



SAMUEL RICARDO DOS SANTOS

FLUORESCÊNCIA RETARDADA EM PROTOZOÁRIOS:
Giardia intestinalis e *Cryptosporidium parvum*

CAMPINAS, 2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA**

SAMUEL RICARDO DOS SANTOS

**FLUORESCÊNCIA RETARDADA EM PROTOZOÁRIOS:
Giardia intestinalis e *Cryptosporidium parvum***

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola, na área de concentração de Água e Solo.

**ORIENTADOR: José Euclides Stipp Paterniani
CO-ORIENTADOR: Cristiano de Mello Gallep**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO SAMUEL
RICARDO DOS SANTOS E ORIENTADA PELO PROF.
DR. JOSÉ EUCLIDES STIPP PATERNIANI**



Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Santos, Samuel Ricardo dos, 1980-
Sa59f Fluorescência retardada em protozoários : *Giardia intestinalis* e
Cryptosporidium parvum / Samuel Ricardo dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.],
2014.

Orientador: José Euclides Stipp Paterniani.
Coorientador: Cristiano de Mello Gallep.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Agrícola.

1. Giardia. 2. Cryptosporidium parvum. 3. Marcadores fluorescentes. I.
Paterniani, José Euclides Stipp, 1957-. II. Gallep, Cristiano de Mello, 1974-. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Delayed fluorescence in protozoa : *Giardia intestinalis* and
Cryptosporidium parvum

Palavras-chave em inglês:

Giardia

Cryptosporidium parvum

Delayed fluorescence

Área de concentração: Água e Solo

Titulação: Doutor em Engenharia Agrícola

Banca examinadora:

José Euclides Stipp Paterniani [Orientador]

Marlene Benchimol

Cassiana Maria Reganhan Coneglian

Luiz Antonio Daniel

Denis Miguel Roston

Data de defesa: 16-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Agrícola

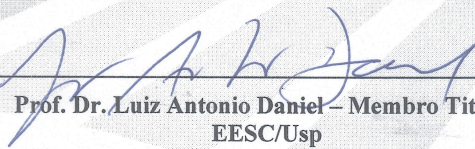
Este exemplar corresponde à redação final da **Tese de Doutorado** defendida por **Samuel Ricardo dos Santos**, aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de junho de 2014, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.



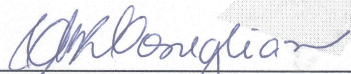
José Euclides Stipp Paterniani – Presidente e Orientador
Feagri/Unicamp



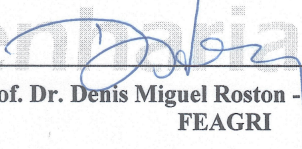
Profa. Dra. Marlene Benchimol - Membro Titular
USU/Rio de Janeiro



Prof. Dr. Luiz Antonio Daniel – Membro Titular
EESC/Usp



Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian - Membro Titular
FT/Unicamp



Prof. Dr. Denis Miguel Roston - Membro Titular
FEAGRI

Resumo

Giardia spp. e *Cryptosporidium* spp. são organismos desafiadores em monitoramento ambiental, podendo afetar os seres humanos e os animais com grandes impactos na saúde pública. Métodos para detectar esses organismos são descritos na literatura – p.ex.: o método EPA 1623.1. No entanto, muitos não são capazes de detectar a viabilidade destes parasitos. Este trabalho avaliou o uso de marcadores fluorescentes combinados com a técnica de detecção de fluorescência retardada na detecção de viabilidade de *Giardia intestinalis* e *Cryptosporidium parvum*. Testes de incubação com carboxifluoresceína-succinimidil-diacetato-éster (CFDA-SE), C12-resazurina e SYTOX Green foram desenvolvidos com cistos de *G. intestinalis* e oocistos de *C. parvum*. Medidas de fluorescência retardada em câmara escura projetada e em dispositivo comercial foram efetuadas em amostras purificadas e concentradas de *G. intestinalis* após incubação com CFDA-SE. Grupos contendo cistos vivos e infecciosos, mortos a 100° C, estressados com luz UV-C e envelhecidos foram analisados via fluorescência retardada e microscopia de epifluorescência em oito séries experimentais. Os resultados demonstram que (oo)cistos vivos e infecciosos não são marcados com esses marcadores fluorescentes. Dupla marcação em (oo)cistos mortos é observada após 30 minutos de incubação com C12-resazurina 5,0 µM e SYTOX Green 100 nM. (Oo)cistos mortos apresentam marcação verde após incubação de CFDA-SE 5,0 µM. O envelhecimento da amostra foi acompanhado pelo aumento da taxa de marcação celular com cistos apresentando ~50% de marcação aos 30 dias de idade e ~100% aos 50 dias de idade. Testes com fluorescência retardada demonstram que cistos vivos e com idade inferior a 20 dias apresentam intensidades superiores aos cistos mortos e estressados após excitação com 365 nm. A excitação com 365 nm apresentou correlação $R^2 > 95\%$ após análise de cinética de decaimento com modelo exponencial de segunda ordem. Os dados indicam que o decaimento da fluorescência retardada é acompanhado por duas componentes k_1 e k_2 onde $k_2 = 5 \cdot k_1$, estando estas conectadas com as condições fisiológicas da *Giardia*. O procedimento pode ser efetuado em 10 passos laboratoriais em aproximadamente 60 minutos de análise. A fluorescência retardada apresenta futuro promissor na análise de viabilidade de parasitos em amostras purificadas.

Palavras-chave: Fluorescência Retardada, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, marcadores fluorescentes

Abstract

Giardia spp. and *Cryptosporidium* spp. are challenging and important organisms in modern environmental monitoring. These protozoa can affect humans and animals seriously, as reflection of sanitation problems in water quality control, with huge impact over economics and public health. Methods to detect such organisms are well described in literature - i.e. the EPA Method 1623.1 and AWWA 2012. But those ones are not able to detect infectivity. For that, the usual procedures include infection of animal model leading to at least one week for confirming infectivity. Some research with dye probes are being developed in order to provide useful, reliable and low cost procedures for detection of protozoa viability, i.e. enabling to distinguish dead samples cells from living ones. This work describes the screening tests for viability detection of protozoa samples - *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* - using carboxyfluorescein-succinimidyl-diacetate-ester (CFDA-SE), C12-resazurin and SYTOX Green. Living, heat-killed and UV-C stressed (oo)cysts were analyzed using these chemical probes. *G. intestinalis* in concentrated samples and stained with CFDA-SE were analyzed by fluorescence imaging as well as by delayed fluorescence (DF) after UV-A and white-light excitation. The weak DF profiles were detected in photon-counting setups, in 8 series of tests for intact, for heat-killed and for UV-C-stressed samples are shown. Results show that fresh, i.e. living and viable (oo)cysts cannot be stained by the mentioned neither with CFDA-SE nor C12-resazurin and SYTOX Green dyes. Double-marked (oo)cysts are observed when C12-resazurin and SYTOX Green are applied to old cysts as well to dead ones. Aged samples show increasing number of stained organisms: 30-day-old with ~50% while samples older than 50 days with almost 100% marked. Intact samples present stronger fluorescence and DF than the stressed ones, with good replication after UV-A excitation. After excitation @365nm samples present DF better fitted by double exponential decay kinetics, with the decay constant k_2 five times higher than the k_1 constant. The procedure can be easily reproduced in 10 steps, taking around 1h of laboratorial work with purified samples.

Keywords: Delayed Fluorescence, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, CFDA-SE, probes dyes

Sumário

	Página
Lista de abreviaturas.....	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	3
1.2 Objetivos gerais.....	5
1.3 Objetivos específicos	5
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 <i>Cryptosporidium</i> spp.: principais características.....	7
2.2 <i>Giardia intestinalis</i> .: principais características.....	8
2.3 Principais formas de detecção.....	11
2.4 Testes de infecciosidade e aplicações	13
2.5 Fluorescência e Fluoróforos.....	15
2.5.1 Detecção da fluorescência	17
2.5.2 Dispositivos compactos para medidas de luminescência.....	18
2.6 Usos diversos de marcadores celulares em protozoários.....	20
3 Material e Métodos.....	27
3.1 Procedimento experimental	27
3.2 Grupos de (oo)cistos.....	28
3.3 Ensaios de Fluorescência Retardada – séries Brasil.....	29
3.3.1 Suspensões purificadas de <i>G. intestinalis</i>	29
3.3.2 Preparo das alíquotas.....	29
3.3.3 Grupos de cistos de <i>G. intestinalis</i>	29
3.3.4 Estresse dos organismos	30
3.4 Reagentes.....	30
3.4.1 Anticorpos monoclonais	30
3.4.2 CFDA-SE Vybrant® Invitrogen.....	30
3.4.3 Preparo do reagente CFDA-SE e ensaios de diluição	30
3.4.4 Incubação dos cistos em CFDA-SE	31
3.5 Equipamentos.....	31
3.5.1 Sistema de fóton-contagem.....	31
3.5.2 Válvula fotomultiplicadora	31
3.5.3 Placa de contagem.....	31
3.5.4 Sistema iluminador para medidas de DL	32
3.5.5 Instrumento virtual e controle computacional.....	32
3.5.6 Sistema de controle de temperatura.....	32
3.5.7 Sistema de fóton-contagem comercial.....	32
3.5.8 Microscópio de epifluorescência.....	33
3.6 Medida da Fluorescência Retardada	33
3.7 Leitura da fluorescência e capturas de imagens em microscópio	34
3.8 Ensaios de viabilidade, infecciosidade e fluorescência retardada – séries Japão	34
3.8.1 Amostras de <i>C. parvum</i> , <i>G. intestinalis</i> e <i>Giardia</i> ssp.....	34
3.8.2 Ensaios de infecciosidade em modelo animal.....	35

3.8.3 Grupos de organismos.....	35
3.8.4 Preparo dos reagentes C12-resazurina e SYTOX Green.....	35
3.8.5 Incubação dos (oo)cistos em C12-resazurina e SYTOX Green	36
3.8.6 Fluorescência Retardada em dispositivo de fóton-contagem - DF.....	36
3.8.7 Leitura da fluorescência em microscópio	37
3.9 Análise dos dados.....	37
3.10 Cinética de decaimento luminescente.....	37
3.11 Análise dos dados de Fóton-contagem	38
4 Resultados.....	39
4.1 Construção de câmara de fóton-contagem	39
4.2 Ensaios com ruído de escuro	41
4.3 Experimentos <i>G. intestinalis</i> , <i>Giardia</i> sp. e <i>C. parvum</i> série NIID Japão	42
4.3.1 Idade dos organismos	42
4.3.2 Ensaios de viabilidade C12-resazurina e SYTOX Green.....	42
4.3.3 Ensaios de viabilidade CFDA-SE	44
4.3.4 Ensaios de Fluorescência Retardada	46
4.4 Experimentos <i>G. intestinalis</i> – séries Brasil	47
<i>Scientific Papers</i>	55
Evaluation of CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX Green as staining probes for viability detection of <i>Giardia lamblia</i> and <i>Cryptosporidium parvum</i>	57
<i>Abstract</i>	57
<i>Introduction</i>	57
<i>Material and Methods</i>	59
(Oo)cysts strains.....	59
Infectivity of WaterBorne samples	59
Chemicals	59
Test groups	60
(Oo)cysts chemical incubation	61
Confirmation of Fluorescence	61
Evaluation of results.....	61
Results.....	62
Infectivity tests	62
Staining performance on <i>Giardia lamblia</i> and <i>Cryptosporidium parvum</i>	62
Conclusion	67
Acknowledgements	67
Delayed fluorescence of CFDA-SE dyed <i>Giardia intestinalis</i> –	71
differences between stressed and non-stressed cysts	71
Material and Methods.....	72
<i>Giardia lamblia</i> cysts	72
Chemical probe	73
Experimental groups	73
Delayed Fluorescence and microscopic observation tests	73
Photon-counts analysis.....	74

Results.....	74
Conclusion	80
Acknowledgements	80
References.....	80
5 Considerações finais	83
6 Recomendações	85
7 Conclusões	87
8 Referências Bibliográficas	89
Apêndice (1).....	97
Construção da Câmara de fóton-contagem.....	97
Projeto da Parte Eletrônica da Câmara Escura	101
Módulo PMT	101
Placa de Contagem USB.....	102
Iluminador Anelar	103
Controlador de Temperatura	105
Apêndice (2).....	107
Ensaio de Fluorescência Retardada em cistos de <i>G. intestinalis</i>	107
Apêndice (3).....	121
Ensaio de Fluorescência Retardada em cistos de <i>G. intestinalis</i>	121
Anexo (1).....	129
Exemplo de Laudo Técnico Cepas de <i>Cryptosporidium parvum</i> e <i>Giardia lamblia</i>	129

Lista de abreviaturas

c1: Grupos de *Cryptosporidium parvum* mortos

CCD: Charge Couple Device

CFDA-SE: carboxifluoresceína-diacetato-succinimidil-éster

cL: Grupos de *Cryptosporidium parvum* vivos

cp100µs: contagem por cem microssegundos

cp10ms: contagem por dez milissegundos

cpms: contagem por milissegundos

CTC: cloreto de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazólio

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DF: Delayed Fluorescence (Fluorescência Retardada)

DIC: Microscopia de Contraste Diferencial Interferencial

DL: Delayed Luminescence (Luminescência Retardada)

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EMA: Etídio Monoazida

EPA: Agência de Proteção Ambiental - USA

ETA: Estação de Tratamento de Água

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

g0: Grupo de *Giardia intestinalis* com idade superior a 30 dias

g1: Cistos de *Giardia intestinalis* mortos

g2: Cistos de *Giardia intestinalis* estressados com luz UV 254 nm

gf: Cistos de *Giardia intestinalis* mortos -20°C

gL: Grupos de *Giardia intestinalis* vivos com idade inferior a 20 dias

GPIB: General-Purpose Instrumentation Bus

IMS: Imunomagnetic Separation (Separação Imunomagnética)

INT: p-iodonitrotetrazólio violeta

KCN: Cianeto de Potássio

LED: Diodos Emissores de Luz

mA: miliampere

mL: mililitros

mm: milímetros

mM: milimolar

NaN₃: Azida de Sódio

NIID: Instituto Nacional de Doenças Infecciosas - Tóquio

nm: nanômetros

nM: nanomolar

NTU: Unidades Nefelométricas de Turbidez

PBS: Tampão Fosfato Salino

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PI: Iodeto de Propídio

PID: Proporcional Integral Derivativo

PMA: Propídio Monoazida

PMT: Photomultiplier Tube (Válvula Fotomultiplicadora)

PMT-LaFA: Câmara de fóton-contagem projetada para medidas de luminescência

RID: Reação de Imunofluorescência Direta

RS-232: cabo padrão de trocas de dados binários

Type6100-IR: Dispositivo comercial de fóton-contagem sensível no infravermelho

Type6100-VIS: Dispositivo de fóton-contagem comercial sensível no espectro visível

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

USA: Estados Unidos da América

USB: Universal Serial Bus

UV-C: Radiação Ultravioleta com 254 nm

µL: microlitros

µm: micrometros

µM: micromolar

Dedicatória

Dedicado à minha Mãe Digníssima Sra. Maria Aparecida dos Santos. Pelo eterno carinho, pela paz que transmite e pelo amparo incondicional em toda minha vida!

À Vanessa Berbert, minha companheira, meu grande amor, e minha fortaleza, cujo sorriso é a luz que me guia todos os dias!

À minha irmã Lídia, minha sobrinha Maria Rosa e ao Augusto Bassora, minha família que tanto amo.

Agradecimentos

Este trabalho é fruto do apoio recebido da Faculdade de Engenharia Agrícola, da Faculdade de Tecnologia e do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Do Instituto Nacional de Doenças Infecciosas em Tóquio e da Hamamatsu Photonics K. K. no Japão. Da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processos 2010/07792-1, 2011/10763-6 e 2013/01501-3) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Do Laboratório de Fotônica Aplicada, do Laboratório de Protozoologia, da Central Labs Research e de pessoas que em diferentes momentos deram a sua contribuição para a realização deste trabalho;

Aos Professores José Euclides Stipp Paterniani, Regina Maura Bueno Franco e Cristiano de Mello Gallep manifesto meus agradecimentos pela forma como me ampararam neste trabalho e os ensinamentos prestados ao longo de sua realização. Pela confiança que em mim depositaram bem como por terem me acolhido em vossos grupos de pesquisa. Pela disponibilidade em me orientar e pela amizade. Agradecimentos especiais são dados à Professora Dra. Regina M. B. Franco, ao MSc Nilson Branco do IB-UNICAMP e ao Dr. Shinji Izumiayama do NIID - Tóquio pelas valiosas dicas e informações em parasitologia ambiental. Pela generosidade e disponibilidade em nos amparar nos momentos de dúvidas que sempre surgiram ao longo deste trabalho;

Ao trabalho paciente das bolsistas: Geyna Souza, Jéssica Bezerra e Jéssica Maise no apoio experimental. Aos meus amigos e técnicos dos Laboratórios de Telecomunicações, Físico-química, Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental da Faculdade de Tecnologia - FT e do Laboratório de Saneamento da Faculdade de Engenharia Agrícola - FEAGRI. Aos alunos das disciplinas FA376, FA570, ST088 e ST615 pela paciência que tiveram durante o meu estágio.

A todos os meus amigos e às famílias Berbert e Macedo Gentil pelo incondicional apoio na minha formação acadêmica.

Que a paz esteja com todos trilhando sempre o caminho da luz!

1 INTRODUÇÃO

Problemas de qualidade de água configuram-se como grande desafio que a humanidade enfrenta no século XXI. As doenças de veiculação hídrica, a urgente necessidade de saneamento básico e a falta de água potável afetam atualmente mais de um terço da população mundial (SCHWARZENBACH et al., 2010).

O uso da água para diversas finalidades requer o atendimento de parâmetros microbiológicos visando a segurança dos seres vivos, que podem ser infectados por organismos patogênicos presentes nela (BATTERMAN et al., 2009; STOREY; VAN DER GAAG; BURNS, 2011). Destaca-se seu uso para: abastecimento público (WHO, 2011), agricultura (MOLDEN; VITHANAGE; FRAITURE, 2011), pecuária (MOLDEN et al., 2010), além de ser matéria prima em diferentes processos industriais (HESPANHOL; MIERZWA, 2005).

Dentre os diferentes gêneros de organismos patogênicos que podem ser encontrados na água, *Cryptosporidium* e *Giardia* têm ganhado atenção especial de pesquisadores e autoridades, por serem capazes de propagarem enfermidades podendo em alguns casos, ocasionarem severa morbidade (COTTON; BEATTY; BURET, 2011; LEE et al., 2010; MAC KENZIE et al., 1994).

No Brasil, o Ministério da Saúde em sua Portaria n. 2.914, apresenta a obrigatoriedade do monitoramento quanto à presença desses organismos no ponto de captação em função da média anual de *Escherichia coli*, com o objetivo de atingir padrões de ausência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água potável (BRASIL, 2011).

Surtos epidêmicos causados por protozoários patogênicos podem ocorrer após a ingestão de água contaminada. Os (oo)cistos são resistentes aos vários desinfetantes, tais como cloro e dióxido de cloro e comportam-se como uma partícula de 2 a 4 µm durante a filtração em uma Estação de Tratamento de Água (ETA). Devido à compressibilidade conferida pela parede dos (oo)cistos, pequenas parcelas desses organismos podem chegar à água final distribuída à população (URBANO; FRANCO, 2008). Foi o que ocorreu no grande surto de Milwaukee, onde 0,13 oocistos·L⁻¹ causaram aproximadamente 403 mil casos de criptosporidiose (CORSO et al., 2003; MAC KENZIE et al., 1994).

A partir deste e de outros episódios, a ocorrência desses organismos é uma preocupação constante para os sistemas produtores de água e métodos de monitoramento, rápidos e efetivos são ainda necessários para determinar a ocorrência e infecciosidade tanto na água bruta captada para consumo humano como na água tratada.

Testes de infecciosidade permitem avaliar a capacidade de infecção, e são de grande utilidade principalmente na análise da eficiência dos tratamentos para inativação/desinfecção nas mais diversas metodologias empregadas (CRAIK et al., 2001; GARCIA et al., 2002; KEEGAN et al., 2008; LI et al., 2009). Porém, o tempo para obtenção de resultados, a dificuldade laboratorial e os custos envolvidos, dificultam o emprego desses ensaios no cotidiano das ETA.

O uso de marcadores fluorescentes tem sido objeto de estudo por vários pesquisadores com intuito de inferir viabilidade destes parasitos e assim, estimar a infecciosidade destes em amostras ambientais. Métodos com uso de marcadores tais como Iodeto de Propídio (PI) (SMITH; NICHOLS, 2010) e 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) são empregados. Porém esses marcadores apresentam resultados discrepantes e não têm sido amplamente aceitos pela comunidade científica por superestimarem a infectividade de parasitos (GRIT et al., 2012; ROCHELLE et al., 2004). Quanto ao uso do DAPI, este é utilizado apenas como método confirmatório de morfologia (AWWA, 2012; GRIMASON et al., 1994; SMITH et al., 2002).

Recentemente, carboxifluoresceína-succinimidil-diacetato-éster (CFDA-SE) foi utilizado como indicador de viabilidade em oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Tal marcador foi utilizado para avaliar se amebas de vida livre são vetores de *C. parvum*. A viabilidade do *C. parvum* foi assumida após a observação da fluorescência, tendo sido afirmado que o marcador provê evidências de viabilidade após reações de esterases (SCHEID; SCHWARZENBERGER, 2011).

A detecção e leitura de marcadores fluorescentes requer o uso de equipamentos tais como: microscópio de fluorescência, citômetro de fluxo e fotodocumentadores de PCR. Porém, citometria de fluxo e o custo inicial para implementação de um laboratório de análises moleculares é alto e inadequado para a atual realidade das ETA. O uso do microscópio nos métodos de detecção desses organismos vem recebendo críticas de diversos pesquisadores por ser uma tarefa laboriosa e demorada, requerendo horas de prática laboratorial (KARANIS, 2011; KESERUE et al., 2012).

1.1 JUSTIFICATIVA

Face a necessidade de novos métodos para avaliação da viabilidade, o uso de dispositivos de fóton-contagem compactos surge como metodologia promissora podendo gerar resultados em tempo reduzido de análise, além de diminuir os custos envolvidos no processo. Câmaras de fóton-contagem têm sido aplicadas na detecção de luminescência em oncologia (KIM et al., 2005), ensaios de germinação (GALLEP, 2014; GALLEP; SANTOS, 2007), ecotoxicologia (KATSUMATA et al., 2006) e colimetria (SANTOS; PATERNIANI; GALLEP, 2011). Desta forma, o desenvolvimento de métodos que avaliem a viabilidade de parasitos em tempo hábil, fornecerá subsídios importantes para a tomada de decisões.

Este trabalho descreve o uso da fluorescência retardada combinada com marcador fluorescente CFDA-SE na análise de viabilidade de *Giardia intestinalis* e *Cryptosporidium parvum* em suspensões purificadas, como método complementar aos testes de detecção e quantificação tradicionalmente empregados.

1.2 Objetivos gerais

Avaliar o uso dos marcadores celulares carboxifluoresceína-succinimidil-diacetato-éster (CFDA-SE), C12-resazurina e SYTOX Green como indicadores de viabilidade celular de cistos de *G. intestinalis* e oocistos de *C. parvum*. Analisar se dispositivos de fóton-contagem compactos são capazes de detectar fluorescência retardada em cistos de *G. intestinalis* e oocistos de *C. parvum*.

1.3 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de CFDA-SE, C12-resazurina e SYTOX Green em amostras de *C. parvum* e *G. intestinalis* submetidas ao estresse físico, a saber: (oo)cistos mortos a 100° C e cistos estressados com luz UV 254 nm;
- Avaliar se existe interatividade em (oo)cistos vivos com CFDA-SE, C12-resazurina e SYTOX Green;
- Projetar, construir, calibrar e validar um dispositivo de fóton-contagem compacto aplicado à detecção de fluorescência retardada com cistos de *G. intestinalis*;
- Comparar o dispositivo projetado com dispositivos de fóton-contagem comerciais na detecção de fluorescência retardada em cistos de *G. intestinalis* após incubação em CFDA-SE;
- Analisar se tais dispositivos de fóton-contagem são capazes de distinguir cistos vivos e sem estresse daqueles mortos e/ou estressados;
- Analisar a influência de diferentes comprimentos de onda na excitação de cistos de *G. intestinalis* em ensaios de fluorescência retardada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Cryptosporidium* spp.: principais características

Cryptosporidium é protozoário de distribuição cosmopolita capaz de infectar peixes, anfíbios, aves, répteis e mamíferos (FAYER, 2004). Este organismo é atualmente classificado como eucarionte do filo Apicomplexa, seus oocistos medem de 2,5 a 8,0 μm , sendo todas as espécies parasitos obrigatórios, intracelular, apresentando desenvolvimento endógeno seguido de uma fase encistada que posteriormente são eliminados nas fezes do hospedeiro em quantidades da ordem de 10^{10} oocistos (FAYER; DUBEY; LINDSAY, 2004; GOMEZ-BAUTISTA et al., 2000). Este organismo é capaz de infectar as microvilosidades das células do epitélio intestinal e/ou a árvore brônquica de mais de 150 espécies de vertebrados (DIAS et al., 2008).

Uma característica única dos oocistos de *Cryptosporidium* é a presença de sutura que durante a excitação é dissolvida, permitindo a saída dos esporozoítos (URBANO; FRANCO, 2008). *Cryptosporidium* possui capacidade de veiculação hídrica com potencial de infectar hospedeiros humanos e não humanos (NICHOLS; CAMPBELL; SMITH, 2003), com impactos na agricultura e pecuária (CHAIDEZ et al., 2005; DE GRAAF et al., 1999). Por conta de suas características, os oocistos são capazes de resistirem às condições adversas do ambiente, podendo permanecer infecciosos por até seis meses em águas superficiais de rios (FRANCO, 2007; KEEGAN et al., 2008). Além disso, a contaminação ambiental a partir de amostras de água contendo espécies de *Cryptosporidium* que não são suscetíveis a infecção em hospedeiros humanos contribui para dificultar a avaliação de risco para a saúde pública (NICHOLS; CAMPBELL; SMITH, 2003).

O ciclo de vida é monoxênico, apresentando além da fase endógena, a fase exógena na forma de oocistos. Dependendo da espécie, o formato dos oocistos pode ser esférico ou ovalado. No interior dos oocistos, circundados por uma parede de dupla camada, são encontrados quatro esporozoítos.

A fase endógena ocorre no hospedeiro, onde são formados dois tipos de oocistos: os de parede espessa, eliminados infectantes nas fezes (esporulados), e os de parede fina, que iniciam um ciclo de autoinfecção interna do hospedeiro e não alcançam as fezes.

