surtos de giardiose (Karaniš *et al.*, 2007; Baldursson & Karaniš, 2011). A quantidade de surtos ainda é subestimada, tendo-se em vista que em muitos países a notificação dos eventos não é obrigatória.

Com o aumento da preocupação com a transmissão de diversos patógenos pela água, surge a necessidade de controle das matrizes ambientais em que o homem esteja em contato. Uma metodologia simples e direta, com a menor quantidade de passos possíveis e que apresente uma recuperação efetiva pode ajudar na prevenção da contaminação e transmissão de doenças.

Visando a padronização de uma metodologia de detecção de protozoários patogênicos no solo, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes processos de homogeneização aplicáveis às amostras de solo de modo a promover maior desprendimento dos cistos de *Giardia duodenalis* presentes no solo, possibilitando sua recuperação na fase aquosa. Conseguir uma máxima dispersão dos agregados de solo é

um fator crucial nos procedimentos de recuperação de organismos pois as metodologias só serão eficientes após separação dos agregados de solo (Bakken & Lindahl, 1995).

METODOLOGIA

Coleta da Amostra de Solo

Amostras de solo superficial, livre de microorganismos, foram colhidas em ambiente com grande luminosidade e quantidade de matéria orgânica. As amostras foram secas ao ar e peneiradas em malha de orifícios de 4 mm² para posterior autoclavagem sob vapor fluente.

Obtenção e purificação das formas infectantes dos parasitos em estudo

A suspensão de cistos de *Giardia duodenalis* utilizada como inóculo foi purificada a partir de fezes humanas utilizando metodologia adaptada de Rocha *et al.*, 2003 e Roberts-Thomson *et al.*, 1976. As fezes humanas positivas foram diluídas (1:5) com água destilada, peneiradas em malha de orifício de 50 µm e lavadas com água destilada em diversas centrifugações. O sedimento da última lavagem foi ressuspensão em 7 mL de água e, em seguida, foi acrescentada cuidadosamente a solução de sacarose 1M. Os tubos foram centrifugados para a recuperação dos cistos da interface água-sacarose. Os cistos foram colocados em novo tubo, centrifugados e o sobrenadante foi ressuspensão

em 3 mL de água para a adição cuidadosa de 3mL de sacarose a 0.75M. Novamente os tubos foram centrifugados, os cistos foram recolhidos da interface água-sacarose e uma série de centrifugações foi realizada para a retirada da sacarose. Purificados, os cistos foram armazenados em água MiliQ juntamente com os antibióticos penicilina (110 U/mL), estreptomicina (0.1 mg/mL), gentamicina (0.1 mg/mL). Posteriormente, foi realizada a reação de imunofluorescência direta (RID), com anticorpos monoclonais marcados com isotiocianato de fluoresceína, de *kit* comercial, para a verificação da integridade dos cistos purificados (Figura 1).