A transmissão de oocistos de *Cryptosporidium* spp. ocorre por via fecal-oral, sendo causada pelo contato direto com pessoas ou animais infectados, ou indiretamente pela ingestão de

água contaminada, água de recreação, ou por alimentos contaminados (ETHELBERG et al., 2009; SMITH; NICHOLS, 2010; VERONESI et al., 2010).

Relatos de surtos de criptosporidiose relacionados à água potável na América do Norte, Reino Unido e Japão, indicaram que esta é um importante veículo de transmissão da criptosporidiose. Vários trabalhos descrevem a detecção deste protozoário em diversas ocasiões tais como: águas e alimentos (SMITH; NICHOLS, 2010), ostras comercializadas (GRACZYK et al., 2007), mexilhões (GOMEZ-BAUTISTA et al., 2000) e hortaliças (SILVA et al., 2005). Surtos de origem alimentar ocasionados por *Cryptosporidium hominis* (ETHELBERG et al., 2009) e a ocorrência em águas de abastecimento (CASTRO-HERMIDA et al., 2008; KARANIS, 2011; LEE et al., 2010; NETO et al., 2010), e em animais domésticos (LALLO; BONDAN, 2006), também já foram relatados.

Outros trabalhos discorrem sobre as propriedades de dispersão no ambiente (POLLEY, 2005) e características de infectividade do protozoário, além dos riscos para saúde humana e animal (CASTRO-HERMIDA et al., 2009), demonstrando que este parasito requer atenção especial exigindo o monitoramento da sua presença nas mais diversas matrizes ambientais.

2.2 *Giardia intestinalis*.: principais características

Giardia é parasita do intestino delgado sendo o agente etiológico da giardíase, doença gastrointestinal que acomete os seres humanos e animais (COTTON; BEATTY; BURET, 2011). Foi primeiramente descrita por Antony Leeuwenhoek, pioneiro microscopista holandês (FORD, 2005).

Sua distribuição e ocorrência no ambiente causa preocupação em saúde pública em todo planeta, por serem os cistos também eliminados em grandes quantidades nas fezes e pela sua grande capacidade de dispersão no ambiente (FRANCO, 2007; GAJADHAR; ALLEN, 2004; WOODALL, 2009).

Quanto a classificação, o gênero *Giardia* pertence ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae (PLUTZER; ONGERTH; KARANIS, 2010). Morfologicamente, apresenta-se sob duas formas: o trofozoíto e o cisto. O cisto é oval ou elipsoide com cerca de 12 µm de comprimento por 8 µm de largura, possuindo uma parede externa de natureza glicoproteica de 0,3 µm de espessura,

tornando os cistos resistentes a variações de temperatura e umidade, além da ação de produtos químicos empregados como desinfetantes. No interior do cisto, há a presença de dois ou quatro núcleos, e de fibrilas longitudinais denominadas axonemas, bem como a presença de corpos escuros em formato de meia lua (SMITH; GRIMASON, 2003; URBANO; FRANCO, 2008).

A caracterização genética de isolados de *Giardia* permitiu revelar a existência de oito grupos que podem ser encontrados nos seres humanos e em outros mamíferos (SPRONG; CACCIÒ; VAN DER GIESSEN, 2009). Sua ocorrência é tão comum, que tal organismo é amplamente divulgado em guias e manuais pela Organização Mundial da Saúde (COTTON; BEATTY; BURET, 2011; TRAVASSOS; CARVALHO, 2009; WHO, 2002).

O ciclo de vida é considerado simples apresentando dois estádios, onde o cisto é o estágio infeccioso. A exposição ao ácido estomacal e aos sais biliares estimula a liberação dos trofozoítos, no duodeno e jejuno, os quais mediante divisões binárias longitudinais multiplicam-se e colonizam o intestino, aderindo ao mesmo. O processo de encistamento inicia-se no ílio e ao final do mesmo, os cistos produzidos são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro infectado (ADAM, 2012; NASH; HILL, 2012; PLUTZER; ONGERTH; KARANIS, 2010; THOMPSON, 2004).

A transmissão é efetuada através da via fecal-oral pela ingestão de água ou alimentos contaminados (ADAM, 2012; MONIS; THOMPSON, 2003; NASH; HILL, 2012; SPRONG; CACCIÒ; VAN DER GIESSEN, 2009). Outros potenciais mecanismos de transmissão incluem: contato pessoa-a-pessoa, animal-a-animal, zoonótica (animal-humano e humano-animal), veiculação hídrica com o contato com água de recreação, dentre outros (PLUTZER; ONGERTH; KARANIS, 2010).

A ocorrência de *Giardia* tem sido relatada em creches (FRANCO, 1996), mananciais de abastecimento (NETO et al., 2010), amostras de lodo de esgoto (SANTOS et al., 2011) e em águas superficiais e costeiras (SMITH; GRIMASON, 2003).

Frequentemente trabalhos reportam sua ocorrência juntamente com *Cryptosporidium* em diversas matrizes. Chaidez et al. (2005) detectaram *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas destinadas para irrigação, onde cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em 50% das amostras. Cerca de 83% das amostras de água para lavagem dos alimentos pós-colheita apresentaram cistos de *Giardia*. Aqueles autores concluíram que a

presença desses organismos na água conferem riscos à saúde sendo que seres humanos e animais podem apresentar-se infectados após a ingestão dos alimentos irrigados.

Estudos de ocorrência de *Giardia* bem como *Cryptosporidium* em amostras de água bruta e tratada de 16 estações de tratamento de água na Galícia (Espanha) foram reportados. De acordo com Castro-Hermida et al. (2008) o rio Tambre fornece água para consumo humano de aproximadamente 200.00 pessoas, sendo também utilizado para diversas atividades recreativas. As ETA que captam água do para abastecimento, possuem em sua maioria processos de tratamento convencionais compostos de: coagulação, floculação, sedimentação, filtração e desinfecção. No entanto, algumas comunidades de pequeno porte utilizam apenas a cloração após a captação da água.

Os trabalhos de campo encontraram concentrações médias de 1,0 a 12,8 cistos de *Giardia* por litro e concentrações variando de 0,0 a 10,5 oocistos de *Cryptosporidium* por litro nas amostras de água tratada. A distribuição dos resultados do ponto de vista sazonal, revelou que todas as estações de tratamento de água apresentaram altas concentrações de (oo)cistos durante a primavera e o verão. Os resultados demonstraram que aquelas estações não eram capazes de removerem os (oo)cistos, sendo esses distribuídos à população através da água para consumo (CASTRO-HERMIDA et al., 2008).

Karon et al. (2011) atribuíram a falha no sistema de filtração a provável causa de um surto de *Giardia* ocorrido entre julho e agosto de 2007 em um acampamento recreativo na Califórnia, USA. Neste episódio, vinte e seis pessoas tiveram confirmação laboratorial da giardíase e outras 24 apresentaram sintomas semelhantes. Investigações efetuadas no histórico da qualidade da água mostraram dados com elevação nos níveis de coliformes totais e aumento da turbidez de 0,05 para 2,0 NTU na amostra filtrada, sendo aquela a possível fonte de contaminação.

Outros trabalhos analisam a relação entre saúde pública e a veiculação hídrica de protozoários e surtos de doenças pela água (GAJADHAR; ALLEN, 2004), a ocorrência em moluscos bivalves (LEAL; FRANCO, 2008) e as relações entre a vida selvagem, parasitas zoonóticos e os ecossistemas (POLLEY, 2005).

Do ponto de vista epidemiológico é clara a necessidade da atenção especial para este tipo de problemática, uma vez que esses organismos podem causar infecção aos consumidores de água, havendo o potencial para o surgimento de surtos epidêmicos.

Surtos de doenças causados por *Cryptosporidium* e *Giardia* trazem consequências econômicas para toda sociedade pelos altos custos envolvidos nos cuidados com a saúde dos pacientes afetados (CORSO et al., 2003; KARANIS, 2011).

Os impactos dos fatores antropogênicos e ambientais na contaminação da água por esses parasitos afetam substancialmente a qualidade dos recursos hídricos, consequentemente, todas as atividades que requerem o uso da água são prejudicadas. Melhor vigilância e estratégias de gestão são necessárias para avaliar o risco de transmissão desses patógenos, visando a manutenção do bem-estar de toda comunidade.

2.3 Principais formas de detecção

Dentre as principais metodologias em uso para detecção dos protozoários patogênicos de veiculação hídrica, são ressaltadas aquelas que incluem procedimentos baseados em métodos físicos e químicos visando o isolamento de cistos e oocistos a partir de amostras ambientais combinadas com a observação e confirmação da morfologia com o uso de microscopia.

Segundo Zarlenga e Trout (2004), a identificação e a detecção é realizada com o uso de métodos desenvolvidos principalmente para definir a presença nas amostras. Métodos de identificação podem ser classificados em três categorias: morfológicos, imunológicos e moleculares. Várias técnicas e métodos aplicados à detecção, identificação e enumeração de *Cryptosporidium* e *Giardia* são descritos na literatura.

Métodos de concentração que utilizam técnicas de sedimentação dependem do peso relativo do parasito para separá-lo das demais impurezas presentes no meio. Em casos simples, a amostra de água é centrifugada e o pellet resultante é submetido a um dos métodos de identificação. Técnicas que utilizam floculação também podem ser empregadas para facilitar a sedimentação para posterior remoção por centrifugação ou filtração (SMITH; GRIMASON, 2003).

A filtração em membrana é uma técnica que tem sido utilizada para o isolamento tanto de *Cryptosporidium* quanto *Giardia*. A amostra é filtrada com bomba de vácuo e os materiais retidos na membrana são obtidos por meio de extração mecânica e centrifugação (FRANCO; CANTUSIO NETO, 2002; SANTOS et al., 2011).

A literatura apresenta métodos e procedimentos para garantir a qualidade analítica das amostragens, discutindo a qualidade laboratorial que pode minimizar os erros e proporcionar

confiança na validade dos resultados dos testes (BELLAMY, 2004). Discussões acerca da qualidade e precisão das etapas específicas como: filtração, separação imunomagnética (IMS), microscopia de imunofluorescência, teste confirmatório da morfologia, microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), e métodos moleculares, também são abordados (TRAVASSOS; CARVALHO, 2009).

Métodos baseados em citometria de fluxo podem ser aplicados na detecção. Nessa técnica a amostra flui em sentido único e são irradiadas por um feixe de laser. Quando células marcadas com marcadores fluorescentes são irradiadas pelo laser, observa-se a fluorescência específica para o organismo de interesse.

Outras técnicas envolvendo separação de células ativas por fluorescência, imunofluorescência, microscopia do corante vital e, métodos que envolvem reação em cadeia da polimerase (PCR) também podem ser empregados, porém sujeitos à variabilidade das amostras, presença de interferentes tais como algas, bactérias e matéria orgânica (KOTHAVADE, 2012; ZARLENGA; TROUT, 2004).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América – EPA, propôs metodologia para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*; trata-se do método 1622/1623, cuja nova revisão foi publicada em janeiro de 2012 (EPA, 2012). Tomando-se volumes de 10 litros de amostras de águas superficiais, a técnica consiste na concentração do volume por filtração em cartucho específico, seguido de purificação por separação imunomagnética (IMS) e a captura dos (oo)cistos utilizando anticorpos específicos: anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*. A detecção é efetuada após a reação de imunofluorescência direta (RID) seguido do teste confirmatório da morfologia empregando o corante DAPI. É importante ressaltar também que o emprego do DAPI não é indicador de viabilidade e/ou infecciosidade, sendo este empregado apenas como critério morfológico (GRIMASON et al., 1994; SMITH et al., 2002).

Qualquer que seja o método empregado na detecção, todos eles incluem como etapa final a visualização dos cistos e oocistos empregando os anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* conjugados com isotiocianato de fluoresceína, em reação de imunofluorescência direta (RID). Essa técnica requer microscopista bem treinado em morfologia de parasitos já que tais anticorpos podem apresentar reação cruzada com algas e cianobactérias, comumente presentes em mananciais degradados.

2.4 Testes de infecciosidade e aplicações

Embora hajam várias técnicas aplicadas à detecção destes parasitos, todas elas não são capazes de informar a viabilidade ou infecciosidade dos organismos isolados. Existe a dificuldade de se obter informações precisas indicando se tais organismos após serem detectados estão mortos e, no caso de estarem vivos, avaliar a sua viabilidade e infecciosidade.

Analisando do ponto de vista do abastecimento público, torna-se extremamente importante a verificação da infecciosidade, para que se possam tomar decisões corretas quanto às melhores metodologias aplicadas a desinfecção buscando a eliminação desses nos processos de tratamento de água (CASTRO-HERMIDA et al., 2008; KOTHAVADE, 2012; SMITH; GRIMASON, 2003).

Com o intuito de se avaliar a presença de infecciosidade, testes adicionais à etapa de detecção são realizados, sendo que atualmente só são aceitos ensaios efetuados com modelos animais para testes de infecciosidade com *Cryptosporidium* e *Giardia*, ou modelo celular (teste *in vitro*) para inferência da infecciosidade do *Cryptosporidium* (ROCHELLE et al., 2004).

Os ensaios de infecciosidade efetuados em modelo animal utilizam a inoculação do parasito em estudo (gavagem), que após completar o seu ciclo de vida são eliminados nas fezes do hospedeiro para posteriormente serem confirmados através das técnicas de detecção. Nesta metodologia o tempo para obtenção de resultados pode chegar a semanas.

Testes de infecciosidade em camundongos foram desenvolvidos para avaliar a eficiência de inativação do *Cryptosporidium* com o uso de luz ultravioleta. Os ensaios foram efetuados com camundongos neonatais (5 dias de idade), onde os organismos foram inoculados oralmente. Após sete dias as fezes foram analisadas e a infecciosidade do *Cryptosporidium* confirmada (CRAIK et al., 2001).

Garcia et al. (2002) também utilizaram camundongos para avaliarem a presença de infecciosidade da *Giardia* proveniente de amostras de esgoto após o tratamento terciário. Camundongos com idade variando entre 4 e 6 semanas foram utilizados nos ensaios, os cistos de *Giardia* ministrados via oral e após 3 dias, recuperados nas fezes e quantificados.

Com o objetivo de demonstrar a infecciosidade de *Cryptosporidium* em águas de reuso, Gennaccaro et al. (2003), utilizaram meio celular HCT-8 para incubação de *Cryptosporidium* isolados e purificados de amostras de efluente bruto, efluente de tratamento secundário, pós-

filtração e pós-desinfecção. Os testes foram conduzidos com média de 48 horas de duração e a confirmação da infecciosidade efetuada com o uso de microscopia de fluorescência.

Outro trabalho que empregou meio celular para teste de infecciosidade foi desenvolvido com intuito de avaliar o efeito do tratamento de água e do uso de desinfetantes a base de cloro livre na inativação do *Cryptosporidium* (KEEGAN et al., 2008). Oocistos foram inoculados em meio celular composto de células HCT-8 com concentração média de 10.000 oocistos e incubados a 37° C e 5% de CO₂ pelo período de 48 horas. Keegan et al. (2008) demonstraram que a infecciosidade do parasito não foi alterada pela exposição ao cloro livre na faixa de zero a 20 mg·L⁻¹ e 60 minutos de contato.

Li et al. (2009) avaliaram a infecciosidade da *Giardia* em amostras de esgoto tratado com luz UV. Os experimentos foram conduzidos em modelo animal utilizando camundongos machos com idade variando de 4 a 8 semanas. A inoculação foi efetuada por via gástrica e a coleta das fezes após 6 dias do início do ensaio. A detecção da *Giardia* foi realizada conforme método EPA 1623. Posteriormente, todos os camundongos foram sacrificados para avaliar a presença de trofozoítos na mucosa intestinal após 15 dias de ensaio.

Analizando os métodos que avaliam infecciosidade, tais como a infecção *in vitro* em modelo celular ou teste de infecciosidade em modelo animal, pode-se dizer que eles são caros, muito demorados e requer infraestrutura sofisticada, p. ex.: biotérios. Esses testes são sujeitos a variabilidade já que pressupõem resposta diferenciada do animal ou da célula escolhida como modelo para o teste de infecciosidade *in vitro*. Quanto à infecciosidade animal, ainda há as questões de ética já que animais são necessariamente sacrificados nestes ensaios.

Ensaio com hospedeiros requerem longos períodos de observação, podendo chegar a semanas de testes, como os efetuados por Garcia et al. (2002) e Li et al. (2009).

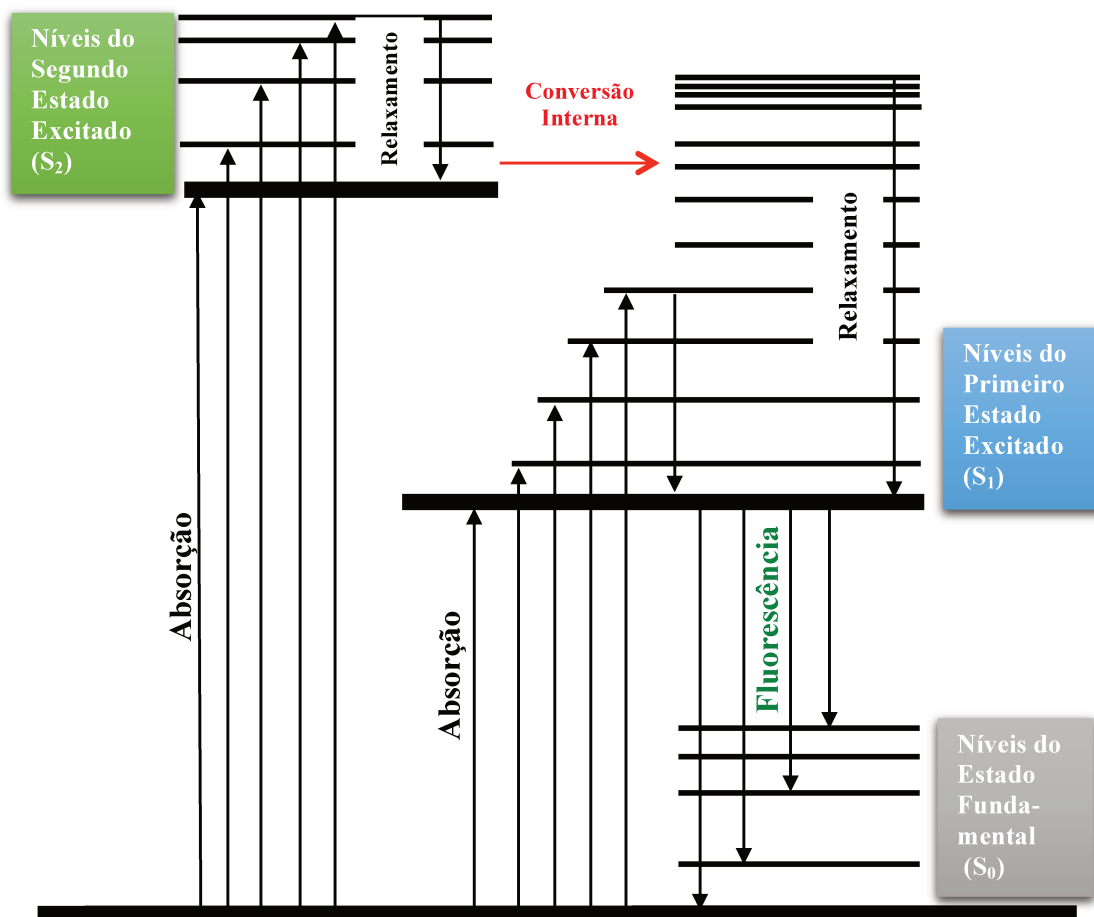
Estudos de organismos com o uso de marcadores fluorescentes têm ganhado a atenção de vários pesquisadores. O uso de marcadores tem sido reportado em diferentes organismos e células tais como bactérias (CRONIN; WILKINSON, 2008), cianobactérias (TASHYREVA; ELSTER; BILLI, 2013), protozoários (KABANI; WATERFALL; MATTHEWS, 2010; REAL; POUCHELET; RABINOVITCH, 2008) e células tumorais (WANG et al., 2005). Essa abordagem visa à redução dos custos envolvidos nos testes em modelo animal além de facilitar a execução dos ensaios.

2.5 Fluorescência e Fluoróforos

Fluorescência é o resultado de três processos fundamentais – excitação, estado excitado e emissão de luz por certas moléculas, geralmente hidrocarbonetos poliaromáticos ou heterocíclicos conhecidas também como fluoróforos ou marcadores fluorescentes (HAUGLAND, 2002). Nas Figuras 1 e 2 estão descritos os mecanismos envolvidos na fluorescência.

Marcadores celulares são moléculas designadas especificamente para produzirem respostas localizadas e biologicamente delimitadas, permitindo pesquisadores avaliarem processos fisiológicos, identificar moléculas específicas e investigar diversos processos patológicos em organismos (DRUMMEN, 2012). O processo responsável pela fluorescência de um marcador celular pode ser descrito conforme diagrama de Perrin-Jablonski na Figura 1.

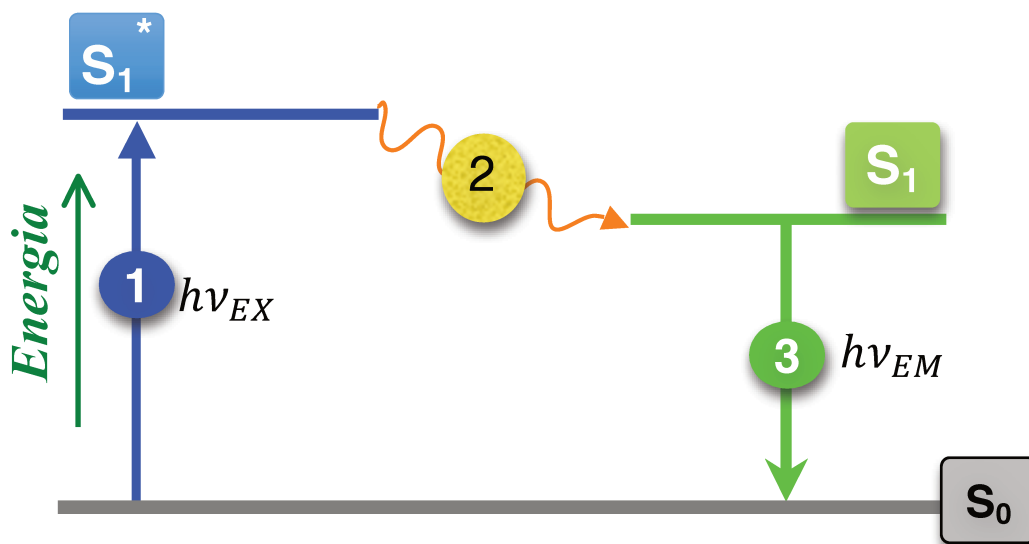
Figura 1 - Diagrama Perrin-Jablonski adaptado, apresentando os níveis de energia e as transições envolvidas na absorção de energia e fluorescência. Após a absorção de energia, o fluoróforo pode atingir estados eletronicamente excitados S_1 ou S_2 . O retorno ao estado fundamental S_0 é acompanhado pela emissão de luz.



Fonte – Diagrama adaptado de Noomnarm e Clegg (2009).

Na Figura 2 está descrito resumidamente os três principais estágios de absorção e emissão de luz que ocorre durante o fenômeno de fluorescência. O processo que envolve a fluorescência é cíclico conferindo ao marcador celular a capacidade de ser repetidamente excitado e detectado. A capacidade de emitir milhares de fótons detectáveis após a excitação é fundamental para a sensibilidade do fluoróforo e as técnicas de detecção da fluorescência (DRUMMEN, 2012; HAUGLAND, 2002; NOOMNARM; CLEGG, 2009).

Figura 2 – Representação esquemática da emissão de fluorescência por marcadores celulares. S_0 indica o estado fundamental de energia; S_1^* e S_1 são estados eletronicamente excitados – Singlete; $E = h\nu_{EX}$ é a energia de excitação que o marcador celular recebe em função do comprimento de onda. $E = h\nu_{EM}$ é a energia de emissão da fluorescência após excitação. h é a constante de Planck e vale: $6,6260695729 \times 10^{-34}$ J·s, ν é frequência Hz (Hertz), E é a energia média em J (Joules).



Fonte – Diagrama adaptado de Haugland (2002).

Os estágios que envolvem a fluorescência podem ser explicados da seguinte forma:

- I. *Estágio (1) Excitação:* A energia é fornecida através de fonte externa como, por exemplo, lâmpada halogênica, laser ou LED, e esta por sua vez é absorvida pelo fluoróforo. A absorção cria um estado eletronicamente excitado – estado singlete (S_1^*).
- II. *Estágio (2) Estado eletronicamente excitado:* Corresponde ao estado cujo tempo de duração (*lifetime*) é da ordem de nanossegundos. Durante esse período o fluoróforo sofre alterações conformacionais, estando sujeito a interações com o ambiente molecular. O estado de energia S_1^* é parcialmente dissipado levando ao estado relaxado singlete S_1 . A partir deste, origina-se a fluorescência. No entanto, nem todas as moléculas inicialmente

excitadas no Estágio (1) retornam ao estado fundamental S_0 emitindo fluorescência (HAUGLAND, 2002; NOOMNARM; CLEGG, 2009).

- III. *Estágio (3) Emissão da fluorescência*: O fóton contendo energia $E = hv_{EM}$ é emitido e o fluoróforo retorna ao seu estado fundamental S_0 . Devido a dissipação de energia que ocorre durante o tempo de vida do estado excitado, sua intensidade é menor e consequentemente possui maior comprimento de onda, que aquele obtido no *Estágio (1)* ($E = hv_{EX}$). A $\Delta E = hv_{EX} - hv_{EM}$ é chamada de desvio de Stokes e é de fundamental importância para a sensibilidade nas técnicas que envolvem detecção da fluorescência (HAUGLAND, 2002; NOOMNARM; CLEGG, 2009).

2.5.1 Detecção da fluorescência

São quatro os elementos essenciais para a detecção da fluorescência utilizando marcadores celulares: (1) fonte para excitação; (2) fluoróforo; (3) filtros de espectro eletromagnético capazes de isolar comprimentos de onda específicos; (4) fotodetector capaz de registrar a emissão de luz e produzir dados que possam ser armazenados. Independentemente do tipo de instrumento utilizado para a medição, a presença desses quatro elementos são essenciais para otimizar a detecção da fluorescência (HAUGLAND, 2002).

Basicamente existem quatro tipos de medidores de fluorescência, cada um provendo informações distintas. Esses instrumentos podem ser comercialmente encontrados sob as mais variadas ofertas de marcas e modelos. Podem-se destacar medidores de fluorescência tais como:

- Espectrômetros de fluorescência e leitores de microplacas capazes de medirem volumes variando de microlitros (μL) até mililitros (mL) de amostras;
- Microscopia de fluorescência que permite a medição da fluorescência através de coordenadas espaciais em duas ou três dimensões em objetos microscópicos com tamanhos menores que 0,1 mm de diâmetro;
- Leitores de fluorescência para “*microrray*” que efetuam medidas através de coordenadas bidimensionais com objetos macroscópicos como, por exemplo, géis de eletroforese e cromatogramas;
- Citometria de fluxo, onde a fluorescência é detectada através do fluxo de amostra que é irradiada por laser e permitindo que populações de células sejam identificadas e quantificadas.

Outros instrumentos que efetuam medidas de fluorescência podem ser encontrados tais como eletroforese capilar, sequenciamento de DNA e dispositivos para microfluidos. Esses instrumentos apresentam diferentes formas para medição da fluorescência e podem ser utilizados com diferentes marcadores celulares em diferentes aplicações.

2.5.2 Dispositivos compactos para medidas de luminescência

Dispositivos compactos para medidas de luminescência estão disponíveis no mercado, muitos deles aplicados a detecção de luminescência em amostras biológicas. Um dos exemplos de aplicação dos sistemas de fóton-contagem é a detecção da luminescência retardada. Nela o foco principal é a detecção da re-emissão da luz irradiada sobre o organismo. Tais sistemas contam com dispositivos capazes de acionarem/desativarem iluminadores para a excitação de amostras, além de válvulas fotomultiplicadoras que detectam o sinal.

Tudisco et al. (2003) descrevem um sistema de fóton-contagem com iluminador acoplado e sistema controlador com precisão de microssegundos, permitindo a rápida medição da luminescência após a iluminação da amostra. Essa característica de iluminação e posterior fóton-contagem foram alcançados devido ao circuito eletrônico que impede que a válvula de fóton-contagem (PMT) faça leituras durante a iluminação das amostras. Tal equipamento foi especialmente projetado para biópsia óptica de células humanas.

Outras aplicações em medidas de luminescência requerem a detecção e a caracterização dos espectros de eletromagnéticos. Quando esse tipo de estudo é necessário, a inserção e remoção de filtros ópticos permitem a identificação dos comprimentos de onda provenientes da emissão de luz das amostras.

Chen et al. (2003) propuseram implementação para controle de injeção fluido em câmara escura com o intuito de medir a quimioluminescência de sementes de arroz. Tal sistema foi desenhado para detectar a formação de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e o vigor de sementes. Utilizando essa instrumentação aliada com um dispositivo seletivo para oxigênio singleto, os resultados daqueles pesquisadores demonstraram a capacidade de detectar a quimioluminescência proveniente de $^1\text{O}_2$. Tal instrumento foi implementado com o uso de PMT (Perkin Elmer PM962) com sensibilidade espectral em torno de 185-850 nm e contagem de escuro da ordem de $25 \text{ fótons} \cdot \text{s}^{-1}$.

Costanzo et al. (2008) apresentaram aplicações da caracterização dos comprimentos de onda com o uso de filtros ópticos em medidas de Luminescência Retardada (DL) em sementes de soja. Naquele experimento, o sistema de fóton-contagem contou com fonte de luz guiada por fibra óptica bifurcada até a câmara escura. Após a iluminação da amostra, a DL retorna pela fibra óptica e depara-se com filtros permitindo assim, descrever o espectro e os respectivos comprimentos de onda quando detectados pela válvula fotomultiplicadora (PMT).

O grupo japonês liderado por Inaba e Kobayashi efetuou vários estudos com sistemas de fóton-contagem levando o desenvolvimento de dispositivos capazes de reproduzirem imagens da emissão ultra-fraca de luz espontânea com o uso de câmeras do tipo “*Charge Couple Device*” – CCD e válvula fotomultiplicadora PMT bidimensional. Essas imagens foram aplicadas na caracterização das emissões a partir de estudos da superfície do corpo humano.

Utilizando dois tubos de fóton-contagem associados a dispositivos eletrônicos para identificar as duas dimensões espaciais e temporais, pesquisadores projetaram um sistema que permitia estudar o comportamento eletromagnético de cérebros de camundongos criando imagens espectrais da fóton-emissão. Naqueles experimentos foram utilizadas válvulas fotomultiplicadoras do tipo PMT Photek IPD440 com 40 mm de diâmetro e sensibilidade espectral de 350-900 nm e contagem de escuro de $76 \text{ fótons} \cdot \text{s}^{-1}$ (INABA, 2000; SCOTT; INABA, 1989).

Com o intuito de avaliar o comportamento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando submetida ao estresse em meio aquoso, pesquisadores da Hamamatsu Photonics desenvolveram método e dispositivo de fóton-contagem portátil, capaz de efetuar a detecção dos padrões de fluorescência retardada (DF) após excitação com LED emissor de pulsos com 670, 680 nm e luz branca (KATSUMATA et al., 2008).

O sistema conta com câmara escura com válvula fotomultiplicadora sensível no infravermelho (PMT Hamamatsu R910), iluminador com LED modelo SLA-560 XM e elemento obturador para isolar a iluminação da PMT. Tal sistema conta também com software de gerenciamento de dados, permitindo a leitura de luminescência em tempos de aquisição variando entre 10 e 100 ms.

Gallep, Santos e Conforti (2005), desenvolveram sistema de fóton-contagem de baixo custo composto de: câmara escura, válvula fotomultiplicadora acoplada (Hamamatsu), placa de contagem (Hamamatsu), software de aquisição de dados, fonte controladora e microcomputador.

O dispositivo estava em uso no Laboratório de Fotônica Aplicada da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP até o ano de 2009, sendo a sua desativação necessária para implementação de novos aparatos aplicados aos experimentos de interesse neste trabalho.

Ross et al. (2006) desenvolveram equipamento para análise de fluorescência tendo sido demonstrado o transporte intracelular do fluoróforo rodamina-123 em trofozoítos de *G. intestinalis*. A técnica permite a dissociação na aquisição da imagem e a excitação eletromagnética do marcador, elevando a sensibilidade na detecção da fluorescência. O sistema composto de microscopia confocal e válvula PMT, permitiu o acompanhamento do transporte intracelular do marcador, tendo sido visualizado sua acumulação no interior das células, ao redor de núcleos e de vesículas dorsais (ROSS et al., 2006). Essa abordagem abre novas perspectivas na análise e detecção de protozoários no campo da parasitologia ambiental.

2.6 Usos diversos de marcadores celulares em protozoários

Ao longo das últimas décadas, muitos pesquisadores têm estudado e desenvolvido métodos, equipamentos e procedimentos aplicados a detecção da viabilidade de protozoários utilizando marcadores celulares.

A autofluorescência do *C. parvum* foi observada em 1998 (VAREA et al., 1998). Utilizando microscopia e excitação eletromagnética com diferentes comprimentos de onda, os autores encontraram diferentes comportamentos do organismo quando iluminado. Para comprimentos de onda de 365 nm, *C. parvum* apresentou autofluorescência na banda do violeta. Para comprimento de onda de 405 nm, intensa autofluorescência na cor verde. Já para comprimento de 546 nm, autofluorescência na cor verde, porém com menor intensidade. Outra característica observada é que quanto maior a intensidade de iluminação, menor duração da autofluorescência.

Cistos intactos de *G. intestinalis* também apresentam autofluorescência de fraca intensidade quando excitados com 350 nm. Essa característica foi apresentada por Iturriaga et al. (2001) em estudos com atividade respiratória em cistos de *Giardia*. Segundo Iturriaga et al. (2001) foram observadas alta variabilidade na intensidade da fluorescência em diferentes amostras analisadas. Tais observações levaram os pesquisadores a concluir que essa variabilidade pode estar associada a diferentes concentrações de flavoproteínas naturalmente presentes nos cistos.

Belosevic et al. (1997) avaliaram 17 tipos de marcadores celulares sensitivos ao DNA como indicadores de morte celular. Dependendo do tipo de marcador, a taxa de positividade variou entre 64 e 100% após 60 minutos de incubação a 37° C. Hexidio, SYTO-59 e SYTO-9 apresentaram os melhores desempenhos na concentração de 20 µM, demonstrando serem capazes de marcarem oocistos de *C. parvum* mortos.

Os resultados obtidos levaram aqueles autores concluir que o SYTO-9 não apresenta diferenças significativas entre os testes conduzidos com modelos animais (BELOSEVIC et al., 1997). Porém, conforme relataram Belosevic et al. (1997), novas metodologias para detecção da fluorescência deveriam ser desenvolvidas pois, a técnica que usa microscopia de epifluorescência foi extremamente tediosa e demorada para a obtenção dos resultados.

Neumann et al. (2000) apresentaram correlações entre marcação do DNA de *Cryptosporidium* com SYTO-9, SYTO-59 e infecciosidade em modelo animal. O grupo demonstrou também a aplicabilidade da técnica baseada em citometria de fluxo na análise da intensidade da fluorescência, além de terem avaliado a morfologia do parasito em microscopia confocal.

Os resultados demonstraram que oocistos não marcados foram altamente infecciosos aos camundongos. Já oocistos marcados com SYTO não apresentaram infecciosidade aos camundongos. Além do mais, os pesquisadores observaram que os oocistos marcados eram menores e apresentavam alteração na morfologia diferentemente daqueles não marcados. Essa observação levou aqueles pesquisadores concluir que a morte do *Cryptosporidium* é acompanhada pela alteração da morfologia do parasito mediante a compactação do mesmo (NEUMANN et al., 2000). Contudo, Neumann et al. (2000) não apresentaram razões para a ocorrência do fenômeno.

Fluoróforos redutores combinados com a técnica de imunofluorescência foram aplicados na detecção da atividade enzimática e respiratória em *Cryptosporidium* e *Giardia*. Foram utilizados: cloreto de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazólio (CTC) e *p*-iodonitrotetrazólio violeta (INT) como indicadores de atividade respiratória (ITURRIAGA et al., 2001). Cianeto de Potássio (KCN) e Azida de Sódio (NaN₃) foram utilizados como inibidores de atividade respiratória no experimento. Para cada amostra de 500 µL, 30 µL de NaN₃ [20 mg·mL⁻¹] e 30µL de KCN [10%] foram adicionados nos experimentos como controle negativo. Os resultados foram analisados

com microscopia de epifluorescência e a intensidade da fluorescência foi medida com uso de citometria de fluxo.

Os testes demonstraram que ambos *Cryptosporidium* e *Giardia* apresentam respostas ao CTC e INT. Contudo, devido ao tamanho do *Cryptosporidium*, a intensidade da fluorescência deste foi menor que aquela observada com *G. lamblia*. A interatividade da *Giardia* com CTC e INT sugere que a atividade respiratória desta é reduzida após uma semana de idade a níveis indetectáveis (ITURRIAGA et al., 2001). Iturriaga et al. (2001) argumentaram também que embora os cistos sejam capazes de permanecerem viáveis por longos períodos, a atividade metabólica é reduzida entrando em dormência logo que eles são lançados no ambiente. CTC e INT mostraram-se satisfatórios no estudo de atividade respiratória em cistos de *Giardia*.

Simmons e Sobsey (2003) desenvolveram sistema *in vitro* para testes de infecciosidade de *C. parvum* com uso de linhagens celulares, anticorpo monoclonal e reagente quimioluminescente. O método é baseado na detecção dos focos de infecção de *C. parvum* em meio celular, combinado com uso de anticorpo monoclonal IgG₃ (C₃C₃-FITC) e kit quimioluminescente composto de estreptavidina-fosfatase-alcalina. O procedimento envolveu a inoculação de oocistos *C. parvum* em linhagens celulares de adenocarcinoma ileocecal (HCT-8) e Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), combinados com anticorpo monoclonal e reagente quimioluminescente.

Os resultados demonstraram que utilizando o método quimioluminescente, foi possível identificar os focos de infecciosidade no meio celular sem a necessidade do uso de microscopia, podendo ser visualizados a olho nu. Simmons e Sobsey (2003) argumentam também que o método é simples de ser executado além de permitir que outros métodos moleculares possam ser combinados com o processo (SIMMONS; SOBSEY, 2003). No entanto, embora o método permita a identificação dos focos de infecciosidade sem a necessidade de microscopia, o tempo para aquisição de resultados ainda o torna impeditivo do ponto de vista de uma ETA, dado que pelo menos 60 h foram necessárias para o completo ciclo de vida do *C. parvum* no meio celular.

Barbosa et al. (2008) desenvolveram estudos para otimização de método baseado em citometria de fluxo com intuito de detectar a viabilidade de cistos de *G. lamblia*. Os estudos foram conduzidos com o marcador celular Iodeto de Propídio (PI) combinado com anticorpo monoclonal Giardia-a-Glo[®] (WaterBorne Inc.).

Diluições seriadas da ordem de 10^4 a 10^2 foram estudadas para avaliar a sensibilidade da técnica. A especificidade do método foi analisada adicionando-se micro-organismos procariotos (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e eucariotos (*Candida albicans* e *C. parvum*) na suspensão de *Giardia* (BARBOSA et al., 2008).

Após a incubação, os dados mostraram que somente cistos mortos em formalina foram marcados com PI na concentração de $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esse resultado foi obtido com e sem adição do anticorpo Giardia-a-Glo[®]. Contudo, a adição do anticorpo na concentração de $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ levou à clara distinção entre as populações (vivas e mortas) cuja sensibilidade foi de 2×10^2 cistos $\cdot\text{mL}^{-1}$. Embora Barbosa et al. (2008) não apresentem razões específicas para a ocorrência do fenômeno, eles argumentam que células tratadas com radiação ultravioleta ou estresse térmico, não são marcadas com PI. Desta forma, um resultado negativo com PI não significa que os cistos estejam vivos, uma vez que há possibilidade de ocorrência de cistos mortos e sem marcação celular.

Propídio Monoazida foi sugerido como indicador de viabilidade em *C. parvum*. Propídio Monoazida (PMA) e Etídio Monoazida (EMA) são marcadores celulares que são fotoativados com luz branca ou UV. Penetram preferencialmente em células mortas, danificadas ou com membranas permeáveis, mas não penetram em células com membranas intactas. Uma vez dentro das células, intercalam com o DNA através de ligações covalentes resultando em um complexo DNA-PMA/EMA estável e impedindo a amplificação do DNA de células mortas (BRESCIA et al., 2009).

O método chamado de CryptoPMA-PCR permite a genotipagem e a determinação da viabilidade de *C. parvum*, tendo sido demonstrado boa reprodutibilidade em amostras de águas superficiais com 17 NTU (BRESCIA et al., 2009).

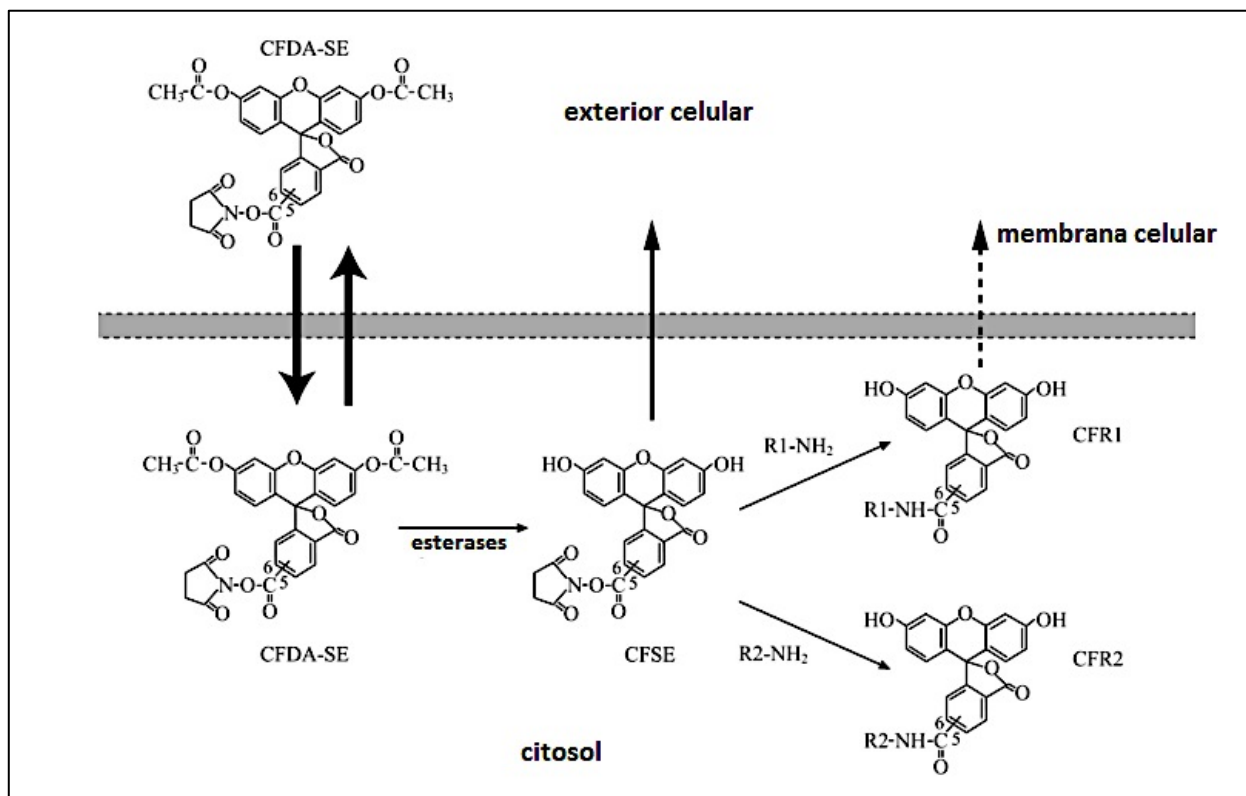
A leitura dos resultados com PMA pode ser efetuada tanto com uso da técnica PCR quanto com a observação em microscópio de fluorescência. Ao utilizar o PCR, detecta-se DNA de oocistos viáveis, uma vez que PMA impede a amplificação do DNA intercalado. Já a observação em microscópio de epifluorescência permite a identificação dos oocistos mortos e marcados em vermelho com PMA $20 \mu\text{M}$ após 10 minutos de incubação (BRESCIA et al., 2009).

Scheid e Schwarzenberger (2011), utilizaram CFDA-SE para inferir a viabilidade de *C. parvum*. O objetivo daqueles autores foi avaliar se amebas de vida livre são vetores de *C. parvum*. Utilizando CFDA-SE aqueles pesquisadores afirmaram que esse marcador celular proveu evidências de que os oocistos utilizados naquele trabalho estavam viáveis. Alegaram que

CFDA-SE é um marcador celular não-fluorescente que se difunde passivamente pelo citoplasma da célula e, uma vez dentro dela, torna-se fluorescente através de reações de esterases. Argumentam que o CFDA-SE é um método de marcação celular que detecta atividade enzimática e como resultado os organismos vivos emitem fluorescência verde.

CFDA-SE é uma molécula lipofílica que só é minimamente fluorescente após ser transportada para dentro das células. Uma vez dentro das células, reações de esterases clivam o grupo acetil e a molécula torna-se fluorescente. O grupo succinimidil éster liga-se covalentemente à moléculas de aminoácidos e promove a fluorescência intracelular. Desta forma, após o CFDA-SE se difundir pelo citoplasma o grupo acetil é removido deixando apenas CF-SE que é retido pelas células por ligarem covalentemente com as proteínas. Como consequência, as células marcadas emitem fluorescência verde brilhante após excitação com ~492 nm (WANG et al., 2005). Na Figura 3 está descrito o esquema de transporte celular bem como as reações de esterases que levam à fluorescência do CFDA-SE no interior da célula.

Figura 3 – Mecanismo de reação química envolvido na fluorescência do CFDA-SE. CFDA-SE é agrupado pelas células e uma vez dentro delas reações de esterase promovem a remoção de dois grupos acetatos levando a formação do CFSE. O succinimidil do CFSE pode ligar-se a grupos amina formando conjugados do tipo CFR1 e CFR2. O conjugado CFR2 não pode escapar das células apresentando fluorescência duradoura.



Fonte – Diagrama adaptado de Wang et al. (2005).

Wang et al. (2005) avaliaram o uso CFDA-SE em células tumorais. As células foram submetidas a diferentes tempos de incubação e os resultados foram analisados após 4h de ensaio. Para tempos de incubação superiores a 8 minutos, não foram observadas mudanças significativas na fluorescência das células.

CFDA-SE e CFDA foram testados em células de *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* (HOEFEL et al., 2003). Com esses micro-organismos, CFDA demonstrou ser mais sensível que CFDA-SE na detecção de bactérias ativas. CFDA-SE marcou bactérias inativas com intensidade de fluorescência igual àquela observada em bactérias ativas sendo este incapaz de distinguir tais populações.

Real et al. (2008) aplicaram CFDA-SE em amastigotos do protozoário *Leishmania amazonensis* em testes de colonização em macrófagos. Os amastigotos foram incubados em CFDA-SE 5 µM durante 10 minutos na temperatura ambiente. De acordo com Real et al. (2008), após 48 horas a fluorescência do CFDA-SE foi reduzida, provavelmente devido a diluição deste durante o processo de divisão celular. Contudo, a fluorescência do CFDA-SE foi detectada mesmo após 80 horas de ensaio (REAL; POUCHELET; RABINOVITCH, 2008).

Hammes et al. (2011) discorrem acerca do uso de diferentes marcadores fluorescentes na atualidade. Consideram que os requisitos básicos para inferir viabilidade celular dependem de: (1) presença de ácidos nucleicos funcionais, permitindo a transdução/transcrição e replicação de DNA. (2) a presença de energia mínima para a realização das funções básicas da célula. (3) presença de membrana celular intacta mantendo o ambiente intracelular intacto. Esses conceitos estão relacionados com a presença/ausência de componentes da célula e são parâmetros importantes de viabilidade celular em função do estado metabólico do organismo.

No caso de testes que detectam atividade enzimática o CFDA-SE usualmente mede clivagens específicas na célula. Marcadores como SYTO-9, SYTO-59, SYBR e PI são amplamente utilizados para inferir morte celular através da marcação do DNA (HAMMES; BERNEY; EGLI, 2011). Contudo, quaisquer que sejam os marcadores empregados, Hammes et al. (2011) argumentam que os experimentos devem ser conduzidos sob condições controladas, sendo que os resultados devem ser interpretados e reportados face aos experimentos executados.

No presente trabalho, demonstra-se que oocistos vivos de *C. parvum* e cistos vivos de *G. intestinalis* quando incubados com CFDA-SE, não são capazes de interagirem com esse

marcador e não emitem fluorescência. (Oo)cistos mortos emitem fluorescência verde brilhante (~530 nm) após excitação com ~492 nm em microscópio de epifluorescência.

Ensaio com C12-resazurina e SYTOX Green também foram analisados como candidatos a detecção de viabilidade em (oo)cistos. Os resultados seguem a mesma sistemática encontrada no CFDA-SE. Contudo (oo)cistos mortos apresentam dupla marcação celular com C12-resazurina e SYTOX Green.

Os resultados apresentados aqui divergem daqueles reportados por (SCHEID; SCHWARZENBERGER, 2011) além de demonstrar a incapacidade de CFDA-SE, C12-resazurina e SYTOX Green indicarem viabilidade em cistos de *Giardia*. Contudo, os resultados demonstram que a fluorescência retardada em cistos de *Giardia* sob diferentes condições experimentais, difere em intensidade e velocidade de decaimento após incubação em CFDA-SE 5,0 μ M.

Dispositivos de fóton-contagem compactos foram capazes de medir a fluorescência retardada após incubação em CFDA-SE. Os resultados mostram que o envelhecimento da amostra é acompanhado pela variação nos perfis de fluorescência retardada em cistos de *G. intestinalis*. O custo para projeto, execução e implementação de um protótipo portátil foi significativamente menor que o valor de aquisição de dispositivo comercial. A metodologia de detecção da fluorescência retardada apresentada é de fácil execução e com reduzido custo de análise.

3 Material e Métodos

O projeto foi desenvolvido em duas frentes de trabalho, sendo uma no Brasil e outra no Japão. Os ensaios foram desenvolvidos com organismos e reagentes comerciais avaliando-se a interatividade do *C. parvum* e *G. intestinalis* com CFDA-SE, C12-resazurina e SYTOX Green.

No Brasil, os experimentos foram executados no Laboratório de Fotônica Aplicada da Faculdade de Tecnologia, em parceria com o Laboratório de Protozoologia do Instituto de Biologia, ambos da UNICAMP. Nessa etapa, o projeto abrangeu a concepção, construção, calibração e padronização de uma câmara de fóton-contagem (BERTOGNA; 2013) e a execução dos ensaios de fluorescência retardada com amostras purificadas de *G. intestinalis*.

A segunda etapa do trabalho foi realizada no Japão com ensaios desenvolvidos no Instituto Nacional de Doenças Infecciosas – NIID em Tóquio, contando com a parceria da Hamamatsu Photonics K. K. – Hamamatsu. Nessa etapa, foram executados ensaios de viabilidade com marcadores celulares em amostras de *Cryptosporidium* e *Giardia*, além de ensaios de infecciosidade em modelos animais correlacionando-se infecciosidade com marcação celular.

3.1 Procedimento experimental

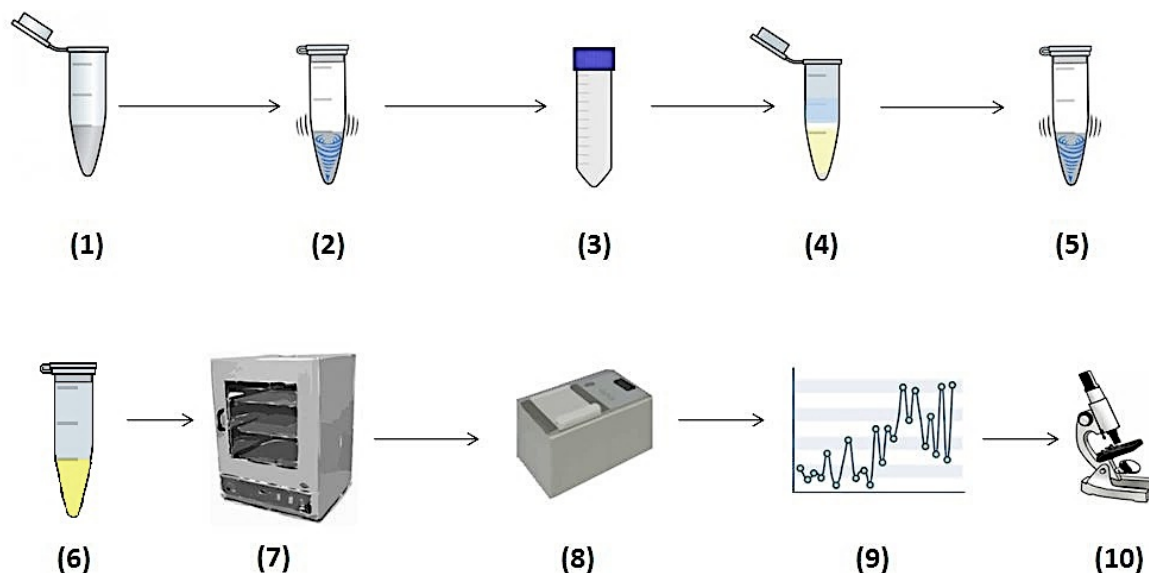
Os ensaios de fluorescência retardada foram conduzidos com câmaras de fóton-contagem dotadas de válvulas fotomultiplicadoras sensíveis ao espectro visível e infravermelho.