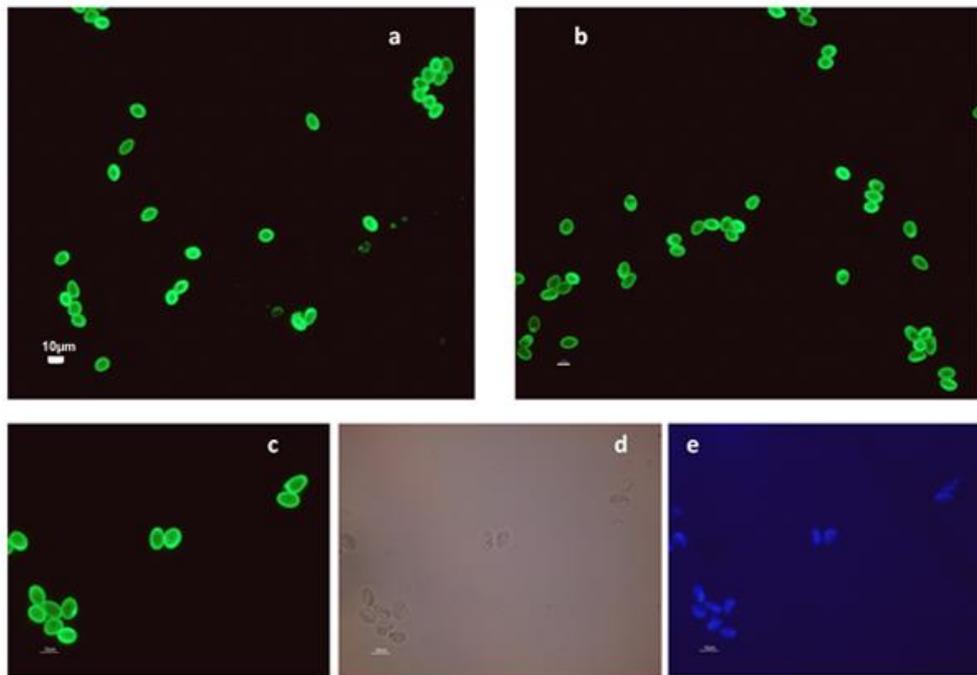


Figura 1. Cistos de *Giardia duodenalis* purificados de fezes humanas. Em *a*, *b*, e *c* cistos visualizados após RID. Em *d* cistos em campo claro. Em *e* cistos visualizados após coloração com DAPI.

Figure 1. *Giardia duodenalis* cysts purified from human feces. In *a*, *b* and *c*, cysts visualized after immunofluorescence assay. In *d* cysts in bright field. In *e* cysts visualized after stained with DAPI.

Comparação dos métodos de homogeneização

Para a definição do protocolo de detecção de cistos no solo foram analisados, em ensaios independentes, quatro tratamentos com quatro réplicas cada, relativos aos diferentes processos de homogeneização. As amostras de solo contaminadas foram umedecidas em PBS e agitadas conforme os tratamentos:

- vórtex por 2 minutos;
- agitador magnético por 10 minutos;
- Agitação durante 30 minutos em mixer rotatório;
- homogeneização manual por 5 minutos

Cada réplica foi composta de 10 g de solo e de uma concentração determinada de cistos (5×10^2), sendo o esperado encontrar 50 cistos/ g de solo para as amostras contaminadas com 5×10^2 parasitos.

Após a homogeneização as amostras permaneceram em repouso na bancada durante 5 minutos para sedimentação e separação de partículas mais grossas do solo. O sobrenadante líquido e as partículas mais finas foram centrifugadas a $1050 \times g$ por 10 minutos e os pellets resultantes foram purificados pela separação imunomagnética (IMS). A marcação para visualização e enumeração dos cistos em microscópio de fluorescência foi realizada pela reação de imunofluorescência direta (RID). Os critérios de positividade utilizados foram o tamanho dos organismos, a cor e intensidade de fluorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos de homogeneização mediante agitador magnético, agitação manual e mixer rotatório apresentaram maiores médias de recuperação em relação à homogeneização realizada no vórtex (Tabelas 1-5). Segundo o teste estatístico de Duncan, não houve diferenças significativas entre as três maiores médias de recuperação. Assim é importante ressaltar que essas três formas de homogeneizar o solo são capazes de detectar cistos com o limite de detecção de 50 formas infectantes/g de solo.

Tabela 1. Porcentagem de recuperação de cistos empregando o tratamento vórtex.

Table 1. Percentage of recovery of cysts using vortex treatment.

Concentração de cistos	Réplicas	ER (%)
500	1	15.60
	2	10.40
	3	1.20
	4	6.60
Média e Desvio Padrão		8.45 ± 6.08

Tabela 2. Porcentagem de recuperação de cistos empregando o tratamento Agitador Magnético.

Table 2. Percentage of recovery of cysts using magnetic stirrer treatment.

Concentração de cistos	Réplicas	ER (%)
500	1	70.40
	2	83.20
	3	89.60
	4	*
Média e Desvio Padrão		81.07 ± 9.78

* Valor excluído devido à perda de amostra.