Na Figura 4 está descrito o fluxograma experimental adotado na análise dos padrões DF de diferentes grupos de (oo)cistos analisados. O procedimento pode ser facilmente executado em laboratório com tempo de análise de aproximadamente 1h envolvendo 15 amostras previamente purificadas.

O procedimento descrito na Figura 4 envolve: (1) preparo da suspensão purificada de cistos de *Giardia*; tal procedimento pode ser efetuado com uso de técnicas já descritas na literatura (AWWA, 2012; EPA, 2012), (2) a suspensão purificada é agitada em vortex por 2 minutos, (3) preparo do marcador fluorescente, (4) adição do marcador na suspensão purificada, (5) agitação da suspensão purificada em vortex por 10 segundos, (6) incubação da suspensão mais reagente na câmara (7) a 37° C durante 30 minutos, (8) Medidas de fluorescência retardada em câmara escura com válvula fotomultiplicadora acoplada, (9) Análise dos dados de fóton-contagem com base na integral das curvas de DF e cinética de decaimento fluorescente, (10) observação e confirmação da morfologia do parasito em microscópio de epifluorescência e

análise do comportamento do marcador fluorescente. Esse procedimento foi adotado nas séries tanto no Brasil como no Japão.

Figura 4 – Procedimento experimental desenvolvido para ensaios de fluorescência retardada em cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. (1) a (10) descreve o passo-a-passo dos procedimentos adotados na análise do decaimento fluorescente após incubação com marcador celular e leitura em câmara de fóton-contagem.



Fonte – Arquivo pessoal.

3.2 Grupos de (oo)cistos

Com intuito de avaliar os comportamentos de (oo)cistos vivos e mortos nos perfis de DF, testes foram conduzidos com diferentes grupos de organismos. Na Tabela 1 descreve-se resumidamente os diferentes grupos de (oo)cistos utilizados nos experimentos efetuados nas séries Brasil e Japão. Os procedimentos experimentais adotados para o preparo de cada grupo de organismos estão descritos nos demais itens ao longo deste capítulo.

Tabela 1 – Grupos de (oo)cistos preparados para ensaios de DF. Séries Brasil e Japão.

Séries Brasil – $2,5 \times 10^2$, 5×10^3 e 2×10^4 cistos		Séries Japão – 10^4 e 10^5 (oo)cistos	
grupos	condição experimental	grupos	condição experimental
gL	Cistos infecciosos $10 < \text{idade} < 20$ dias	gL e cL	(oo)cistos frescos, vivos e infecciosos
g0	Cistos > 30 dias de idade		
g1	Cistos mortos $100^\circ\text{C}/20\text{min}$		
g2	Cistos estressados com $\text{UV}@254\text{nm}$	g1 e c1	(oo)cistos mortos $98^\circ\text{C}/5\text{min}$
gf	Cistos mortos $-20^\circ\text{C}/7\text{dias}$		

3.3 Ensaios de Fluorescência Retardada – séries Brasil

3.3.1 Suspensões purificadas de *G. intestinalis*

G. intestinalis (H3 – isolados de gerbilos) foram adquiridas na WaterBorne Inc., catálogo: P101@1x10⁶. Os cistos são comercializados vivos contendo 1x10⁶ cistos em 4,0 mL de suspensão purificada em tampão fosfato salino (PBS) e antibióticos: penicilina, gentamicina e estreptomicina, além de 0,01% de Tween 20. No Anexo (1) é apresentado o laudo técnico da empresa WaterBorne descrevendo as propriedades dos cistos adquiridos, bem como o método de quantificação dos organismos.

3.3.2 Preparo das alíquotas

Amostra contendo 1x10⁶ cistos em 4,0 mL de suspensão foi dividida em alíquotas de 1,0 mL para a execução dos experimentos. O volume total de 4,0 mL foi homogeneizado em vortex por dois minutos. Após a homogeneização, transferiu-se 1,0 mL da suspensão purificada para microtubos Agilent Inc, totalizando quatro microtubos. A homogeneidade de cada alíquota foi verificada através do método de contagem “*well-slide enumeration*” conforme método EPA 1623. Esse procedimento permitiu alíquotas de ~2,5x10⁵ cistos·mL⁻¹. Posteriormente, alíquotas contendo aproximadamente 2,5x10², 5x10³ e 2x10⁴ cistos·100μL⁻¹ foram preparadas para a execução dos ensaios de diluição com os marcadores celulares e fluorescência retardada.

3.3.3 Grupos de cistos de *G. intestinalis*

Os ensaios foram efetuados com quatro grupos de organismos. Foram avaliados os comportamentos de grupos contendo cistos de *G. intestinalis* vivos, sem estresse e infecciosos a humanos com idade entre 10 e 20 dias, descritos aqui como grupo gL. Grupos com mais de 30 dias de idade, sem estresse e armazenados em refrigerador a 4° C referenciados como grupo g0. Cistos mortos a 100° C pelo período de 20 minutos são representados como g1. Cistos estressados com lâmpada UV-C, 254 nm e 15 W pelo período de 1 h – pertencentes ao grupo g2. Uma série de ensaios foi conduzida com grupo de organismos mantidos em freezer em -20° C por sete dias (grupo gf).

3.3.4 Estresse dos organismos

O estresse do grupo g1 foi efetuado em banho seco em bloco digestor na temperatura de 100° C durante 20 minutos. Esse procedimento inativa os cistos tornando-os não-infecciosos e inviáveis metabolicamente. Aliquotas contendo $2,5 \times 10^2$, 5×10^3 e 2×10^4 cistos·100µL⁻¹ foram transferidas para microtubos de vidro Agilent Inc., em seguida selados e conduzidos para bloco digestor previamente aquecido a 100° C. Após 20 minutos, removeram-se os microtubos do bloco digestor e estes foram armazenados em refrigerador a 4° C.

As séries contendo cistos estressados em lâmpada UV-C foram conduzidas transferindo-se alíquotas contendo $2,5 \times 10^2$, 5×10^3 e 2×10^4 cistos·100µL⁻¹ para microtubos e posteriormente conduzidos para câmara contendo lâmpada UV@254nm, 15W e intensidade de 1.100 lux pelo período de 1h. Portanto, os organismos foram expostos a dose de 874 mJ·cm⁻². Após o estresse dos organismos, as alíquotas foram armazenadas em refrigerador na temperatura de 4° C.

3.4 Reagentes

3.4.1 Anticorpos monoclonais

A estimativa da quantidade de organismos foi efetuada com base na reação de imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* disponíveis em kit comercial. O kit Merifluor[®] possui: reagente de detecção contendo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) combinados com anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*, permitindo a identificação e a contagem dos cistos em microscopia de fluorescência conforme método EPA 1623.

3.4.2 CFDA-SE Vybrant[®] Invitrogen

A estimulação e marcação dos cistos foram efetuadas com o uso do reagente comercial carboxifluoresceína-succinimidil-diacetato-éster (CFDA-SE) Invitrogen. O kit comercial contém 10 microtubos contendo 500 µg de reagente liofilizado em cada microtubo cuja massa molar é 557,47 g·mol⁻¹.

3.4.3 Preparo do reagente CFDA-SE e ensaios de diluição

Ensaio de diluição com CFDA-SE foram efetuados com o intuito de avaliar a melhor concentração do marcador fluorescente para os ensaios de fluorescência retardada. As soluções foram preparadas transferindo 90 µL de DMSO em 500 µg de CFDA-SE e posterior adição de

910 μL de PBS, totalizando volume de 1,0 mL de uma solução estoque de 1,0 mM. Diluições a partir da solução estoque foram efetuadas nas concentrações de: 0,5 μM , 2,5 μM e 5,0 μM e armazenadas para posterior incubação dos cistos. Cada ensaio de diluição foi desenvolvido com cinco réplicas em 9 séries, totalizando 45 experimentos ($n_B = 45$).

3.4.4 Incubação dos cistos em CFDA-SE

Cistos de *Giardia* foram incubados em CFDA-SE nas soluções estoque. Primeiramente, alíquotas contendo aproximadamente $2,5 \times 10^2$, 5×10^3 e 2×10^4 cistos $\cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ foram transferidas para microtubos e homogeneizadas por 30 segundos em vortex. Posteriormente, CFDA-SE foi adicionado a cada alíquota de organismos na proporção de 1:1 vol./vol. A suspensão foi novamente homogeneizada e o volume total foi transferido para câmara de incubação bacteriológica pelo período de 30 minutos a 37° C.

3.5 Equipamentos

3.5.1 Sistema de fóton-contagem

O sistema de fóton-contagem (PMT-LaFA) projetado consiste de duas câmaras cilíndricas totalmente vedadas para não permitir a entrada de luz externa comunicadas em série, com passagem de fluido pré-aquecido para controle de temperatura. Os dispositivos possuem: anel iluminador para medidas de DL, válvula fotomultiplicadora para fóton-contagem, placa de contagem controlada via USB, controlador de temperatura PID e fonte de alimentação e microcomputador. A câmara utilizada para DF com *Giardia* é referenciada aqui como PMT01.

3.5.2 Válvula fotomultiplicadora

A válvula fotomultiplicadora utilizada nos ensaios de fóton-contagem é do tipo Hamamatsu H7360-01 com ruído de escuro de 20 cps (contagem por segundo), foto-catodo de alta sensibilidade com 22 mm de diâmetro de área eficaz com sensibilidade espectral de luz visível variando de 300 – 650 nm e pico em 375 nm. A tensão de alimentação é fornecida por fonte de alimentação +5V para sua operação controlada via cabo padrão de trocas de dados binários RS-232.

3.5.3 Placa de contagem

A placa de contagem é do tipo Hamamatsu C8855 que recebe pulsos de contagem fornecidos pela válvula fotomultiplicadora – PMT e os integra em intervalos de tempo

disponíveis que podem variar de 50 μ s até 10s. Os dados de contagem são enviados para o microcomputador através da interface “Universal Serial Bus” USB 2.0.

3.5.4 Sistema iluminador para medidas de DL

Para medições de fluorescência retardada, o sistema foi montado com anel iluminador guiado por fibra óptica de alta qualidade (Emund Optics), fixado dentro da câmara escura, posicionado a 20 mm acima do local disponível para amostra. A luz proveniente de fonte externa é fornecida por lâmpada halogênica e guiada pela fibra óptica. Entre o caminho de luz e a câmara de fóton-contagem há um obturador controlado por microcomputador permitindo o total controle da iluminação dentro da câmara. É possível também inserir filtros ópticos para ensaios de DL irradiando a amostra com comprimentos de onda de interesse.

3.5.5 Instrumento virtual e controle computacional

Todas as operações do sistema são controladas por instrumento virtual do tipo LabVIEW. O software permite o controle automático do sistema podendo assim efetuar a aquisição dos dados via placa de contagem, sistema de salvamento de dados automáticos por meio de loops em intervalos de tempo escolhidos manualmente, controle do sistema obturador e a exibição e descrição dos dados ao longo do tempo em curvas do tipo pontos vs fóton-contagem.

3.5.6 Sistema de controle de temperatura

O controle de temperatura consiste de sistema aquecedor comercial Julabo modelo F240, composto por conjunto moto-bomba de recalque e motor de aquecimento. O aquecimento do fluido é efetuado através de resistência tubular microcontrolada com sistema eletrônico conhecido como PID (proporcional integral derivativo), e comunicação via interface RS-232 e circuito eletrônico integrado do tipo LM35.

3.5.7 Sistema de fóton-contagem comercial

Ensaio de fluorescência retardada executados na PMT01 foram comparados com ensaios efetuados em dispositivo de fóton-contagem comercial, modelo Type6100-IR da empresa Hamamatsu Photonics K. K. O sistema é composto de válvula fotomultiplicadora com

sensibilidade no infravermelho do espectro eletromagnético, obturador, placa de contagem, sistema de iluminação integrado e software de aquisição e gerenciamento de dados.

3.5.8 Microscópio de epifluorescência

Microscópio de epifluorescência marca Carl Zeiss® com filtros sensitivos aos marcadores fluorescentes: FITC, Sulforodamina, DAPI e Auramina foram utilizados na análise de fluorescência após incubação com CFDA-SE. O equipamento conta também com módulo DIC com cursor DIC EC PN 5x/0,16; 10x/0,30; 40x/0,65 e 100x/1,30. Polarizador para condensador e módulo analisador DIC ACR para luz transmitida. Objetivas de 5x/0,16; 10x/0,3; 20x/0,5; 40x/0,75 e 100x/1,30. Módulo de excitação com lâmpada halogênica e filtros: EX BP 470/40, BS FT 495, EM BP 525/50; EX G 360/40, BS FT 395, EM BP 445/50; EX BP 572/25, BS FT 590, EM BP 629/62 e EX BP 436/25, BS FT 455, EM BP 480/40. Câmera CCD 5 megapixel acoplada ao microscópio permite a captura de imagens com diferentes tempos de exposição. O software Axio Visio® para tratamento de imagem e gerenciamento da câmera permite o controle automatizado do sistema.

3.6 Medida da Fluorescência Retardada

Após a incubação dos organismos em CFDA-SE, efetuou-se a medida da fluorescência retardada excitando os organismos na PMT01 e posteriormente no Type6100-IR. Com uso de micropipetas os organismos foram transferidos para lâminas de vidro para microscopia, côncavas e com capacidade para 300 µL de amostra.

Na câmara PMT01 os organismos foram excitados com lâmpada halogênica e filtros passa-banda (50 nm de largura) com os seguintes comprimentos de onda e respectiva intensidade média em lux: 375 nm (2,3 lux), 460 nm (120 lux), 582 nm (3070 lux) e luz branca (sem filtro 6950 lux). A excitação dos organismos foi efetuada pelo intervalo de 30 segundos e imediatamente após, efetuou-se a leitura da fóton-contagem no intervalo de aquisição de 100 µs.

Três séries (UV(1), UV(2) e UV(3)), contendo cistos previamente incubados em CFDA-SE foram analisadas com excitação utilizando sistema de iluminação de LED com comprimento de onda de 365 nm. As amostras foram excitadas pelo período de 30 segundos e posteriormente efetuou-se a leitura da DF com intervalo de aquisição de milissegundos.

3.7 Leitura da fluorescência e capturas de imagens em microscópio

Após os ensaios de incubação, as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência com excitação em ~492 nm. Ao longo da análise do comportamento da fluorescência, imagens foram coletadas com câmera CCD Carl Zeiss®. A captura das imagens foi auxiliada com uso de software de captura Axio Visio® selecionando campos aleatoriamente. As imagens foram coletadas utilizando módulo DIC e filtro EX BP 470/40 (~495 nm – FITC), sendo posteriormente justapostas para análise dos padrões de fluorescência proveniente do reagente CFDA-SE.

3.8 Ensaios de viabilidade, infecciosidade e fluorescência retardada – séries Japão

Os ensaios conduzidos no Japão foram realizados sob a supervisão do parasitologista Dr. Shinji Izumiyama do NIID e do biólogo e especialista em biofotônica Dr. Mazakazu Katsumata. Ensaios de viabilidade com marcadores celulares, infecciosidade em modelo animal e fluorescência retardada foram executados com *C. parvum* e *G. intestinalis*, avaliando-se a interatividade desses organismos com os marcadores celulares, correlação dos resultados com infecciosidade em modelo animal e fluorescência retardada. Os testes foram desenvolvidos com uso de três marcadores celulares, sendo eles: CFDA-SE, C12-resazurina e SYTOX Green.

O procedimento experimental estudado no Brasil com CFDA-SE foi reproduzido no NIID, tendo seguido a mesma metodologia descrita nos itens 5.4.3 e 5.4.4. Já os ensaios efetuados com C12-resazurina e SYTOX Green foram conduzidos após prévio preparo de soluções estoque e seguidas diluições seriadas para otimização dos ensaios.

3.8.1 Amostras de *C. parvum*, *G. intestinalis* e *Giardia* ssp.

Amostras de *C. parvum* (Iowa – isolados de bezerras) e *G. intestinalis* (H3 –isolados de gerbilos) foram adquiridas na WaterBorne Inc., catálogo: P102C@1x10⁶ e P101@1x10⁶, respectivamente. As cepas são comercializadas vivas contendo 1x10⁶ (oo)cistos em 4,0 mL em PBS e antibióticos: penicilina, gentamicina e estreptomicina, além de 0,01% de Tween 20.

Suspensões purificadas de *Giardia* sp. (A157 Japanese isolate) contendo 3x10⁵·200μL⁻¹ cistos e 7,3x10⁶ oocistos·mL⁻¹ de *C. parvum* (H8 Japanese isolate) foram analisadas e

comparadas com os ensaios conduzidos com as amostras WaterBorne Inc. Esses organismos foram isolados e purificados a partir de fezes dos modelos animais do NIID utilizando-se centrifugo-concentração e precipitação com cloreto de cério. Os organismos são cultivados rotineiramente no NIID, sendo considerados infecciosos e viáveis.

3.8.2 Ensaios de infecciosidade em modelo animal

A infecciosidade do *Cryptosporidium* e da *Giardia* foi analisada através de testes em modelos animais disponíveis no NIID. Foram utilizados gerbilos e camundongos para a incubação dos (oo)cistos. Um mililitro de cada suspensão purificada (WaterBorne) foi centrifugado duas vezes na velocidade de 7.000 rpm e o sobrenadante removido cuidadosamente até o volume final de 50 µL. Este procedimento foi efetuado para remover os antibióticos presentes na suspensão comercial.

Gerbilos com cinco semanas de idade (MON/Jms/GbsSlc) e camundongos com seis semanas de idade (C.B-17/Icr-scid/scidJcl), foram utilizados nos testes de infecciosidade de *Giardia* e *Cryptosporidium*. Três camundongos e três gerbilos foram inoculados oralmente (gavagem) com 15 µL de suspensão e sacarose 5%. Após 20 dias as fezes foram coletadas, purificadas e visualizadas em microscopia de epifluorescência.

3.8.3 Grupos de organismos

Os ensaios foram conduzidos com grupos de organismos vivos e infecciosos e grupos mortos. Aliquotas contendo 1×10^4 e 1×10^5 (oo)cistos foram preparadas e transferidas para microtubos. Posteriormente, os (oo)cistos foram conduzidos para bloco termociclador onde foram mortos a 98° C durante 5 minutos. Os grupos de (oo)cistos vivos são referenciados com gL e cL. Já os grupos mortos são descritos como gl e cl. Aliquotas contendo 1×10^4 e 1×10^5 (oo)cistos foram preparadas em triplicatas e testadas em 8 séries, totalizando 24 ensaios ($n_j = 24$).

3.8.4 Preparo dos reagentes C12-resazurina e SYTOX Green

O kit comercial contendo C12-resazurina e SYTOX Green é vendido como LIVE/DEAD® vitality staining kit contendo 5 microtubos com 40 µg de C12-resazurina e um microtubo contendo 100 µL de SYTOX Green 10 µM.

Solução de 1 mM de C12-resazurina foi preparada transferindo-se 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) ao conteúdo do microtubo (40 µg). Posteriormente, diluições foram efetuadas

até a solução estoque de 100 μM e armazenadas em câmara fria a -30°C envoltos em papel alumínio protegendo-os da luz.

Diluições a partir da solução comercial de SYTOX Green 10 μM foram efetuadas até atingir a solução estoque de 2 mM. Em seguida as soluções foram armazenadas em microtubos em câmara fria a -30°C protegidos da luz para posterior execução dos ensaios.

Séries com 10, 50 e 100 nM de SYTOX Green; 0,5 μM , 1,0 μM e 5,0 μM de C12-resazurina foram utilizadas na análise do comportamento da fluorescência após 30 minutos de incubação a 37°C . Os ensaios foram otimizados para melhorar a concentração dos marcadores e, posteriormente, analisá-las via DF.

3.8.5 Incubação dos (oo)cistos em C12-resazurina e SYTOX Green

Alíquotas contendo 1×10^4 e 1×10^5 (oo)cistos foram previamente preparadas para a execução dos ensaios de diluição com os marcadores celulares. Posteriormente, calcularam-se os fatores de diluição a partir da solução estoque de C12-resazurina e SYTOX Green de forma que transferindo-se 2,0 μL C12-resazurina e 2,0 μL de SYTOX Green às alíquotas, resultou-se em uma suspensão nas concentrações em estudo. Em seguida, as alíquotas foram conduzidas para câmara de incubação bacteriológica pelo período de 30 minutos a 37°C .

3.8.6 Fluorescência Retardada em dispositivo de fóton-contagem - DF

Testes com fluorescência retardada após incubação em CFDA-SE, C12-resazurina e SYTOX Green foram realizados em dispositivo de fóton contagem fornecido pela Hamamatsu Photonics K. K. O dispositivo conta com câmara escura com válvula fotomultiplicadora sensível no espectro visível e com capacidade de contagem em “*high speed mode*” em cp10ms .

Os grupos foram divididos em: *Giardia* e *Cryptosporidium* vivos (gL e cL) e *Giardia* e *Cryptosporidium* mortos (g1 e c1). Alíquotas contendo 1×10^4 e 1×10^5 (oo)cistos após incubação com os marcadores foram transferidas para lâminas para microscopia côncavas e com capacidade de 100 μL . Em seguida, o sistema de fóton-contagem foi acionado após 60 segundos excitação com luz branca.

3.8.7 Leitura da fluorescência em microscópio

Após os ensaios de fluorescência retardada as lâminas contendo os (oo)cistos foram analisadas em microscópio de epifluorescência Carl Zeiss® com filtros passa banda e módulo de excitação com lâmpada de mercúrio. Capturas de imagens foram efetuadas com câmera CCD Sony® e uso de filtros com espectros semelhantes ao FITC (~495 nm de excitação) e TRITC (~530 nm de excitação). Capturas adicionais foram efetuadas com módulo DIC. Três capturas aleatórias foram efetuadas nos testes com CFDA-SE (~495 nm de excitação). As capturas de imagens dos testes com C12-resazurina e SYTOX Green foram efetuadas utilizando filtros sensíveis ao FITC (~495 nm) e TRITC (~530 nm). As imagens foram coletadas com 48 bits de resolução e convertidas em software livre ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

3.9 Análise dos dados

Os dados de fóton-contagem foram analisados com base no decaimento da fluorescência retardada, soma, média e desvio padrão das taxas de fóton-contagem. As capturas das imagens foram justapostas em software aberto GIMP e os quadros (FITC ~490 nm) + DIC foram justapostos para análise dos ensaios com CFDA-SE. Já os testes efetuados com C12-resazurina e SYTOX Green foram analisados com imagens justapostas com os filtros (FITC ~495 nm) + (TRITC ~530 nm) + módulo DIC. Posteriormente, os (oo)cistos foram contados distinguindo-se (oo)cistos marcados daqueles não marcados. A análise da marcação celular em função da idade dos (oo)cistos foi efetuada medindo-se a percentagem de (oo)cistos marcados em cada teste efetuado.

3.10 Cinética de decaimento luminescente

Os dados de fóton-contagem foram analisados com base no ajuste não-linear proveniente de dois modelos matemáticos: Boltzman Fitting Decay (ORIGINLAB, 2014a) e Exponential Fitting Decay (ORIGINLAB, 2014b) ambos descritos nas equações (1) e (2), respectivamente.

$$y = p_2 + \frac{p_1 - p_2}{1 + e^{t/dt}} \quad (1)$$

Equação (1) - Boltzman Fitting Decay, onde: p_1 refere-se ao valor inicial, p_2 ao valor final, t o tempo (s) e dt é a constante temporal de decaimento;

$$y = A_1 \cdot e^{-t/k_1} + A_2 \cdot e^{-t/k_2} \quad (2)$$

Equação (2) - Exponential Fitting Decay, onde A_1 e A_2 são amplitudes do decaimento luminescente. k_1 e k_2 são constantes de decaimento exponencial e t o tempo medido em segundos.

3.11 Análise dos dados de Fóton-contagem

Cada ensaio de DF foi analisado com cinco repetições de DF, avaliando-se a estabilidade da excitação eletromagnética. Cada série estudada possui cinco réplicas dos testes conduzidos com os grupos cL, cl, gL, g0, g1, g2, e gf. No total foram efetuados 195 experimentos de DF nas séries Brasil sendo: 45 ensaios com $2,5 \times 10^2$ cistos $\cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ ($n_1 = 45$), 75 ensaios com 5×10^3 cistos $\cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ ($n_2 = 75$) e 75 ensaios com 2×10^4 cistos $\cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ ($n_3 = 75$). As séries Japão foram conduzidas com 24 experimentos ($n_j = 24$), contendo 1×10^4 e 1×10^5 (oo)cistos.

Os ensaios de DF são analisados em função da quantidade de organismos e o comprimento de onda de excitação. Os experimentos estão agrupados em séries com excitação com luz branca na PMT01 (séries A – E). Testes com luz UV – 365 nm de excitação estão descritos nas séries (UV(1), UV(2) e UV(3)).

Os dados de fóton-contagem foram analisados em seu parâmetro temporal expressos em fóton-contagem por intervalo de tempo de aquisição. Os ensaios conduzidos na PMT01, com excitação utilizando lâmpada halogênica, são expressos em fóton-contagem por 100 μs (cp100 μs). Os testes efetuados com LED-UV são descritos como fóton-contagem por milissegundos (cpms). Já os ensaios conduzidos no dispositivo comercial Type6100-IR estão descritos como contagem a cada 10 milissegundos (cp10ms).

Análises estatísticas foram efetuadas com base na frequência de contagem expressos em percentagem de ocorrência, média e desvio padrão das amostragens. Medidas de decaimento luminescente foram avaliadas com parâmetro temporal e modelos matemáticos com base na constante de decaimento luminescente após a excitação. Todos os tratamentos matemáticos foram efetuados com o uso de software matemático Origin Pro 8.6.

Testes de distribuição, análise de Gauss, análise de variância com ANOVA “one way” e Tukey foram aplicados aos ensaios de DF. Avaliou-se se os grupos apresentavam médias significativamente diferentes com intervalo de confiança $\alpha = 0,05$.

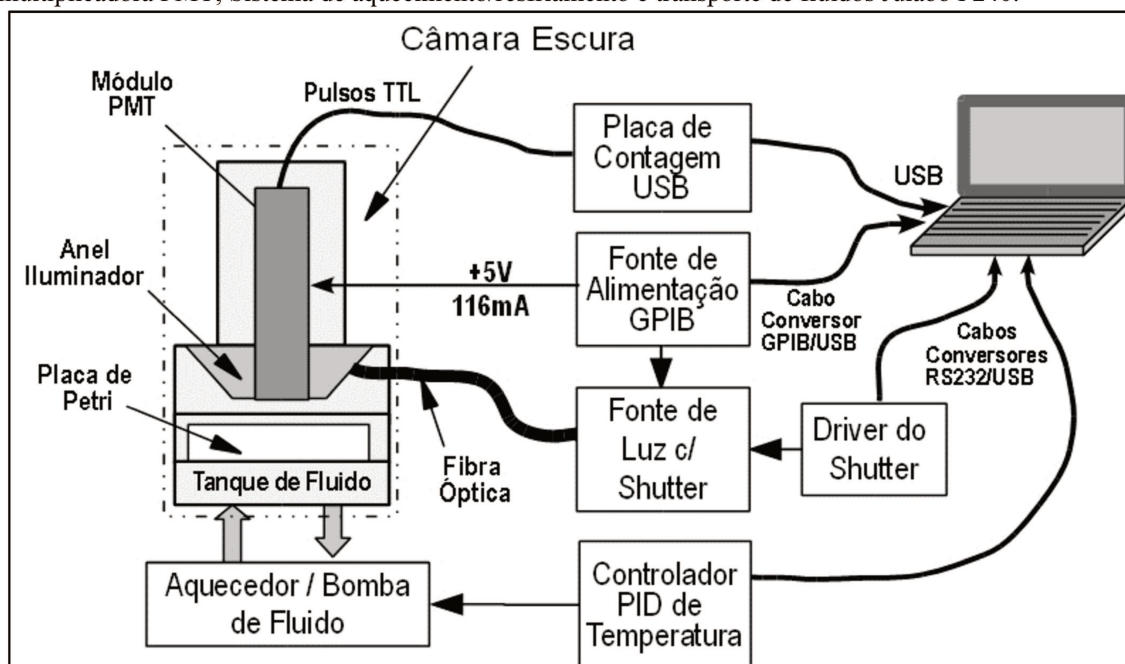
4 Resultados

4.1 Construção de câmara de fóton-contagem

A construção do dispositivo de fóton-contagem foi executada com base em princípios de estabilidade de ruído de escuro, proximidade entre a válvula de fóton-contagem e a amostra biológica e estabilidade no controle de temperatura.

Na Figura 5 é apresentado diagrama de blocos do sistema completo incluindo uma câmara escura, dispositivos eletrônicos associados, válvula de fóton-contagem PMT e gerenciamento de dados através de interface computacional. Nele está descrito também o fluxograma de funcionamento do sistema composto de: câmara escura com válvula fotomultiplicadora acoplada, reservatório para fluxo de fluido pré-aquecido, placa de contagem controlada via USB, fonte de alimentação GPIB, anel iluminador com obturador, drive controlador do obturador, fibra óptica, cabos conversores GPIB/USB e RS232/USB e microcomputador para aquisição de dados.

Figura 5 – Diagrama de blocos do sistema de fóton-contagem projetado composto de: Fonte de Corrente Contínua (CC) com interface “General-Purpose Instrumentation Bus (GPIB)”; Controlador de temperatura proporcional integral derivativo PID; cabo de fibra óptica, fonte luminosa com lâmpada halogênica, obturador (shutter) e disco para filtros ópticos; Sistema controlador do obturador (shutter driver’); Câmara escura com válvula fotomultiplicadora PMT; Sistema de aquecimento/resfriamento e transporte de fluidos Julabo F240.

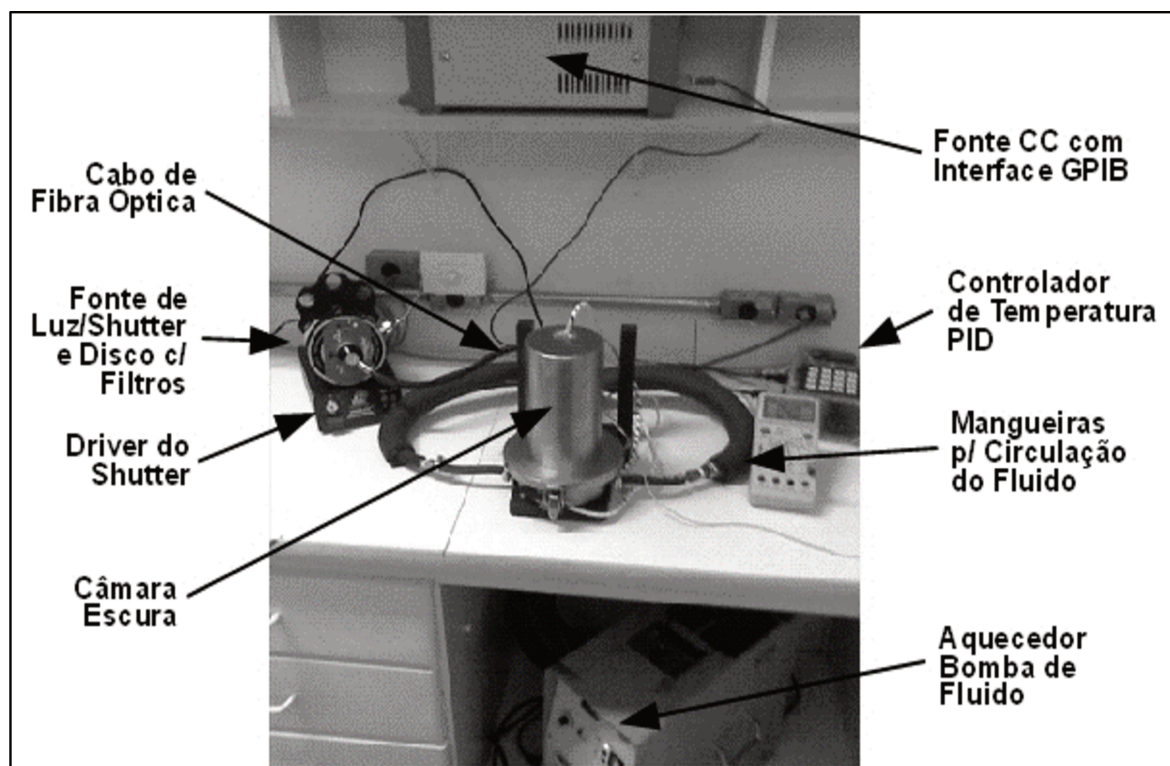


Fonte – Bertogna (2013).

O funcionamento do sistema é permitido através de: (1) alimentação do sistema de fóton-contagem com fonte de corrente contínua onde a válvula fotomultiplicadora PMT é alimentada com +5V e 116 mA; (2) a contagem dos fótons emitidos pela amostra é efetuado pela placa de contagem que, por sua vez, é gerenciada via computador através de interface USB; (3) o controlador PID exerce o controle da temperatura, mantendo esta constante e estável ao longo do experimento; (4) fonte de luz externa é utilizada para a excitação de amostras para a realização de ensaios com luminescência retardada (DL); (5) interface usuário-computador gerenciadora de todo sistema através de software Labview.

Na Figura 6 está ilustrado o sistema físico real contendo os blocos que constituem o diagrama descrito na Figura 5, exceto a placa de contagem e o microcomputador. É possível visualizar também a fonte de alimentação bem como o sistema de controle de temperatura Julabo modelo F240.

Figura 6 – Fotografia do sistema de fóton-contagem e acessórios periféricos auxiliares.



Fonte – Bertogna (2013).

O sistema projetado apresenta melhores acondicionamentos por conta de sua pequena dimensão em comparação ao sistema outrora disponível no laboratório (GALLEP; SANTOS; CONFORTI, 2005). A nova câmara aqui projetada ocupa pouco espaço na bancada permitindo

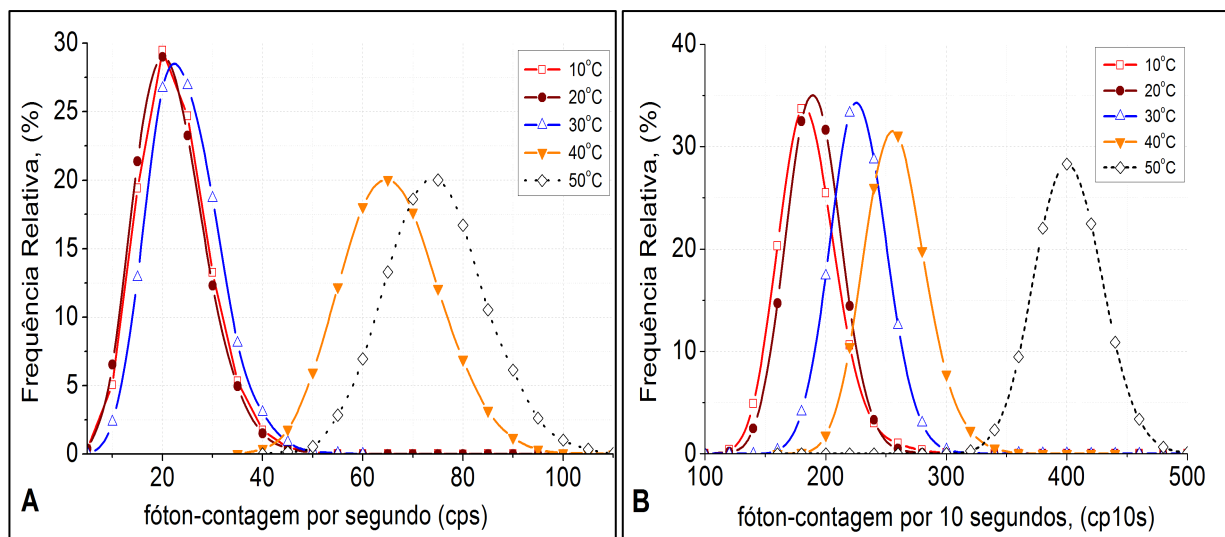
que vários módulos possam ser desenvolvidos e aproveitados para diversos experimentos. No Apêndice (1) descrevem-se os detalhes construtivos do sistema apresentado.

4.2 Ensaios com ruído de escuro

A avaliação do desempenho bem como a estabilidade do sistema de fóton-contagem foi efetuada através de medidas de ruído de escuro em diferentes faixas de temperatura. O dispositivo fóton-sensível apresenta naturalmente taxa de fóton-contagem com comportamentos estáveis ao longo do tempo. Esta taxa é referenciada como ruído de escuro da câmara vazia. As taxas de ruído de escuro podem variar em função de diversos fatores, dentre eles, o mais importante é a temperatura que pode influenciar diretamente no comportamento da válvula fotomultiplicadora, chegando a produzir a elevação das taxas de ruído em ordem exponencial.

Nas Figuras 7(A) e 7(B) destacam-se os parâmetros estatísticos dos padrões do ruído da câmara com base frequência de contagem. Na Figura 7(A) é apresentado o perfil típico do ruído de escuro para diferentes faixas de temperatura e tempo de aquisição a cada segundo.

Figura 7 – Frequência de fóton-contagem para testes de ruído de escuro com temperatura variando entre 10 e 50° C: (A) frequência relativa para contagem por segundo (cps); (B) frequência relativa para contagem por 10 segundos cp10s.



Fonte – Bertogna (2013).

O aumento da temperatura é acompanhado pelo aumento nas taxas de ruído. Em média as taxas de ruído de escuro ficaram em torno de 20 cps para ensaios com temperaturas de 10 e 20° C. A elevação da temperatura para 30° C foi acompanhada pela elevação nas taxas para

25 cps mas com estabilidade da válvula fotomultiplicadora. Já para as temperaturas de 40 e 50° C as incidências médias foram de 65 e 75 cps, respectivamente.

Ao alterar o tempo de aquisição de dados para intervalos de 10s observou-se a elevação nas taxas de ruído de escuro. No entanto, essa elevação foi proporcional ao tempo de aquisição, sendo estáveis mesmo para longos períodos de observação. Para temperaturas de 10 e 20° C as taxas foram de 180 cp10s (contagem por 10s). Já para temperaturas de 30, 40 e 50° C essas taxas aumentam acima de 200 cp10s com pico máximo de 400 cp10s para temperatura de 50° C. Os dados demonstram que a câmara de fóton-contagem apresenta melhores comportamentos para ensaios com 20° C. Essa temperatura foi adotada nos ensaios com fluorescência retardada.

4.3 Experimentos *G. intestinalis*, *Giardia* sp. e *C. parvum* série NIID Japão

Os ensaios efetuados no NIID permitiram traçar o perfil de interatividade dos (oo)cistos com os marcadores celulares CFDA-SE, C12-resazurina e SYTOX Green. Esses perfis foram correlacionados com a infecciosidade dos organismos em testes efetuados com modelos animais.

A purificação de 3×10^5 cistos·200 μ L⁻¹ e $7,3 \times 10^6$ oocistos·mL⁻¹ (isolados H8), revelaram que os organismos estavam viáveis e infecciosos, uma vez que foram purificados a partir de fezes recém-eliminadas pelos hospedeiros. Após 20 dias de incubação foram recuperados $8,9 \times 10^5$ cistos·500 μ L⁻¹ (isolado H3) e $1,3 \times 10^5$ cistos·200 μ L⁻¹ (isolado A157). Portanto, *Giardia* isolado H3, *Giardia* A157 e *Cryptosporidium* H8 eram viáveis e infecciosos.

4.3.1 Idade dos organismos

Os ensaios efetuados com C12-resazurina e SYTOX Green foram desenvolvidos com cistos apresentando 16, 17, 18 e 31 dias de idade. Os (oo)cistos da coleção NIID foram avaliados com idade variando entre 2 e 20 dias. Já *Cryptosporidium* (isolados Iowa) foram analisados com: 75, 76, 77 e 90 dias de idade.

Testes com CFDA-SE foram efetuados com cepa *Giardia* isolado H3 com cistos apresentando 8, 28, 29, 30 e 32 dias de idade. Os oocistos (isolados Iowa) foram incubados com 67, 87, 88, 89 e 91 dias de idade.

4.3.2 Ensaios de viabilidade C12-resazurina e SYTOX Green

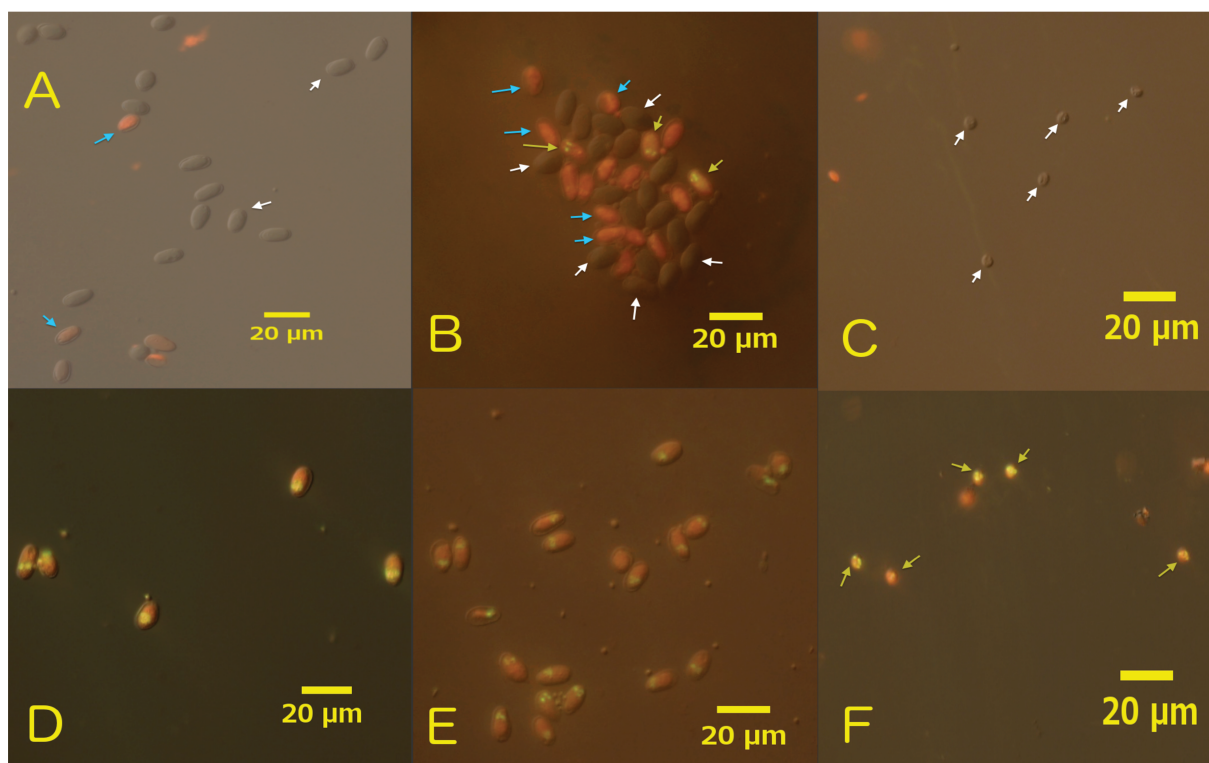
Os ensaios de diluição e incubação em C12-Resazurina e SYTOX Green, demonstram que a melhor concentração encontrada para visualização em microscópio foi de 5,0 μ M para C12-

resazurina e 100 nM para SYTOX Green. (Oo)cistos foram observados com excitação em ~495 nm e ~530 nm cujo tempo de exposição variou de 100 a 1000 ms.

Cistos e oocistos vivos não apresentam interatividade com C12-resazurina nem com SYTOX Green. Já os testes efetuados com grupos g1 e c1 demonstram que os organismos quando estão mortos apresentam dupla marcação com os reagentes C12 e SYTOX (Figura 8).

A análise do comportamento da *Giardia* quando incubada com C12 e SYTOX revela que à medida que os cistos envelhecem, estes apresentam elevação nas taxas de marcação com o C12. Além do mais, apenas cistos mortos são marcados pelo SYTOX Green.

Figura 8 – Exemplos de marcação celular após incubação em C12-resazurina 5,0 μ M e SYTOX Green 100 nM. Quadros (A) e (B) cistos com 17 e 32 dias de idade parcialmente marcados com C12-resazurina e/ou SYTOX Green. Quadro (C) apresenta oocistos com 76 dias de idade sem marcação celular. (D) e (E) apresentam cistos de *G. intestinalis* mortos a 98°C/5min duplamente marcados com C12 e SYTOX. (F) oocistos de *C. parvum* mortos a 98°C/5min duplamente marcados com C12 e SYTOX. Imagens justapostas a partir de capturas efetuadas após excitação com ~492 nm, ~530 nm e módulo DIC. Setas indicadoras em azul apresentam cistos marcados com C12-resazurina; setas indicadoras em amarelo, exemplos (oo)cistos duplamente marcados com C12-resazurina e SYTOX Green; setas indicadoras em branco apresentam exemplos de (oo)cistos não marcados com os reagentes.



Fonte – Arquivo pessoal.

Oocistos apresentam comportamento semelhante ao da *Giardia* sendo marcados apenas os organismos mortos. A marcação é dupla podendo ser observada a fluorescência após excitação com ~495 nm e ~530 nm. O SYTOX Green apresenta afinidade pelos núcleos dos (oo)cistos,

permitindo assim a visualização destes quando analisados após ~530 nm de excitação (Figura 8E).

Após 32 dias de idade a amostra de *Giardia* H3 apresentou cistos morrendo com variação na marcação celular. Após a incubação, observou-se na mesma amostra a ocorrência de cistos marcados apenas com C12-resazurina, cistos duplamente marcados com C12 e SYTOX e cistos sem nenhuma marcação dos reagentes. Esses dados podem ser observados na Figura 8(B).

Oocistos de *C. parvum* quando analisados não apresentaram esse comportamento mesmo para grupos com mais de 90 dias de idade. Esse comportamento está associado à maior resistência e robustez do *Cryptosporidium* quando comparado com *Giardia* (KOTHAVADE, 2012). Esses resultados demonstram a capacidade de avaliar o comportamento desses organismos do ponto de vista de idade. Analisando a Figura 8 é possível observar claramente que a marcação com o reagente é afetada pelo envelhecimento dos organismos.

Iturriaga et al. (2001) observaram também que a interatividade da *Giardia* com PI e FDA varia de acordo com a idade do organismo. Aqueles autores reportaram que em 21 dias a permeabilidade da membrana é aumentada sendo assim possível a marcação dos cistos.

4.3.3 Ensaios de viabilidade CFDA-SE

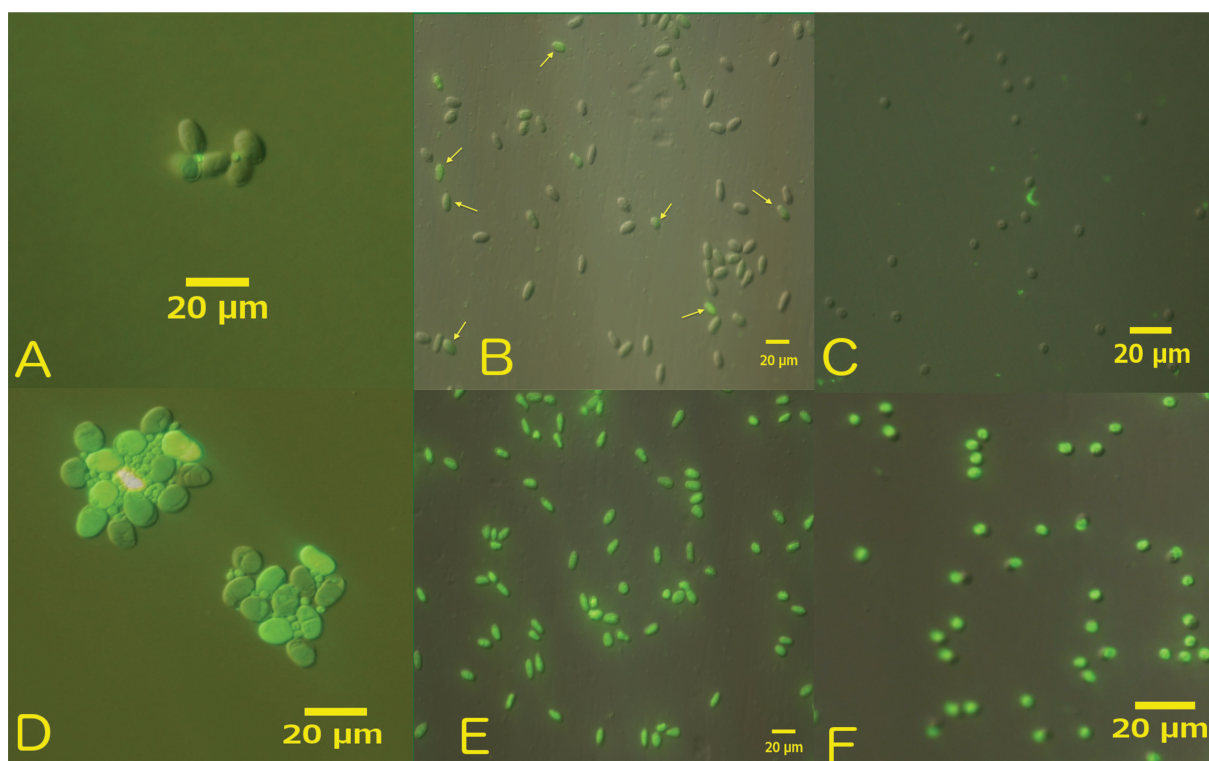
A otimização dos experimentos demonstrou que a melhor concentração para incubação é de 5,0 μ M. Nesta concentração, a taxa de exposição para visualização dos (oo)cistos em microscópio de epifluorescência variou de 500 a 2000 ms para *Cryptosporidium* e 160 ms para *Giardia* após excitação com ~492 nm.

Após 30 dias de idade os cistos começam a morrer e perdem atividade metabólica. A parede celular torna-se mais permeável ao CFDA-SE e permite a entrada deste, marcando o citoplasma do organismo. Como consequência, o grupo gL apresentou fluorescência verde brilhante quando incubado com CFDA-SE 5,0 μ M. Foi observado que aos 30 dias de idade, aproximadamente, 50% dos cistos nas amostras apresentaram marcação com o reagente.

Na Figura 9 está descrito o comportamento da *G. intestinalis* e do *C. parvum* após incubação em CFDA-SE 5,0 μ M. As capturas foram efetuadas aleatoriamente em lâminas analisadas imediatamente após os ensaios com fluorescência retardada. Os dados são também analisados em função da idade dos organismos.

Cryptosporidium apresentou o mesmo comportamento observado com *G. intestinalis*, onde oocistos vivos não apresentaram fluorescência após incubação com CFDA-SE 5,0 μ M. Já os oocistos mortos apresentaram fluorescência com citoplasma totalmente preenchido e marcado pelo CFDA-SE. No entanto, *Cryptosporidium* apresentou maior resistência quando comparado com *G. intestinalis*. Mesmo após 90 dias de idade, os oocistos vivos não apresentaram interatividade com o reagente (Figura 9C).

Figura 9 – Comportamentos de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* após incubação com CFDA-SE 5,0 μ M. Quadro (A) cistos de *Giardia* vivos e infecciosos com 8 dias de idade não marcados. (B) cistos com 30 dias de idade parcialmente marcados. (C) oocistos de *C. parvum* vivos e infecciosos com 90 dias de idade sem marcação celular. (D), (E) e (F) cistos e oocistos mortos a 98°C/5min totalmente marcados com CFDA-SE. Imagens justapostas a partir de capturas após excitação com ~492 nm e módulo DIC.



Fonte – Arquivo pessoal.

Os resultados obtidos com *Cryptosporidium* diferem daqueles apresentados por Scheid e Schwarzenberger (2011). De acordo com aqueles autores, “CFDA-SE é um marcador não-fluorescente que se difunde passivamente pelo citoplasma e, uma vez dentro deste apresenta fluorescência em função de reações de esterases. Trata-se portanto de uma reação enzimática altamente reativa e indicadora de viabilidade de organismos” (SCHEID; SCHWARZENBERGER, 2011). Contudo, os resultados descritos nos quadros (C) e (F) da Figura 9 evidenciam que oocistos vivos e infecciosos não são marcados pelo CFDA-SE. Portanto,

um resultado positivo para CFDA-SE não é indicativo de viabilidade nem para *C. parvum* nem para *G. intestinalis*.