* Value excluded due to sample loss.

Tabela 3. Porcentagem de recuperação de cistos empregando o tratamento Agitação Manual.

Table 3. Percentage of recovery of cysts using manual homogenization treatment.

Concentração de cistos	Réplicas	ER (%)
500	1	59.20
	2	54.40
	3	35.20
	4	49.60
Média e Desvio Padrão		49.6 ± 10.37

Tabela 4. Porcentagem de recuperação de cistos empregando o tratamento Mixer Rotatório.

Table 4. Percentage of recovery of cysts using rotary mixer treatment.

Concentração de cistos	Réplicas	ER (%)
500	1	44.80
	2	60.80
	3	57.60
	4	118.40
Média e Desvio Padrão		70.40 ± 32.74

Tabela 5. Comparação entre média e desvio padrão de todos os tratamentos relativos à homogeneização.

Table 5. Comparison of mean and standard errors of all treatments related to homogenization.

Tratamento	Recuperação de cistos (%)	
	Média	± Desvio Padrão
Vórtex	8.4	± 6.08 B
Agitador Magnético	81.07	± 9.78 A
Agitação Manual	49.6	± 10.37 A
Mixer Rotatório	70.40	± 32.74 A

Médias com as mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Duncan.

Means with the same letters are not statistically different, according to Duncan test.

A interação dos cistos com partículas coloidais pode estar associada ao tamanho, formato e cargas elétricas superficiais do parasito, ainda que estudos confirmem uma forte hidrofobicidade em cistos de *Giardia* capaz de anular os efeitos de forças eletrostáticas em relação à capacidade de adesão em sólidos (Hsu & Huang, 2001; Dai & Boll, 2003; Dai *et al.*, 2004; Dumètre *et al.*, 2012). Segundo Bakken & Lindahl (1995) este tipo de ligação microorganismos-partículas é reversível e pode ser quebrada pela dispersão física.

É possível que a baixa recuperação encontrada após agitação em vórtex tenha ocorrido em função da continua interação dos cistos com as partículas de solo. O tempo utilizado nos outros processos de homogeneização, todos mais extensos que o período destinado para a agitação em vórtex, pode ter sido um fator crucial para o rompimento dessa ligação cistos-solo, e conseqüente liberação dos protozoários para a fase aquosa.

Embora a maior média encontrada tenha sido a do tratamento agitador magnético (Figura 2), devido às características qualitativas observadas, optou-se em escolher o mixer rotatório (Figura 3) como melhor tratamento de Homogeneização. Essa escolha ocorreu porque após o tempo de homogeneização em mixer rotatório, as amostras se apresentaram mais homogêneas que as dos outros tratamentos, sendo de fácil distinção o sobrenadante e as partículas finas, das partículas mais grossas do solo (Figura 4). Posteriormente a esta etapa, os cistos são liberados do solo, de forma que, como são leves, permanecem no sobrenadante ou entre as partículas mais finas do solo, que demoram mais tempo para sedimentar. Deste modo, após um intervalo de cinco minutos, o sobrenadante e as camadas mais finas devem ser recolhidos, para continuarem no processamento da metodologia, enquanto as partículas mais grossas devem ser descartadas. A homogeneização em mixer rotatório foi o tratamento que melhor permitiu essa diferenciação.



Figura 2. Amostras de solo sendo homogeneizadas no agitador magnético

Figure 2. Soil samples being homogenized with magnetic stirrer



Figura 3. Amostras de solo sendo homogeneizadas no mixer rotatório. Este foi o tratamento escolhido.

Figure 3. Soil samples being homogenized with rotary mixer. This treatment was the chosen one.

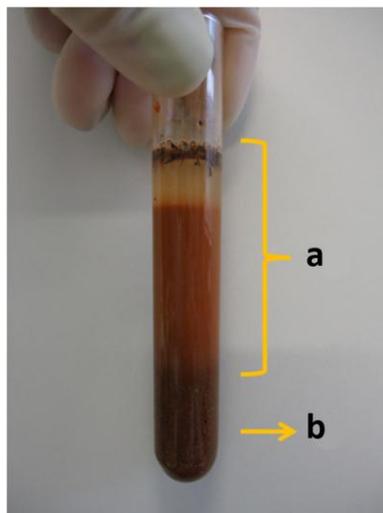


Figura 4. Resultado de homogeneização em mixer rotatório. Em *a* sobrenadante e partículas mais finas do solo. Em *b* partículas mais grossas que são desprezadas conforme descrito.

Figure 4. Resulting of homogenization in rotary mixer. In *a* supernatant and finer particles of the soil. In *b* coarser particles that are discarded as described.

CONCLUSÕES

Os métodos de homogeneização em avaliação são capazes de romper a ligação existente entre os cistos e as partículas de solo, permitindo que os organismos fiquem livres na fase aquosa e sejam detectados. Dessa forma, embora a agitação em mixer rotatório tenha sido escolhida como processo mais sensível, eficiente e reprodutível, é perfeitamente possível substituí-la por uma homogeneização manual, que pode ser realizada em qualquer laboratório. Uma segunda alternativa com boa eficiência de recuperação é a agitação magnética, que diferentemente da agitação manual permite que o laboratorista realize outras atividades em concomitância com a homogeneização do solo.

Mesmo homogeneizando o solo com vórtex, processo que resultou em baixa eficiência de recuperação dos cistos, ainda é possível detectar o protozoário na fase aquosa, sendo este modo de agitação uma outra possibilidade, embora não recomendada, para a liberação dos cistos do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bakken LR & Lindahl V. 1995. Recovery of bacteria cells from soil. P 11-27 Em: Trevors JT & van Elsas JD, *Nucleic acids in the environment. Methods and applications*. Springer-Verlag, 1a. Edição, Berlim, Heidelberg
- Baldursson S & Karanis P. 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004 – 2010. *Water Research*, 45: 6603-6614

- Dai X & Boll J. 2003. Evaluation of attachment of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to soil particles. *Journal of Environmental Quality*, 32(1): 296-304

- Dai X, Boll J, Hayes ME & Aston DE. 2004. Adhesion of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to solid surfaces: the role of surface charge and hydrophobicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34: 259-263

- Dumètre A, Aubert D, Puech PH, Hohweyer J, Azas N & Villen J. 2002. Interaction forces drive the environmental transmission of pathogenic protozoa. *Applied and Environment Microbiology*, 78 (4): 905-912

- Geurden T, Pohle H, Sarre C, Dreesen L, Vercruyse J & Claerebout E. 2011. The efficacy of a treatment with fenbendazole against an experimental *Giardia duodenalis* infection in lambs. *Small Ruminant Research*, 96: 211–215

- Hsu BM & Huang C. 2001. Influence of ionic strength and pH on hydrophobicity and zeta potential of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Colloids and Surfaces – A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 201: 201-206

- Karanis P, Kourenti C & Smith H. 2007. Water-borne transmission of protozoan parasites: a review of world-wide outbreaks and lessons learned. *Journal of Water and Health*, 5 (1): 1-38

- Madore MS, Rose JB, Gerba C.P, Arrowood MJ & Sterling CR .1987. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. *The Journal of Parasitology*, 73: 702-705

- Ortega-Pierres G, Smith HV, Cacciò SM & Thompson RCA. 2009. New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. *Trends in Parasitology*, 25 (9): 410-416

- Rocha MO, Gomes MA, Costa AO, Furst C & Silva E F. 2003. Molecular characterization of Brazilian human *Giardia duodenalis* isolates using isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46: 273-278

- Roberts-Thomson IC, Stevens DP, Mahmoud AA & Warren KS. 1976. Giardiasis in the mouse: an animal model. *Gastroenterology*, 71: 57–61

- Thompson RCA, Hopkins RM & Homan WL. 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*, 16: 210–213