4.3.4 Ensaios de Fluorescência Retardada

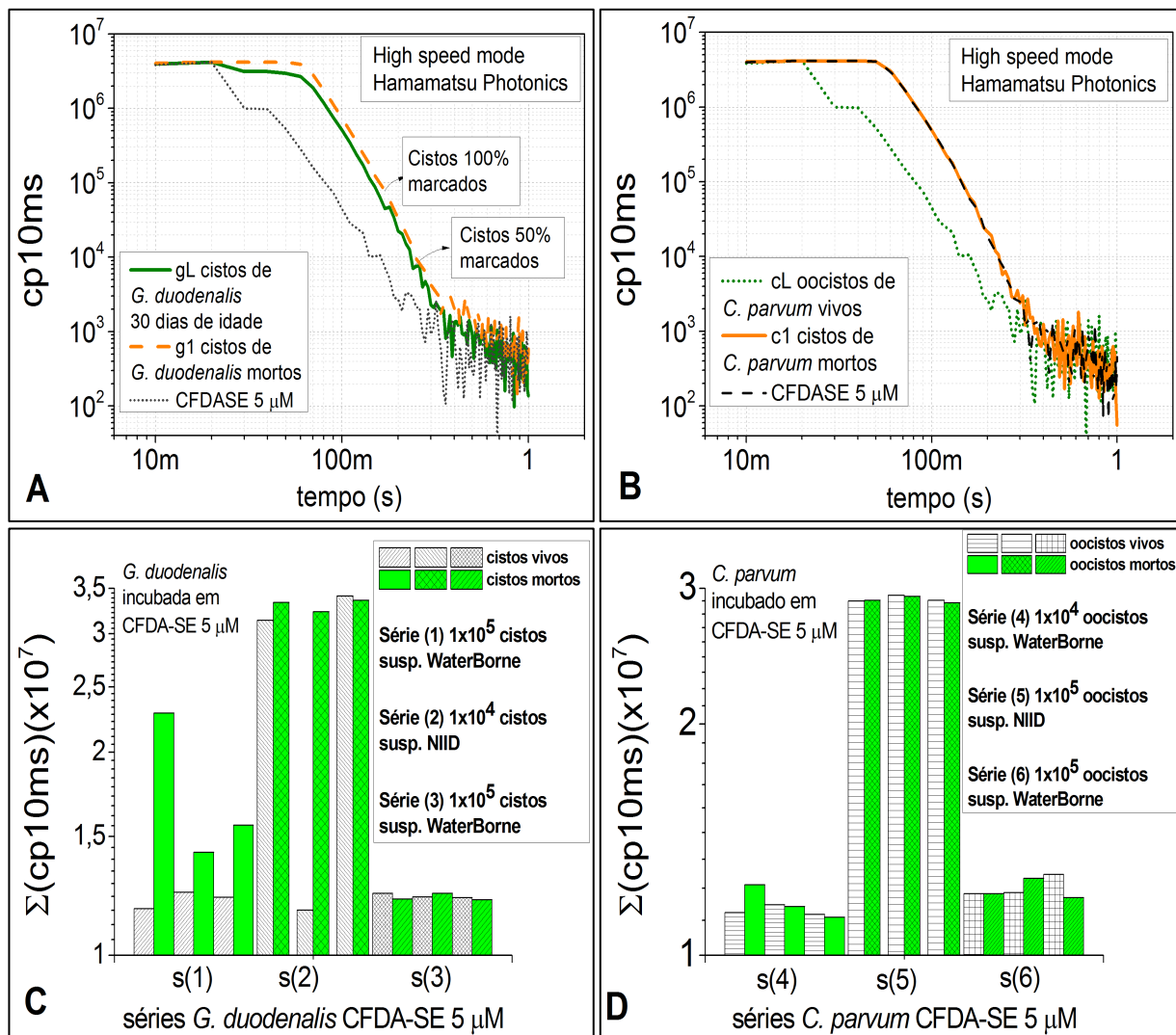
Testes efetuados com equipamento comercial Type6100-VIS em “*high-speed mode*” permitiram a detecção de diferentes sinais apenas com testes conduzidos com 1×10^5 cistos incubados em CFDA-SE. O dispositivo não apresentou sensibilidade satisfatória para detecção da fluorescência retardada. Esse fato está associado à sensibilidade deste equipamento apenas na banda do visível. Contudo, foi possível detectar o aumento na intensidade da DF quando do aumento da marcação do grupo gL. Apenas os ensaios com *G. intestinalis* permitiram a diferenciação entre os grupos gL e gI com diferentes intensidades de DF.

Nas Figuras 10(A) e 10(B) são apresentados os perfis de decaimento da fluorescência retardada após 60 segundos de excitação com luz branca. O envelhecimento da amostra foi acompanhado pelo aumento da marcação com o CFDA-SE e alteração nos perfis de DF. Amostra contendo 1×10^5 cistos e 30 dias de idade apresentou marcação de aproximadamente de 50% dos organismos. As taxas de fóton-contagem para essa série ficou abaixo dos cistos mortos e totalmente marcados com CFDA-SE. O aumento da marcação de 30 para 50% foi acompanhado pelo aumento das taxas de fóton-contagem e elevação no total de fóton-contagem ($\Sigma(\text{cp10ms})$).

Como podem ser observados na Figura 10(C) cistos mortos apresentam intensidade levemente superior na $\Sigma(\text{cp10ms})$ quando comparados com os cistos vivos (série s(1) e s(2)). Ao passo que à medida que a amostra envelhece observa-se a elevação no $\Sigma(\text{cp10ms})$ para o grupo gL tendendo a igualar os valores de $\Sigma(\text{cp10ms})$ do grupo gI (série s(3)).

Outro aspecto observado é que a amostra japonesa apresentou o dobro do total de contagens. Esse fato pode estar associado com a idade dos organismos em comparação a amostra WaterBorne, uma semana mais velha que a amostra NIID.

Figura 10 – Fluorescência retardada em cistos de *G. intestinalis* e oocistos de *C. parvum*: (A) e (B) descrevem curvas de decaimento para 1×10^4 e 1×10^5 cistos. (C) e (D) apresentam histogramas de Σ DF das séries NIID Japão.



Fonte – Arquivo pessoal.

4.4 Experimentos *G. intestinalis* – séries Brasil

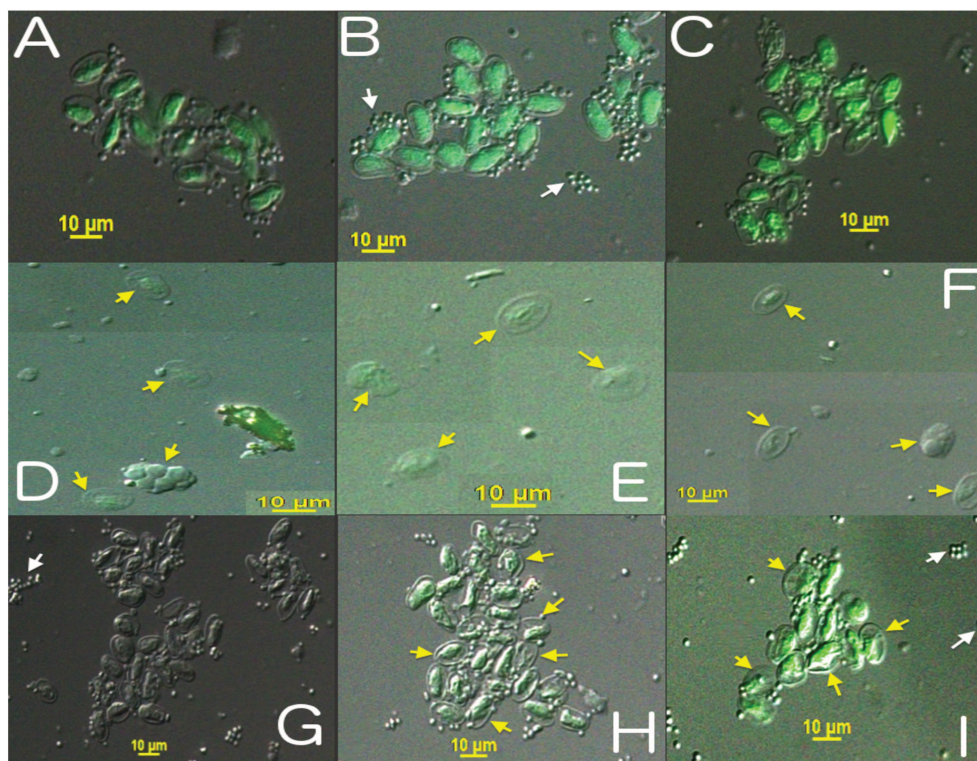
No Brasil, as séries foram efetuadas com suspensões purificadas de *G. intestinalis*, isolados H3 adquiridas comercialmente da empresa WaterBorne Inc. Esses organismos foram analisados com idades superiores a 30 dias em diferentes séries experimentais com excitação com diferentes comprimentos de onda. Os melhores resultados foram obtidos com excitação com luz branca e estão descritos nas séries A – E.

As séries UV(1), UV(2) e UV(3), permitiram traçar o perfil de variação no decaimento na fluorescência retardada em função da idade do organismo nos cistos com idade entre 15 e 50 dias.

Os experimentos efetuados com CFDA-SE no Brasil, apresentaram os mesmos resultados que aqueles obtidos no Japão, ou seja, cistos vivos não foram marcados com o reagente. No entanto, os testes efetuados com DF apresentaram resultados diferentes pois os dispositivos utilizados no Brasil possuem espectro de sensibilidade diferente da câmara de fóton-contagem utilizada no Japão.

O perfil de fluorescência em função da concentração após incubação em CFDA-SE está descrito na Figura 11. A concentração do reagente interfere na intensidade da fluorescência e consequentemente na captura de imagens.

Figura 11 – Comportamento de *G. intestinalis* após incubação em CFDA-SE. Quadros (A), (B) e (C) descrevem o comportamento de cistos com idades superiores a 30 dias incubados em CFDA-SE nas concentrações de 0,5; 2,5 e 5,0 μM , respectivamente. Quadros (D), (E) e (F) apresentam cistos mortos a 100°C/20min incubados em CFDA-SE nas concentrações de 0,5; 2,5 e 5,0 μM , respectivamente. Quadros (G), (H) e (I) descrevem o comportamento de cistos estressados em luz UV 254 nm, 15W durante 1h e posteriormente incubados em CFDA-SE nas concentrações de 0,5; 2,5 e 5,0 μM , respectivamente. Capturas efetuadas após excitação com ~ 492 nm e justapostas após captura com módulo DIC. Setas indicadoras em amarelo apresentam exemplos de cistos com severas alterações na morfologia. Setas em branco indicam a ocorrência de bactérias nas amostras não marcadas com CFDA-SE.

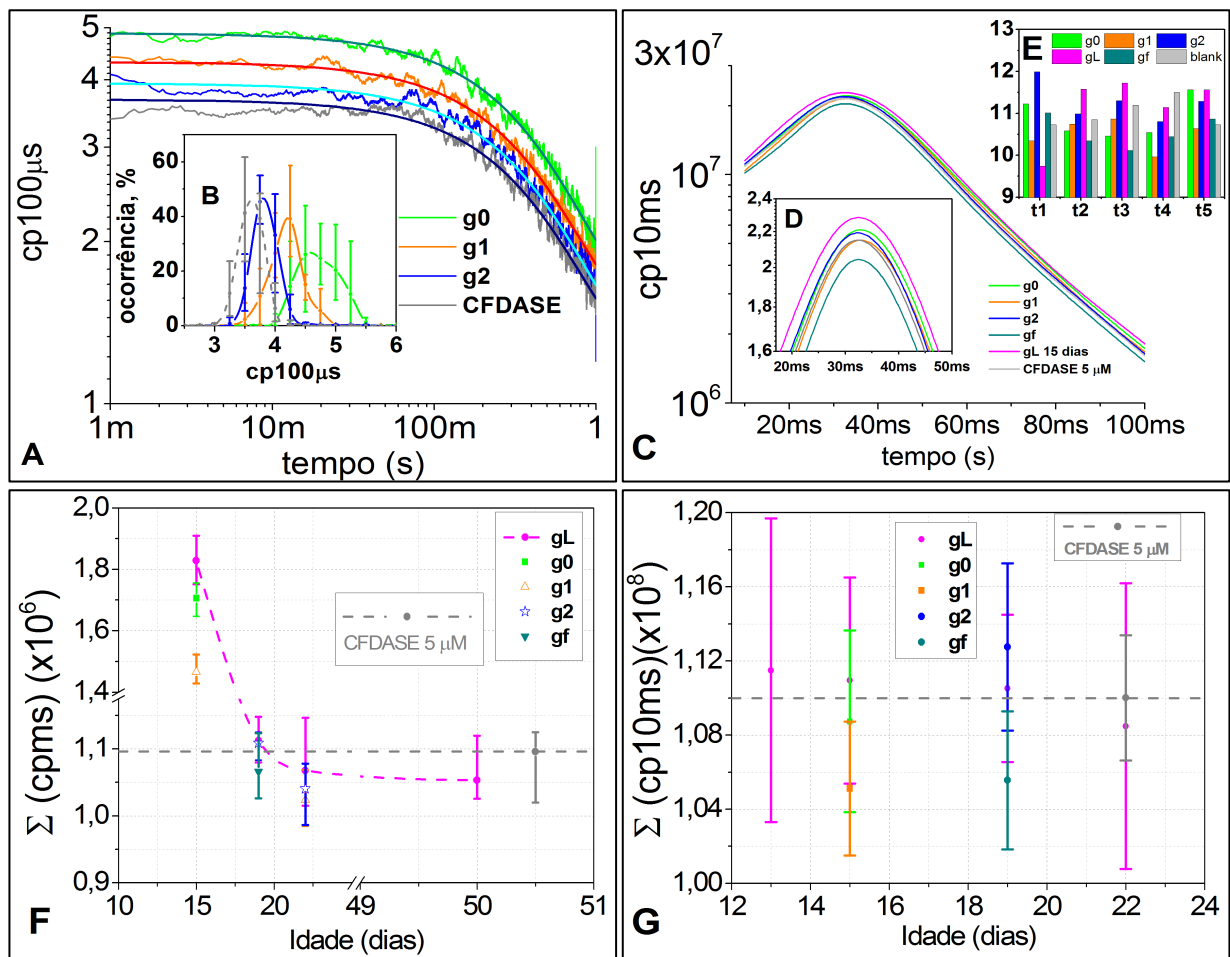


Fonte – Arquivo pessoal.

Concentrações menores exigiram tempos de exposição acima de 1000 ms ao passo que na concentração de 5,0 μM o tempo médio de exposição foi de 500 ms. Evanescência do marcador foi observada principalmente nos ensaios com o grupo g1. Novamente, 5,0 μM foi a melhor concentração obtida nos ensaios de diluição com CFDA-SE. Essa concentração foi utilizada nos ensaios de fluorescência retardada.

Nas Figuras 12(A) até 12(G) descrevem-se os perfis típicos de decaimento da fluorescência retardada em câmara de fóton-contagem projetada e em dispositivo comercial Type6100-IR. Os resultados obtidos demonstram que o perfil de DF muda com a idade dos cistos, estes por sua vez diferem de grupos estressados e mortos.

Figura 12 – Fluorescência retardada em cistos de *G. intestinalis*: (A) curva típica de decaimento em cistos após excitação com luz branca 6970 lux ($\text{cp}100\mu\text{s}$). (B) curvas de ocorrências de fóton-contagem para os primeiros 100 ms de decaimento. (C) curvas de fluorescência retardada em dispositivo comercial Type6100-IR ($\text{cp}10\text{ms}$). (D) ampliação das curvas de DF para os primeiros 60 ms de decaimento. (E) exemplo da $\Sigma\text{DF}(\times 10^7)$ para 5 testes. (F) análise da variação da $\Sigma\text{DF}(\times 10^6)$ em função da idade dos cistos após excitação com luz UV@365nm na câmara PMT01. (G) análise da variação da $\Sigma\text{DF}(\times 10^8)$ em ensaios com dispositivo comercial.



Fonte – Arquivo pessoal.

Aos 15 dias de idade o grupo gL apresentou ΣDF superior aos demais grupos testados. Após uma semana a ΣDF decaiu em intensidade ficando abaixo do nível de ruído do CFDA-SE, mas acima dos demais grupos. Já aos 50 dias de idade a ΣDF apresentou intensidades semelhantes às observadas aos 22 dias de idade. Esses resultados assemelham-se com os reportados por Itaurriaga et al. (2001). Aqueles autores descreveram que a autofluorescência da *Giardia* decai ao longo do tempo, podendo estar relacionada com a presença de flavoproteínas nos cistos.

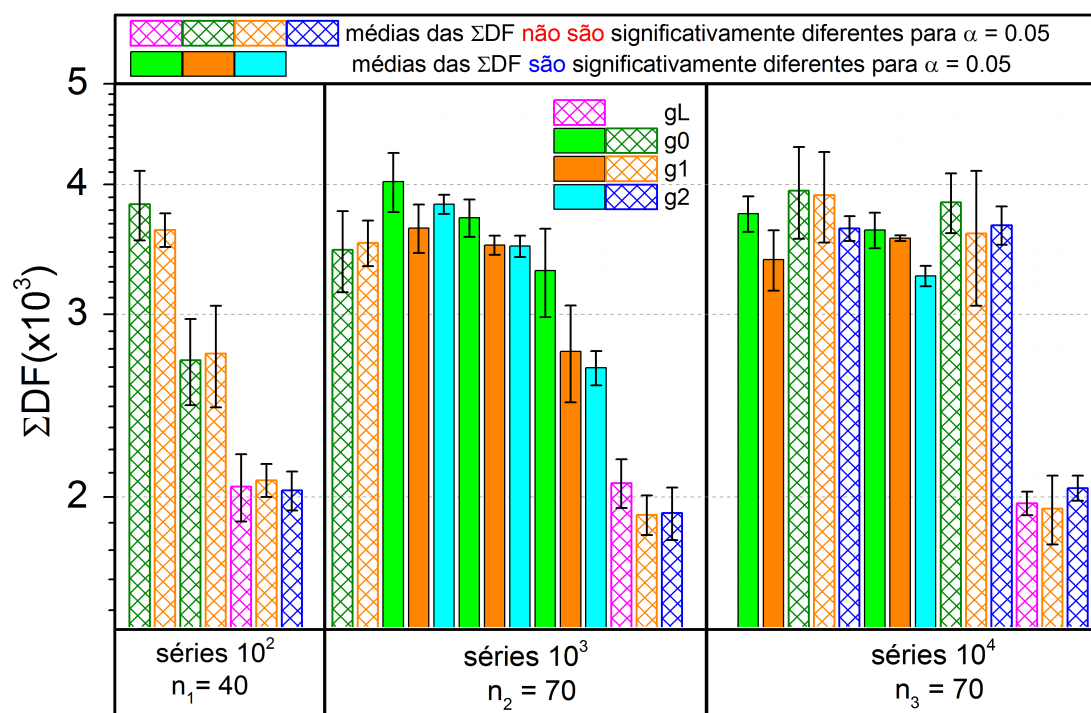
O dispositivo comercial (Type6100-IR) apresentou detecção satisfatória e com boa reprodutibilidade nos ensaios com 2×10^4 cistos $\cdot 100 \mu L^{-1}$. Na Figura 12(B) é possível ver a clara distinção entre os grupos analisados em cinco testes efetuados.

A análise da variação da DF após excitação com luz branca na PMT01 revela que os primeiros 100 ms de decaimento foram fundamentais para distinção entre os diferentes grupos testados. Já para o dispositivo comercial Type6100-IR, os primeiros 60 ms apresentaram dados que permitiram a diferenciação entre os grupos testados.

Maiores detalhes dos comportamentos da DF podem ser encontrados no Apêndice (2) onde estão descritos todos os padrões de DF, frequência relativa e total de contagem das séries A – D após excitação com luz branca na PMT01.

Em todos os experimentos efetuados, cada teste possui cinco repetições de excitação luminosa, sendo que cada série de DF estudada é composta de cinco testes com os grupos de *Giardia*. Os dados de DF foram tratados com base na média dos pontos locais permitindo a distinção do sinal da DF com o ruído de escuro da câmara de fóton-contagem. Posteriormente, a análise da integral das curvas de DF foi utilizada para melhores diferenciações entre os grupos analisados. Esse parâmetro é apresentado na Figura 13 em histogramas de ΣDF cujos ensaios foram efetuados nas séries A – D com a PMT01. Os resultados das séries A – D são também comparados com aqueles obtidos em série de ensaios contendo cistos de *G. intestinalis* vivos (grupo gL série E).

Figura 13 – Histograma da ΣDF para cistos de *Giardia* incubados em CFDA-SE 5 μM . Séries contendo $2,5 \times 10^2$, 5×10^3 e 2×10^4 cistos·100 μL^{-1} . Barras completamente preenchida indicam séries cujo g0 é significativamente diferente dos demais grupos em testes ANOVA “one way” e Tukey em intervalo de confiança de 0,05.



Fonte – Arquivo pessoal.

Com o intuito de avaliar se os grupos gL e g0 apresentaram ΣDF significativamente diferentes dos grupos mortos (g1) e estressados (g2), testes de ANOVA “one way” e Tukey no intervalo de confiança de 0,05 foram empregados. Os resultados mostraram que o grupo g0, 5×10^3 cistos·100 μL^{-1} nas séries B, C e D foi significativamente diferente dos demais. Somente a série C com 2×10^4 cistos·100 μL^{-1} apresentou ΣDF significativamente diferente dos grupos g1 e g2. Nenhum teste com $2,5 \times 10^2$ cistos·100 μL^{-1} permitiu a clara distinção dos grupos analisados.

A variabilidade na ΣDF está associada às diferentes idades dos grupos analisados. As séries A – D apresentam grupos g0 com diferentes idades, sendo sempre superiores a 30 dias. Os resultados demonstram que cistos velhos apresentam comportamentos semelhantes aos grupos mortos e estressados com luz UV-C.

Os coeficientes de correlação R^2 na análise de Tukey relevaram que para excitação com luz branca, os testes com 5×10^3 cistos·100 μL^{-1} apresentaram $R^2 < 55\%$. Já na série C com 2×10^4 cistos·100 μL^{-1} os valores de R^2 foram melhores com correlação superior a 75%.

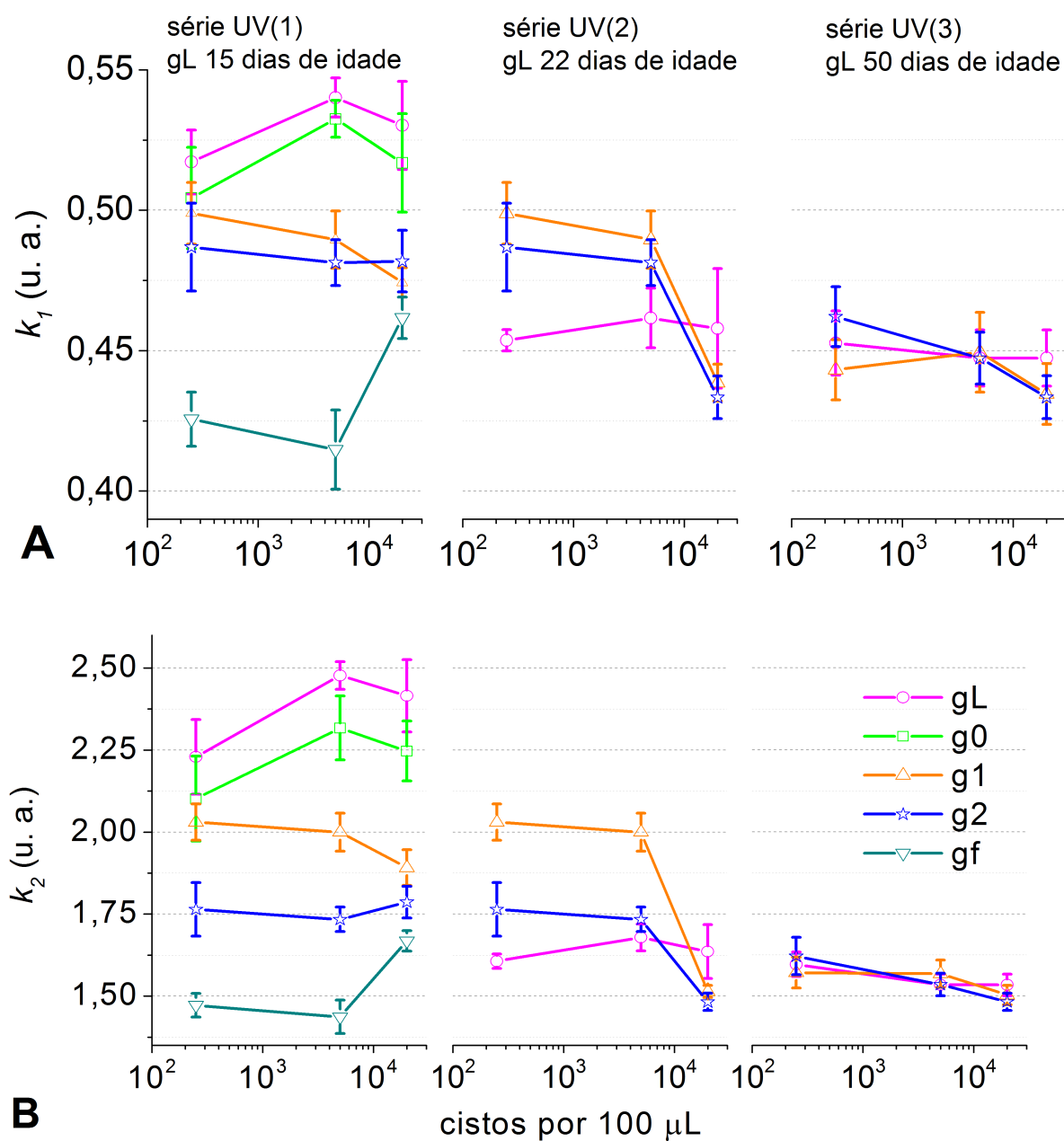
Melhores resultados foram obtidos com DF analisada após excitação com LED 365 nm (Figura 12(F)). Todos os grupos apresentaram clara distinção com R^2 superior a 95%. Com 15 e 22 dias de idade, o grupo gL apresentou diferenças significativas dos demais. Já aos 50 dias as intensidades da ΣDF decaem ao nível do CFDA-SE e os grupos testados não apresentaram diferenças significativas mesmo para o intervalo de confiança de $\alpha = 0,2$. Esses resultados demonstram que a excitação com 365 nm é a melhor condição para a análise de fluorescência retardada em *Giardia*.

A cinética de decaimento da DF é analisada com base nos coeficientes $\Delta p = p_1 - p_2$ da equação (1), k_1 e k_2 da equação (2). Quanto maior a intensidade da DF, maiores são os valores de Δp . Os coeficientes k_1 e k_2 demonstram que a fluorescência retardada em cistos de *Giardia* é acompanhada por duas componentes de decaimento, estando estas conectadas com as condições fisiológicas dos cistos aqui analisados.

Ao analisar o comportamento cinético das amostras excitadas com LED 365 nm, constatou-se que a DF também apresenta duas componentes de decaimento após excitação. No entanto, a luz UV-A quando comparada com a luz branca, apresentou melhores correlações para as constantes k_1 e k_2 .

Aos 15 dias de idade o grupo gL apresentou k_1 e k_2 com valores superiores aos grupos g0, g1, g2 e gf. Aos 22 dias de idade o prazo de validade do gL já havia expirado, tendo sido observada significativa queda nos valores de k_1 e k_2 . Finalmente, aos 50 dias de idade nenhuma distinção entre os grupos pôde ser detectada nos testes efetuados. Esses dados podem ser observados na Figura 14. Observa-se também que quanto maior foi o estresse imposto aos cistos, menores foram os valores dos coeficientes exponenciais. Detalhes acerca do comportamento dos valores de Δp e k_1 e k_2 das séries UV podem ser analisados no Apêndice (3).

Figura 14 – Coeficientes de decaimento exponencial de segunda ordem em ensaios de fluorescência retardada após excitação com luz UV 365 nm. Os grupos são analisados em função da quantidade de cistos por 100 μL de amostra e idade dos organismos. Série UV(1) indicam testes efetuados com grupo gL apresentado 15 dias de idade. Série UV(2) gL com 22 dias de idade. Série UV(3) gL com 50 dias de idade. k_1 e k_2 são constantes do decaimento exponencial expressos em unidade arbitrárias (u. a.).



Fonte – Arquivo pessoal.

Scientific Papers

Evaluation of CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX Green as staining probes for viability detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*

Samuel R dos Santos^{1,2}, Masakazu Katsumata⁴, Regina Maura B. Franco³, Nilson Branco³; José E. S. Paterniani² and Cristiano M. Gallep¹

¹ – School of Technology, r. Paschoal Marmo 1888, Limeira/SP

² – School of Agricultural Engineering, Av. Cândido Rondon 501, Campinas/SP

³ – Institute of Biology, r. Monteiro Lobato 255, Campinas/SP

University of Campinas, Brazil

⁴ - Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K.K., 5000 Hirakuchi, Hamamatsu City, Shizuoka Prefecture 434-8601, Japan

srsantos@me.com; gallep@ft.unicamp.br

Corresponding author: gallep@ft.unicamp.br

Abstract

Screening tests for detection of protozoa samples - *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* - using carboxyfluorescein-succinimidyl-diacetate-ester (CFDA-SE), C12-resazurin and SYTOX Green are studied and described. Living, heat-killed and UV-C stressed (oo)cysts were analyzed using these chemical probes. Results show that fresh, i.e. living and viable (oo)cysts cannot be stained by the mentioned dyes. Double-marked (oo)cysts are observed when C12-resazurin and SYTOX Green are applied to old cysts as well to dead ones. Aged samples show increasing number of stained organisms: 30-day-old with ~50% while samples older than 50 days with almost 100% marked.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, dye, SYTOX Green, viability

Introduction

Giardia spp. and *Cryptosporidium* spp. are important organisms in environmental monitoring and control. They promote giardiasis and cryptosporidiosis, serious illness in urban and rural areas, occurring via fecal/oral contamination (Adam, 2012; Fayer, 2004; Fayer et al., 2000; Nash and Hill, 2012; Xiao et al., 2004). These protozoa may affect humans and animals seriously, reflecting sanitation problems in water quality and in agricultural procedures, with

possible huge impacts over economics and public health (Corso et al., 2003; Gajadhar and Allen, 2004; Smith et al., 2007; WHO, 2002).

Methods to detect such organisms are well described in literature - i.e. the EPA Method 1623.1 (EPA, 2012), the Polymerase Chain Reaction (PCR), the CaCO_3 flocculation and the flow cytometer (AWWA, 2012). But those methods are not able to distinguish the living cysts from the dead ones. For that, the usual procedures include infection of animal model, incubation and further feces analysis, done after 1 week at least to check the present/absence of (oo)cysts and then confirming infectivity (Campbell and Wallis, 2002; Craik et al., 2001; Grit et al., 2012; Li et al., 2009; Mofidi et al., 2002). Various *in vitro* culture models were established for *Cryptosporidium* regarding such infectivity tests (Garvey et al., 2010; Najdrowski et al., 2007; Neumann et al., 2000a; Rochelle et al., 2002). Those procedures are very expensive, needing continuous cultivation of animal hosts and taking long time for the final results.

Some research with dye probes are being developed in order to provide useful, reliable and low cost procedures for detection of protozoa viability, i.e. enabling to distinguish dead samples cells from living ones. The use of dyes in viability check of protozoan can be an important tool if well demonstrated for *Cryptosporidium* (Liang and Keeley, 2012), *Giardia lamblia* (Barbosa et al., 2008), *Trypanosoma brucei* (Kabani et al., 2010), leading so to easier scanning procedures than the mentioned host incubation practiced nowadays.

Recently the CFDA-SE was suggested by Scheid and Schwarzenberger (2011) as a probe able to detect the viable *Cryptosporidium* oocysts. CFDA-SE is a non-fluorescent dye that diffuses through the cell membrane; once inside the cytoplasm it shows a green fluorescence, that due to esterase reactions. CFDA-SE is a proper dye to detect enzymatic activity, and so would provide evidences for the organism's viability. But, as will be shown here, when CFDA-SE penetrates these specific organisms it means that they are already damaged, by aging or by external stress, and might be not infective.

In this direction, C12-resazurin and SYTOX Green are dye probes used to distinguish active cells from the damaged and the dead ones. The C12-resazurin can be reduced to C12-resorutin in active cells, marking so the 'good' ones. The SYTOX Green is absorbed by compromised plasma membranes and stains the nucleic acid in apoptotic and necrotic cells. When applying both probes to a sample of cells those with normal metabolic activity are marked

in fluorescent orange, and the damaged ones present a fluorescent green nucleus (Cronin and Wilkinson, 2008).

The present work describes the evaluation of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* after incubation in CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX Green, as possible staining methods for viability detection. It is shown that fresh, viable (oo)cysts cannot be stained by the mentioned dyes, but old cysts and dead ones are double-marked when C12-resazurin and SYTOX Green are applied. It was also found that aged samples show rising number of stained organisms.

Material and Methods

(Oo)cysts strains

Strains of *Cryptosporidium parvum* (Iowa isolate from calves) and *Giardia lamblia* (H3 isolate from gerbils) were purchased from WaterBorne Inc, (P102C@ 1×10^6 and P101@ 1×10^6 , respectively). The strains contains 1×10^6 (oo)cysts into 4 mL PBS with penicillin, streptomycin, gentamycin and 0,01% Tween 20.

Giardia ssp. (A157 Japanese isolate at $3 \times 10^5/200 \mu\text{L}$) and *Cryptosporidium parvum* (H8 Japanese isolate at $7.3 \times 10^6/\text{mL}$) from the National Institute of Infectious Diseases – NIID / Tokyo, were also checked in labeling experiments. The (oo)cysts were purified from feces by sucrose and cesium chloride centrifugation. Those (oo)cysts are routinely maintained in experimental animals by oral inoculation at NIID and are surely viable and infective.

Infectivity of WaterBorne samples

The infectivity of *Giardia* and *Cryptosporidium* (WaterBorne strains) were analyzed by mice and gerbil incubation, at the NIID laboratory. One milliliter aliquot from each sample was centrifuged twice at 7,000 rpm and supernatant removed into 50 μL . Five-week-old gerbil (code: MON/Jms/GbsSlc) and six-week-old mice (code: C.B-17/Icr-scid/scidJcl), were used for infectivity tests with *Giardia* and *Cryptosporidium*. Three mice and gerbils, properly treated and cultivated without suffering, were inoculated orally with 15 μL of (oo)cysts and sucrose 5%. After 20 days feces were analyzed and the organisms were recovered, purified and visualized in epi-fluorescent microscope.

Chemicals

The CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX Green (LIVE/DEAD® kit) were used for labeling cysts. The probes (Invitrogen Inc.) were stored at -20°C before experiments.

Wang et al. (2005) shows that the cell takes CFDA-SE and intracellular esterase can remove the two acetate groups from CFDA-SE, leading to fluorescent CFSE. The succinimidyl from CFSE can couple the CF to intracellular molecules. In some cases CF couples to intracellular molecules (R1-NH₂) to form conjugates (CFR1) that can still exit the cell or are rapidly degraded. However, some portions of CF become coupled to long-life intracellular molecules (R2-NH₂) forming conjugates (CFR2) that cannot escape the cell and so fluorescent labeling is achieved.

Test groups

The experiments were performed for three groups of organisms:

- living (oo)cysts samples, without previous stress;
- dead samples, heat-killed; and
- UV-C (874 mJ/cm², 254 nm) stressed samples.

Several series were done in Brazil and Japan laboratories; Table 1 indicates the experiments using *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. Each group was screened with CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX Green.

Table 1 Experimental groups (*Giardia* 'g', and *Cryptosporidium* 'c') and series of labeling tests with CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX Green.

Brazilian series – 10 ² , 10 ³ and 10 ⁴ cysts		Japanese series – 10 ⁴ and 10 ⁵ (oo)cysts	
group	condition	group	condition
g0	non-stressed cysts, older than 30 days	cL and gL	non-stressed, fresh cysts
g1	heat-killed cysts at 100°C / 20 min.		
g2	874 mJ/cm ² UV-C(254 nm) stressed cysts	c1 and g1	(oo)cysts heat-killed at 98°C / 5 min.

The Brazilian experiments used nine series of 10², 10³ and 10⁴ *Giardia lamblia* cysts, replicated in three groups: older than 30 days (g0), heat-killed (g1) and UV-C stressed samples (g2, by germicidal lamp, 15W, @254 nm in 1h, i. e. 874 mJ/cm²). All groups were incubated on CFDA-SE in 5 replicates for each staining experiment, in 45 experiments total (n_B = 45). The Japanese tests were analyzed in 8 series using *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* with 10⁴ and 10⁵ (oo)cysts incubated on CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX Green. Each series with living (oo)cysts (cL and gL) and heat-killed (c1 and g1) were analyzed in 3 replicates, in 24 experiments total (n_J = 24).

(Oo)cysts chemical incubation

CFDA-SE

The screening performance for CFDA-SE was checked at 0.5, 1.0 and 5.0 μM on (oo)cyst incubation. The solution was transferred at 1:1 volume proportion to (oo)cysts suspension. The total volume was homogenized, mixed and transferred to incubation chamber at 37°C during 30 minutes.

C12-resazurin and SYTOX Green

Solution of C12-resazurin at 0.5, 1.0 and 5.0 μM and SYTOX Green at 10.0, 50.0 and 100 nM were tested, in experiments with LIVE/DEAD® kit. First, the dye solution was transferred into the (oo)cysts suspension, then the suspension was mixed and conducted to incubation chamber at 37°C for 30 minutes.

Confirmation of Fluorescence

The CFDA-SE presents excitation and emission peaks around 492 nm and 517 nm, respectively. Cells labeled with CFDA-SE were visualized by fluorescence microscopy using FITC filter sets. The stained cells with LIVE/DEAD® were checked with filters for fluorescein (FITC) and tetramethyl-rhodamine (TRITC). The population was analyzed in two groups: live and dead cells, by comparing the fluorescence intensities of marked (oo)cysts.

Evaluation of results

The capture image from epi-fluorescence microscope was analyzed by checking the fluorescence of the fresh, living (oo)cysts, of the UV-stressed and of the thermal stressed (dead) ones. Three captures per well were taken using DIC module, FITC and TRITC filter sets. The images were overlaid by open software (GIMP 2.8.4), combining DIC+FITC images for the CFDA-SE experiments and DIC+FITC+TRITC images for the C12-resazurin and the SYTOX Green experiments. The best exposure (excitation) time for observation depends on the age of samples and on the chemical concentration, in a range of 100 to 1000 ms when incubated with C12-resazurin+SYTOX Green; for the CFDA-SE tests the exposure times ranged from 500 to 2000 ms for the *Cryptosporidium* samples, and 100 to 500 ms for the *Giardia* ones.

Results

Infectivity tests

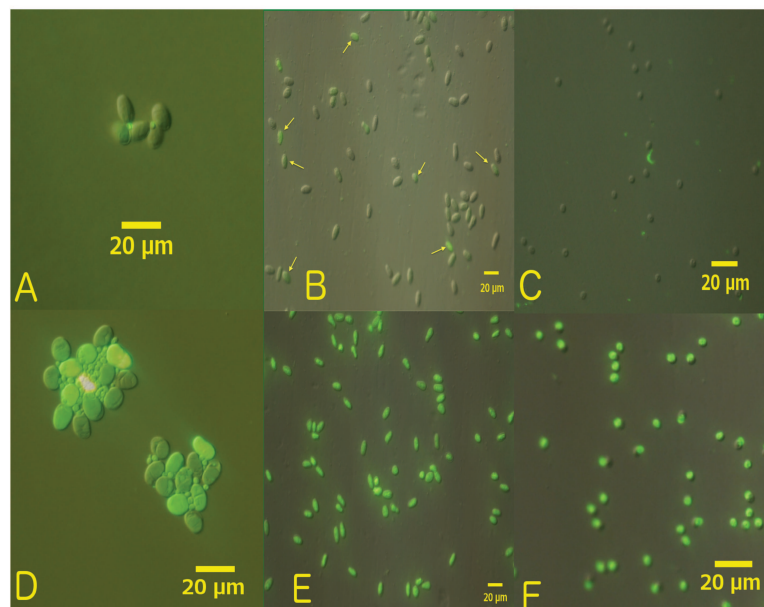
The recovery of cysts of *Giardia* from the WaterBorne strains after incubation in gerbils showed that those cysts were infective and viable.

Staining performance on *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*

Tests performed at NIID showed that fresh and living cysts do not interact with CFDA-SE, C12-Rezasurin nor SYTOX Green. Only old cysts, older than 30 days, and dead (oo)cysts were stained; in both cases the (oo)cyst wall decreases in tenacity and increases in permeability.

Figures (1) and (2) show the different aspects of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* (oo)cysts when incubated in CFDA-SE (Fig.1) or in C12-resazurin and SYTOX Green (Fig.2), before and after thermal stress. The screening performance reveals that markers are able to stain the dead and old cysts but not the fresh ones, whose wall are intact and can block those chemicals. Similar to CFDA-SE, C12-resazurin were uptake by cells and so stained all (oo)cysts' cytoplasm, indicating that these probes can stain only severely damaged or already dead organisms.

Figure 1 - Fluorescence images of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* incubated in CFDA-SE 5 μ M. On the top, (A) and (B) are non-stressed cysts, 8-day and 30-day old – *Giardia lamblia* (gL); (C) 90-day old *Cryptosporidium parvum* (cL). At the bottom, (D), (E) and (F) are heat-killed (oo)cysts samples (gl and cl). Each panel has different exposure time after ~492nm excitation on epifluorescent microscopic.



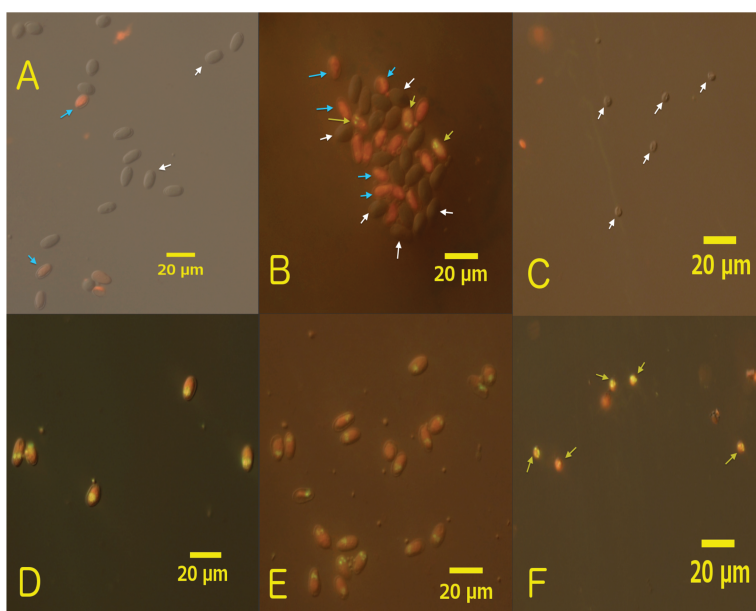


Figure 2 - Fluorescence images of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* incubated in C12-resazurin 5 µM and SYTOX Green 100 nM. (A) and (B) refers to non-stressed cysts, 17-day and 32-day old - *Giardia lamblia* (gL); (C) 76-days old *Cryptosporidium parvum* (cL). At the bottom, (D), (E) and (F) heat-killed (oo)cysts samples (g1 and c1). Each panel has different exposure time after ~492nm excitation on epifluorescent microscopic.

Table 2 summarizes the ratio of stained *Giardia* cysts by CFDA-SE and C12-resazurin and SYTOX Green kits. Microscopic images were recorded randomly from different wells, three times for each test. The relative number of cysts were counted and analyzed as percentage of stained ones. The 8-day old samples presented approximately 32% staining. Percentage increases over time, so that 30-day old samples were 50% labeled by CFDA-SE. The C12-resazurin and SYTOX Green kit showed 6% of stained cysts, 17-day old. Hence, after 30 days the samples presented staining of 51% by C12-resazurin and SYTOX Green kit, similar to that of CFDA-SE tests.

Table 2 Ratio of *Giardia* cysts stained by CFDA-SE and LIVE/DEAD® kit in percentage of stained cysts per tests.

Group	Series CDASE gL 8-day old				Series CFDA-SE gL 30-day old			
Tests	t1	t2	t3	Avg, SD %	t1	t2	t3	Avg, SD %
gL	27% (4/15)	28% (4/14)	41% (10/24)	32±7,8	53% (111/209)	53% (42/65)	47% (30/63)	51±3,4
g1	100% (11/11)	100% (14/14)	100% (11/11)	0	100% (31/31)	100% (73/73)	100% (78/78)	0
Group	Series LIVE/DEAD® kit gL 17-day old				Series LIVE/DEAD® kit gL 32-day old			
Tests	t1	t2	t3	Avg, SD %	t1	t2	t3	Avg, SD %
gL	4% (1/24)	4% (1/23)	11% (4/36)	6,33±4,04	53% (111/209)	53% (42/65)	47% (30/63)	51±3,46
g1	100% (21/21)	100% (12/12)	100% (15/15)	0	100% (49/49)	100% (75/75)	100% (76/76)	0

Physical stress and labeling performance

Strong stress treatments, with 100°C during 20 minutes (g1) and 874 mJ/cm² UV-C (g2), were applied to *Giardia* cysts, and those samples compared to intact but old ones (g0), in the Brazilian series. Images are presented at Figure 3, with decrease in fluorescence intensity after stress and CFDA-SE incubation. Again, the best concentration for labeling and microscope observation was 5 µM.

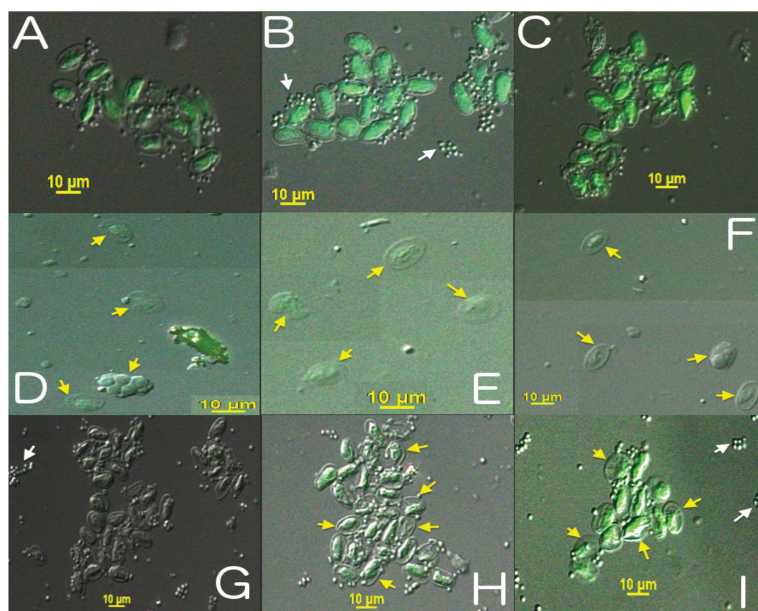


Figure 3 Fluorescence images of *Giardia lamblia* incubated in CFDA-SE – Brazilian series: (A), (B) and (C) non-stressed cysts (g0 group), >30-day old, incubated in 0.5, 2.5 and 5 µM; (D), (E) and (F) heat-killed cysts at 100°C/20min (g1 group) incubated in 0.5, 2.5 and 5 µM; (G), (H) and (I) UV-C @254 nm stressed cysts (g2 group) incubated in 0.5, 2.5 and 5 µM.

Discussion

Hammes et al. (2011) presented the three main components required for effective life: the presence of functional nucleic acids, the presence of minimum cellular energy and the presence of an intact and functional cellular membrane; these could well define the cell viability.

CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX green have already been demonstrated for bacteria and cell staining (Cronin and Wilkinson, 2008; Hilpert et al., 2005). The present work reports an application of CFDA-SE in *Giardia* cysts, although similar tests were presented already for *Cryptosporidium parvum* (Scheid and Schwarzenberger, 2011).

The tests here presented show that only damaged or dead (oo)cysts are stained by the markers CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX Green. The SYTOX Green has affinity only to dead organisms, by staining their nucleus, as found for g1 and c1 groups. Both *Cryptosporidium* and *Giardia* samples were clearly observed in fluorescence microscope using FITC, TRITC filter

sets and DIC module. In addition, the group treated with strong stress (g1) presented lower fluorescence intensities than the g0 and g2 groups; some fading fluorescence was observed in some experiments, requiring long exposure times for proper microscopic observations and image capture.

Other evidences of cell death are observed at Figure 3, for *Giardia* cysts deeply stressed by temperature and UV-C: the g1 group clearly has morphological signals of cell death - membrane blebbing, intense vacuolization and cell shape alteration. Heat-killed cysts show cell shape alteration followed by membrane blebbing, in contrast with the g1 – Japanese series (Figure 1). The g2 group presents intense vacuolization and cell shrinkage after UV-C stress and CFDA-SE incubation.

UV-Light stress induces apoptosis and other effects as protein cross-linking as well as generation of reactive oxygen species (ROS) that inhibit protein synthesis (Smith et al., 2009). Expressive damages are also observed at Figure 3 for the g2 group, where all cysts are stained by CFDA-SE.

Double-mark on dead (oo)cysts was observed after 30-minute incubation with C12-resazurin and SYTOX Green. This also indicates the impossibility of C12-resazurin to interact with living, intact (oo)cysts. The datasheet of the Live/Dead® kit indicates that C12-resazurin does interact with living organisms and that SYTOX Green interacts only with dead ones. In the present report it is shown that only dead organisms are stained, and so these dyes are not able to detect living (oo)cysts and cannot be applied to such propose. While bacteria and other cells show good relationship with CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX Green (Cronin and Wilkinson, 2008; Hilpert et al., 2005; WANG et al., 2005), these properties were not observed in the present series of experiments with protozoa (oo)cysts.

An interesting application for C12-resazurin + SYTOX Green was observed in 32-day old *Giardia* sample (gL, Fig.2): a mix of living (not marked), dying (marked in red) and dead (in red with green spots - nucleus) cysts occur in the same sample. After 32 days cysts were already in degeneration, and so the damaged wall enables the chemicals to enter the cells, and the organisms were stained. In the same sample some organisms are marked also by SYTOX Green, revealing so that they are dead. Living, intact cysts were not stained at all by neither C12-resazurin nor by SYTOX Green. Approximately 30% of 30-day-old cysts were stained by CFDA-SE and C12-resazurin.

These results suggest the possibility of estimation of organisms' age/degradation accordingly to the interactions observed for SYTOX Green and C12-resazurin. This kind of result was observed for both the commercial *Giardia* strains (WaterBorne) and those cultivated at NIID.

But *Cryptosporidium* oocysts did not behave like that, even when being 90-day-old. Only two 90-day old samples tests presented 5% of cL oocysts stained by CFDA-SE (n = 9/160). This can be related to the resistance of *Cryptosporidium parvum*, with higher tenacity for many chemicals and disinfectants, and its ability to remain viable for several months (Kvác et al., 2007; Smith and Grimason, 2003).

Important to be claimed it that SYTOX Green has affinity only to dead organisms, being able to stain their nucleus, as found for the g1 and the c1 groups. As already showed by (Neumann et al., 2000b; Putignani et al., 2004) for *Cryptosporidium parvum*, the SYTOX penetrated also the dead and old *Giardia* cysts. Both *Cryptosporidium* and *Giardia* samples were clearly observed in fluorescence microscope using DIC, FITC and TRITC filter sets. However, it was expected that the C12-resazurin would be active only in living cells. But living and intact *Cryptosporidium* and *Giardia* were unable to absorb this compound. Similar exceptions for SYTOX were presented by Sato et al. (2004), showing that microalgae *Anabaena* was unable to uptake the marker.

Regarding CFDA-SE it is important to note that it has been used as an enzymatic activity marker, and so positive results would be interpreted as indicating “viable” cells. Negative results would be related to weak enzymatic activity in the cell, as becoming inactive and potentially dead (Hammes et al., 2011). Heat-killing would promote enzymatic denaturation and might induce loss in viability as well. This appears to be the case for the data presented here for *Cryptosporidium* and *Giardia*, where all dead (oo)cysts were stained by CFDA-SE. According to Hammes *et al.* (2011) there are sufficient reasons to believe that esterase data should be taken with care, i.e.: (1) - detection of enzyme activity does not always mean cell viability, since there are several cases where dead cells show esterase activity, probably due to the facilitated stain transport into the cell; (2) - the absence of enzymatic activity does not mean that it is a dead cell.

The results showed here suggest that these probes must be applied carefully, in specific cases under strictly controlled protocols.

Conclusion

Giardia lamblia cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts present different behavior and interactions with CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX Green. Only dead (oo)cysts and old (damaged/dying) cysts are able to interact with these chemical probes. The SYTOX Green indicates the mortality of (oo)cysts by staining the nucleus. CFDA-SE, C12-resazurin and SYTOX Green are useful so to check the mortality and cellular condition of (oo)cysts with low cost.

Acknowledgements

The authors are thankful to the partial support from Hamamatsu Photonics K.K., from Shinji Izumiyama at the National Institute of Infectious Diseases – NIID, Japan, and from FAPESP (grants #11/10763-6, #10/07792-1 and #13/01501-3). Special acknowledgements to Anjaína Albuquerque, Josiane Vendemiatti, Jessica Maise and Geyna Souza for technical support at FT/UNICAMP.

References

- Adam, R.D., 2012. Giardiasis, in: Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease. Elsevier Inc., pp. 668–672. doi:10.1016/B978-1-4160-4390-4.00090-4
- AWWA, 2012. PATHOGENIC PROTOZOA: 9711 *Giardia* and *Cryptosporidium* Methods, in: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, D.C, pp. 9–161 to 9–169.
- Barbosa, J., Costa-de-Oliveira, S., Rodrigues, A.G., Pina-Vaz, C., 2008. Optimization of a flow cytometry protocol for detection and viability assessment of *Giardia lamblia*. Travel Med. Infect. Dis. 6, 234–9. doi:10.1016/j.tmaid.2008.01.004
- Campbell, A.T., Wallis, P., 2002. The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia* cysts. Water Res. 36, 963–969. doi:10.1016/S0043-1354(01)00309-8
- Corso, P.S., Kramer, M.H., Blair, K.A., Addiss, D.G., Davis, J.P., Haddix, A.C., 2003. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. Emerg. Infect. Dis. 9, 426–31. doi:10.3201/eid0904.020417
- Craik, S.A., Weldon, D., Finch, G.R., Bolton, J.R., Belosevic, M., 2001. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation. Water Res. 35, 1387–1398. doi:10.1016/S0043-1354(00)00399-7
- Cronin, U.P., Wilkinson, M.G., 2008. Monitoring growth phase-related changes in phosphatidylcholine-specific phospholipase C production, adhesion properties and physiology of *Bacillus cereus* vegetative cells. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1695–703. doi:10.1007/s10295-008-0461-3
- EPA, 2012. Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. United States Prot. Agency.
- Fayer, R., 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 126, 37–56. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.004

- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30, 1305–1322. doi:10.1016/S0020-7519(00)00135-1
- Gajadhar, A.A., Allen, J.R., 2004. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. *Vet. Parasitol.* 126, 3–14. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.009
- Garvey, M., Farrell, H., Cormican, M., Rowan, N., 2010. Investigations of the relationship between use of in vitro cell culture-quantitative PCR and a mouse-based bioassay for evaluating critical factors affecting the disinfection performance of pulsed UV light for treating *Cryptosporidium parvum* oocysts in sa. *J. Microbiol. Methods* 80, 267–73. doi:10.1016/j.mimet.2010.01.017
- Grit, G.H., Bénéré, E., Ehsan, A., De Wilde, N., Claerebout, E., Vercruysse, J., Maes, L., Geurden, T., 2012. *Giardia duodenalis* cyst survival in cattle slurry. *Vet. Parasitol.* 184, 330–4. doi:10.1016/j.vetpar.2011.08.021
- Hammes, F., Berney, M., Egli, T., 2011. Cultivation-independent Assessment of Bacterial Viability. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 124, 123–50. doi:10.1007/10_2010_95
- Hilpert, F., Heiser, a, Wieckhorst, W., Arnold, N., Kabelitz, D., Jonat, W., Pfisterer, J., 2005. The impact of electrical charge on the viability and physiology of dendritic cells. *Scand. J. Immunol.* 62, 399–406. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01677.x
- Kabani, S., Waterfall, M., Matthews, K.R., 2010. Cell-cycle synchronisation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* using Vybrant DyeCycle Violet-based sorting. *Mol. Biochem. Parasitol.* 169, 59–62. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.08.008
- Kvác, M., Kvetonová, D., Salát, J., Ditrich, O., 2007. Viability staining and animal infectivity of *Cryptosporidium andersoni* oocysts after long-term storage. *Parasitol. Res.* 100, 213–7. doi:10.1007/s00436-006-0272-2
- Li, D., Craik, S.A., Smith, D.W., Belosevic, M., 2009. Infectivity of *Giardia lamblia* cysts obtained from wastewater treated with ultraviolet light. *Water Res.* 43, 3037–46. doi:10.1016/j.watres.2009.04.024
- Liang, Z., Keeley, A., 2012. Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium* oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. *Water Res.* 46, 5941–53. doi:10.1016/j.watres.2012.08.014
- Mofidi, A.A., Meyer, E.A., Wallis, P.M., Chou, C.I., Meyer, B.P., Ramalingam, S., Coffey, B.M., 2002. The effect of UV light on the inactivation of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cysts as determined by animal infectivity assay (P-2951-01). *Water Res.* 36, 2098–108.
- Najdrowski, M., Joachim, A., Dauschies, A., 2007. An improved in vitro infection model for viability testing of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet. Parasitol.* 150, 150–4. doi:10.1016/j.vetpar.2007.09.005
- Nash, T.E., Hill, D.R., 2012. Giardiasis, in: Goldman's Cecil Medicine. Elsevier Inc., pp. 2040–2043. doi:10.1016/B978-1-4377-1604-7.00359-6
- Neumann, N.F., Gyürék, L.L., Finch, G.R., Belosevic, M., 2000a. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 331–6.
- Neumann, N.F., Gyürék, L.L., Gammie, L., Finch, G.R., Belosevic, M., 2000b. Comparison of animal infectivity and nucleic acid staining for assessment of *Cryptosporidium parvum* viability in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 406–12.
- Putignani, L., Tait, a., Smith, H. V., Horner, D., Tovar, J., Tetley, L., Wastling, J.M., 2004. Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* 129, 1–18. doi:10.1017/S003118200400527X
- Rochelle, P.A., Marshall, M.M., Mead, J.R., Johnson, A.M., Korich, D.G., Rosen, J.S., Leon, R. De, Al, R.E.T., 2002. Comparison of In Vitro Cell Culture and a Mouse Assay for Measuring Infectivity of *Cryptosporidium parvum* 68, 3809–3817. doi:10.1128/AEM.68.8.3809
- Sato, M., Murata, Y., Mizusawa, M., 2004. A Simple and Rapid Dual fluorescence Viability Assay for Microalgae. *Microbiol Cult Coll* 20, 53–59.

- Scheid, P.L., Schwarzenberger, R., 2011. Free-living amoebae as vectors of cryptosporidia. *Parasitol. Res.* 109, 499–504. doi:10.1007/s00436-011-2287-6
- Smith, H., Grimason, A., 2003. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. *Handb. Water Wastewater Microbiol.* 695–756. doi:10.1016/B978-012470100-7/50041-8
- Smith, H. V, Cacciò, S.M., Cook, N., Nichols, R. a B., Tait, A., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol.* 149, 29–40. doi:10.1016/j.vetpar.2007.07.015
- Smith, H. V., Al-Adhami, B.H., Nichols, R.A.B., Kusel, J.R., Grady, J.O., 2009. Towards Methods for Detecting UV-induced Damage in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* Oocysts by Immunofluorescence Microscopy, in: Ortega-Pierres, Cacciò, G., Fayer, S., Mank, R., Smith, T.G., Thompson, H. V. (Eds.), *Giardia and Cryptosporidium: From Molecules to Disease*. CAB eBooks, pp. 179–197.
- WANG, X.-Q., DUAN, X.-M., LIU, L.-H., FANG, Y.-Q., TAN, Y., 2005. Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester Fluorescent Dye for Cell Labeling. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 37, 379–385. doi:10.1111/j.1745-7270.2005.00051.x
- WHO, 2002. Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*), in: *Guidelines for Drinking-Water Quality: Addendum Microbiological Agents in Drinking Water*. World Health Organization, Geneva, pp. 70–118.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 72–97. doi:10.1128/CMR.17.1.72-97.2004

Delayed fluorescence of CFDA-SE dyed *Giardia intestinalis* – differences between stressed and non-stressed cysts

Santos, Samuel Ricardo dos^{1,2}; Branco, Nilson³; Franco, Regina Maura Bueno³; Paterniani, José Euclides Stipp²; Gallep, Cristiano de Mello¹

¹School of Technology - FT,

²School of Agricultural Engineering – FEAGRI,

³Biology Institute – IB,

University of Campinas / Brazil

srsantos@me.com; branco@unicamp.br; mfranco@unicamp.br; pater@feagri.unicamp.br; gallep@ft.unicamp.br.

Corresponding author: gallep@ft.unicamp.br

Abstract

Giardia intestinalis in concentrated samples and stained with CFDA-SE were analysed by fluorescence imaging as well as by delayed fluorescence (DF) after UV-A and white-light excitation. The weak DF profiles were detected in photon-counting setups, in 8 series of tests for intact, for heat-killed and for UV-C-stressed samples. The results show that intact samples present stronger fluorescence and DF than the stressed ones, with good replication after UV-A excitation. Samples 15-day old presented ~30% of staining rate while 50-day old ones had ~100%. After excitation @365nm samples present DF better fitted by double exponential decay kinetics, with the decay constant k_2 five times higher than the k_1 constant. The procedure can be easily reproduced in 10 steps, taking around 1h of laboratorial work with purified samples.

Introduction

Giardia duodenalis (*G. lamblia* and *G. intestinalis*) is a challenging and important organism in modern environmental monitoring. This protozoa can affect humans and animals seriously, as reflection of sanitation problems in water quality control, with huge impact over economics and public health [1–3]. The infection may occur via fecal-oral, after ingestion of contaminated food or water [4]. Also the contamination can occurs by person-to-person [5,6], animals to humans [7] and pet to animals [8,9] . Outbreaks have been reported mainly related to water sources [10–12].

Standard protocols including the EPA Method 1623.1 [13] and AWWA 9711 [14] have being applied on *Giardia* detection although those methods are not able to distinguish living from dead cysts. Infectivity tests are the proper tool in order to define the real risk to environmental

control. Nowadays the complete procedure includes animal model incubation and further feces analysis, after *Giardia* complete live cycle, and so confirming or not the infectivity [15]. However, this procedure is very expensive and may take long time for giving conclusive data. Moreover some water treatment stations are not able to maintain animal models and sophisticated laboratory facilities to perform such infectivity tests.

So, the cyst infectivity estimation is a critical procedure in environmental control, analyzing the efficiency of disinfection techniques used in water treatment. Some works trying to correlate the disinfection procedures to the *Giardia* infectivity diminishing can be consulted in ref. [16–19].

Recently some groups showed applications of dye probes in checking cell viability and so distinguishing dead from living samples. The use of dyes in tests of protozoan viability has been already demonstrated for *Cryptosporidium parvum* [20], *Ascaris* eggs [21] and *Trypanosoma brucei* [22]. Such techniques can lead to a much easier and faster scanning procedures than that of the usual host incubation. These dyeing techniques require fluorescence visualization/detection in appropriated microscope, or even by Polymerase Chain Reaction (PCR), making such tests very expensive. This issue is especially imperative in the so-called ‘under-development’ world, where costs may block many details that would be included in water quality inspection.

In this sense, if instead of fluorescence microscope one could use a cheaper and portable delayed fluorescence (DF) apparatus to detect the staining effectiveness in concentrated cyst samples, and so spending just some minutes per sample, it would improve the water quality inspection at least in relation to parasites.

In this direction it is shown here results of seven series of DF tests with *Giardia lamblia* cysts in concentrated samples, stained by a chemical probe - 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE). It is shown that fresh and viable cysts are not stained by CFDA-SE but old cysts, stressed and dead ones are. It was also found that aged samples show increasing number of stained organisms and that these can be followed by changes in their DF profile.

Material and Methods

***Giardia lamblia* cysts**

Commercial strains of isolated *Giardia lamblia* H3 with 10^6 cysts in 4 mL suspension (Waterborne Inc.) were stored at 4° C in PBS-Buffer with penicillin, streptomycin, gentamicin and 0.01% Tween 20.

Chemical probe

The 6-carboxy-fluorescein-succinimidyl-diacetate-ester (CFDA-SE) was used for labeling the cyst samples. The CFDA-SE probe (Invitrogen Inc.) was stored at -20°C. CFDA-SE is a non-fluorescence dye that diffuses into cytoplasm and, once inside the cell, becomes green fluorescent by esterase reaction, and was demonstrated as indicator for enzymatic activity, providing evidences of organism's viability [20]. However, as it will be shown here, this probe only access enzymatic reaction in dead or damage *Giardia* cysts.

The commercial chemical was provided with 40 µg of CFDA-SE powder in vials tube. A 1mM standard solution was prepared by adding 90 µL of DMSO and 910 µL of PBS-buffer. Dilutions were prepared for 0.5, 2.5 and 5.0 µM. Then each solution was tested in screening performance series of cysts incubation for optimal staining determination.

Experimental groups

Experimental series were performed in four groups of organisms: living and infectious group with *Giardia lamblia* cysts less than 20-day old (so called gL); the non-stressed group – (g0) with cysts samples older than 30 days, with no previous stress and stored at 4°C; the heat-killed samples (g1, 100°C / 20 minutes) and the UV-stressed samples (g2, @254nm / 1 hour, i.e.: 874 mJ/cm²). One single series (gf) were done with cysts stored at freezer (-30°C) for one week.

Before dye incubation the cysts were mixed in vortex for 2 minutes. After that aliquots were prepared with 2.5×10^2 , with 5×10^3 and with 2×10^4 cysts per 100 µL. CFDA-SE solutions with 0.5 µM, 2.5 µM and 5.0 µM were checked for optimal staining, and the cyst samples (gL, g0, g1 and g2) were transferred into each solution at 1:1 volume proportion; further solutions were mixed and transferred to incubation chamber (37°C / 30 minutes).

Delayed Fluorescence and microscopic observation tests

After CFDA-SE incubation the DF tests were performed as well as microscopic observation and image capture. The CFDA-SE presents excitation and emission peaks respectively at 492 nm and 517 nm, and so dyed organisms were visualized by fluorescence microscope (Axio Imager A2, Carl Zeiss) using FITC filter sets.

Four series (A, B, C and D) were developed using a home-made apparatus called PMT01 [23], operating in photon-counting mode with 100 micro-second time-slots x 10^4 acquisition points (cp100µs). Tests were performed with 2.5×10^2 ($n_1 = 40$ tests), 5×10^3 ($n_2 = 70$ tests) and

2×10^4 cysts/100 μ L ($n_3 = 70$ tests), and using 30-second excitation by halogen lamp (6970 lux). Three more series on PMT01 (UV1, UV2 and UV3) were run using UV@365nm LED excitation for 30 sec. (275 lux) and counts per milliseconds (cpms).

All DF tests were performed for each sample in 5x repetition, as well as for the CFDA-SE (background), starting acquisition just after light excitation and secure delay of 0.3 s. The DF was recorded for 2 seconds.

A commercial setup (Biophoton Assay System, Type6100, Hamamatsu Photonics K.K.) with infrared sensitive PMT, one-second excitation (white light LED, Nichia NSPW510DS) and 10-ms time-slots were used to compare with the results obtained when using PMT01.

Photon-counts analysis

The DF photon-count data were analyzed by decay kinetics using numerical fitting – by Boltzmann step and by exponential functions – and the fitting parameters used as comparative for the different groups.

The Boltzmann growth is defined by [24]:

$$y = \frac{p_1 - p_2}{1 + e^{t/dt}} + p_2 \quad (1)$$

where p_1 and p_2 ($\Delta p = p_1 - p_2$) are initial and final photon-counting intensities, t is the time (seconds) and dt is a temporal constant; the double exponential decay is defined by [25]:

$$y = A_1 e^{-t/k_1} + A_2 e^{-t/k_2} \quad (2)$$

where A_1 and A_2 are the amplitudes, t is the time, k_1 and k_2 are the decay constants.

Results

The protocol procedure for the DF experiments is shown at Figure 1. The protocol can be run in approximately 1h of laboratory work, in ten easy steps, for each of 10 samples. Here it is shown the experimental protocol for already purified samples. For environmental samples pre-treatment steps are needed, in order to provide clean and purified samples. This pre-treatment can be a standard purification protocols [14].

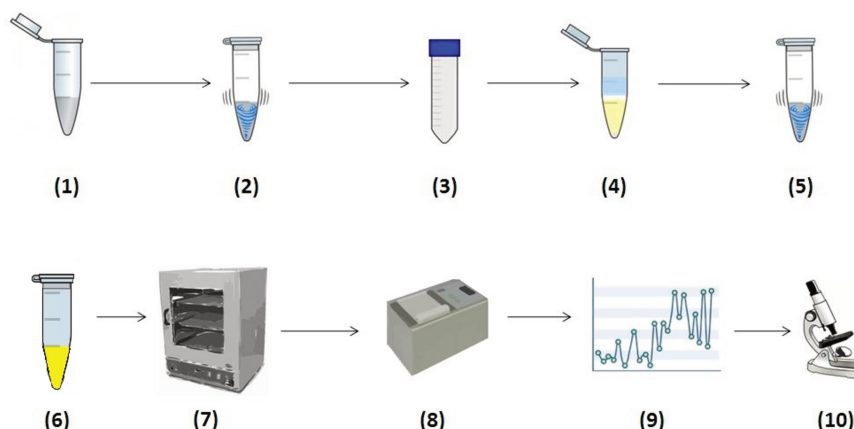


Figure 1 Experimental procedures for DF analysis in *G. intestinalis* in concentrated samples: (1) purified suspension with cysts; (2) mixing the suspension in vortex for 2 minutes; (3) preparing a 5.0 μM CFDA-SE solution; (4) addition of CFDA-SE solution to cysts suspension at 1:1; (5) mixing the suspension in vortex for 10 seconds; (6) incubation at 37° C for 30 minutes at (7) bacteriological incubation chamber; (8) Delayed Fluorescence measurement in photon-counting setup; (9) DF analysis; (10) observation at epi-fluorescence microscopic.

Images of *Giardia* after interaction with CFDA-SE, at 5.0 μM , for gL, g0, g1 and g2 groups are presented at Figure 2. The screening performance revealed that CFDA-SE at 5.0 μM is the best concentration for microscopic observation and image capture. The exposure time, ranging from 100 to 1000 ms, allowed perfect observation and image capture by epi-fluorescence microscope.

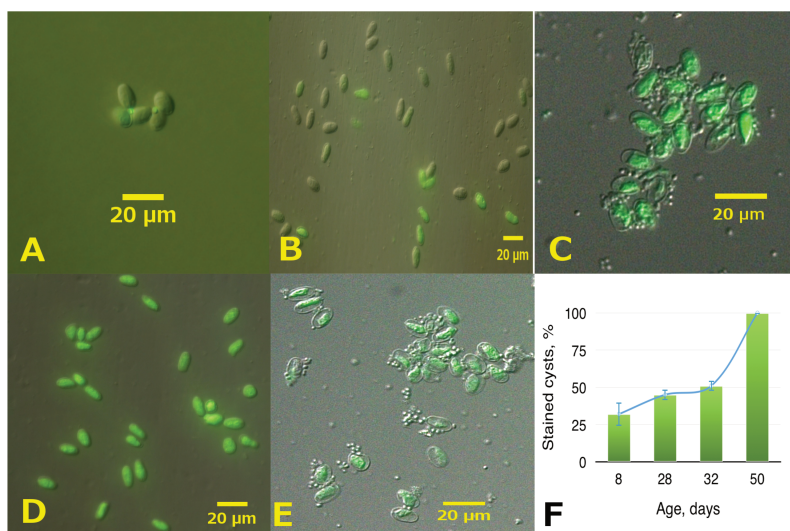


Figure 2 Capture images from epi-fluorescence microscope - *Giardia duodenalis* cysts incubated in CFDA-SE 5.0 μM : (A) 8-day old (living), (B) 30-day old, and (C) 50-day old cysts; (D) Heat-killed and (E) UV-C stressed cysts; (F) Evolution of stained rate versus sample age. Each panel has different exposure time after ~492 nm excitation, ranging from 100 to 1000 ms.

As found in Figure 2, fresh and living cysts did not interact with CFDA-SE (A). After 28 days the cysts start to die and their clad become permeable (B and C). The fluorescence intensity changes with the CFDA-SE concentration and the stressed condition. Heat-killed (D) and UV-C stressed (E) cysts show green fluorescence after 30-min incubation. However, these groups have

weaker fluorescence than that of the intact (g0) samples. It is also clear from pictures that stressed samples present several damages (E) - apoptosis and degraded cytoplasm. The staining effectiveness *versus* the sample age was determined by counting all stained cysts, divided by total number of cysts in one sample – resume is presented at Fig.2(F).

Examples of DF decay curves with their numerical fitting are shown at Figure 3. Cysts incubated in CFDA-SE 5.0 μM present different DF for living (gL), old (g0), heat-killed (g1) and UV-C stressed samples (g2). The intensities of DF for g0 and gL groups are stronger than heat-killed and UV-C stressed ones only for cysts less than 20-day old. Aged cysts presented changes in total count intensities (ΣDF) and these results are plot on Figure 3(c) and 3(d). It is clear from these that ΣDF of aged cysts decrease along time: for 15-day old samples ($\sim 30\%$ staining) the ΣDF for gL groups is higher than for g0 and for g1 groups. But for 22-day old samples, when cysts already start to die, the gL's ΣDF also decrease (-42%) but keeps higher values than that of g1 and g2 groups.

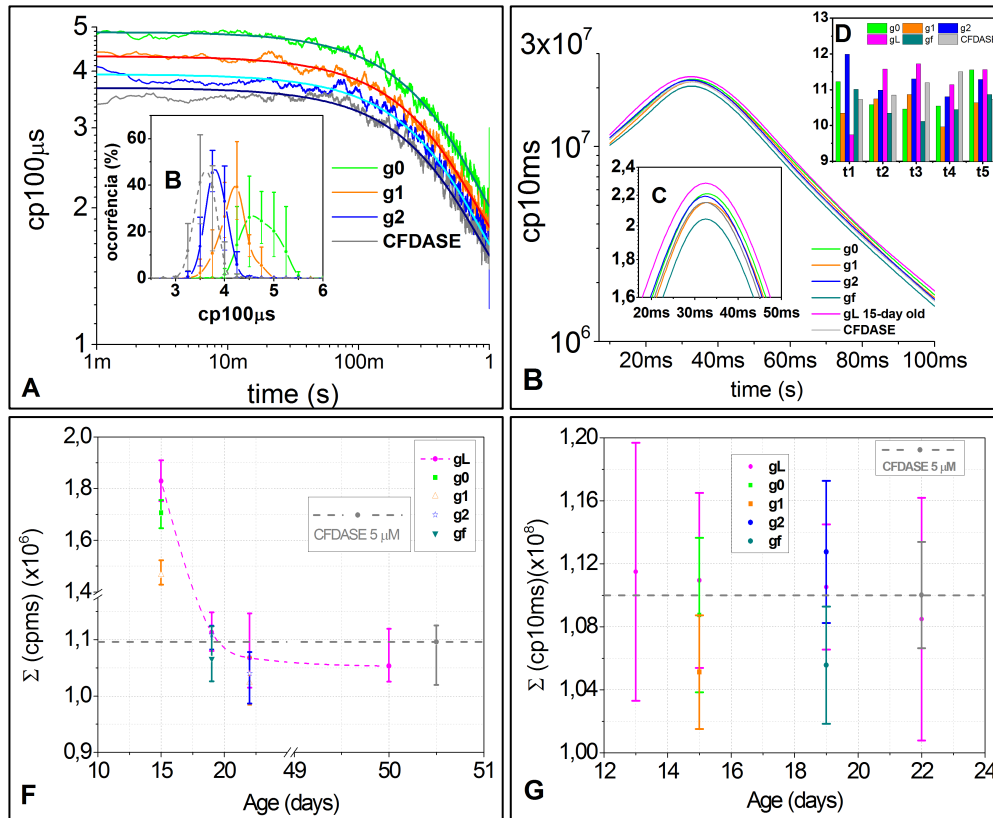


Figure 3 Typical DF data for *G. intestinalis* incubated in CFDA-SE 5.0 μM ; (A) for 1-s DF using PMT01 setup (cp100 μs) for 30-s white light excitation, (B) 100-ms DF using Type6100-IR (cp10ms) for 1-s white light (LED) excitation; (A) DF curves and fits for dual-exponential decay and (B) relative photon-counting occurrence (%); (C) DF curves, including detail for the first 60ms; (D) Total counts (Σcp10ms) for five tests; (E) and (F) describes the Total counts (ΣDF) versus sample age, for 2×10^4 cysts/100 μL .

In each of the 7 test series each sample has its 5 x DF data averaged, with local smoothing (100#) to clear the photo-detector thermal noise, and the parameters of interpolated curves analyzed by sum of DF, ΣDF , presented at Figure 4.

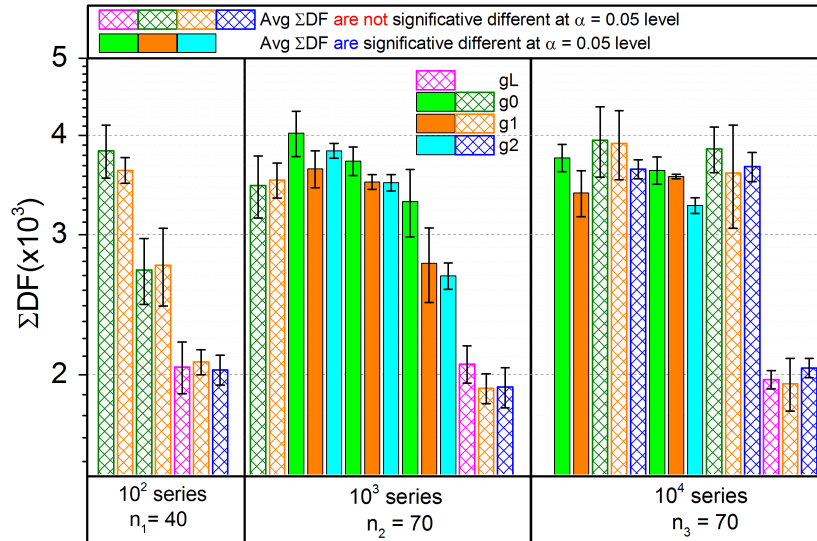


Figure 4 Total counts (Σ) of DF (white light excitation, 100 ms decay) for series with 2.5×10^2 , 5×10^3 and 2×10^4 cysts/100 μ L experiments. Completed column mean significant average difference of g0 relative to g1 and g2 groups ($\alpha = 0.05$).

The g0-group does interact with CFDA-SE and so presents higher ΣDF than the g1 and the g2 groups. These stressed groups present decrease in Delayed Fluorescence, i.e. lower values of ΣDF . The best results were obtained for the 10^3 -cysts series, where ΣDF for g0 and gL are higher than that for g1 and g2. In 3/5 of the 10^4 -cysts series and in 1/3 of the 10^2 -cysts series the g0 group presented higher ΣDF than the others. Tests for g0, g1 and g2 groups were done in different days and so, g0 has a different age (over than 30 days) in each of these series.

In order to analyze if the g0 and the gL groups have significant differences from the g1 and the g2, ANOVA and Tukey analysis ($\alpha=0.05$) were done for the ΣDF data. The results showed that for 5×10^3 cysts/100 μ L (B, C and D series) and for 2×10^4 cysts/100 μ L (B and C series), the g0 group has significant statistic difference from the g1 and the g2 groups. Nevertheless the R^2 correlations for these series were less than 55% on the 5×10^3 cysts/100 μ L tests. Only the C series with 2×10^4 cysts/100 μ L showed $R^2 = 77\%$.

The best results were obtained for UV@365nm excitation, with $R^2 > 95\%$. For 15- and 22-day old samples the gL groups have significant difference from g1 and g2. After 50 days the groups showed no significant difference even for $\alpha = 0.2$ on Tukey analysis.

The DF exponential fitting coefficients are shown at Figure 5 for cysts of 15, 20 and 50 days old. It can be seen that living cysts (gL, g0) have higher k_1 and k_2 coefficients than that of the stressed groups only for 15-day old samples (UV1 series). For 22-day old samples (UV2 series) the *Giardia* strains had already been aged and deteriorated, and k_1 and k_2 for gL decrease to the level of g2 numbers. After 50 days the gL coefficients have no distinction from that of heat-killed (g1) and of UV-C stressed groups (g2).

The use of white light excitation for DF tests showed no significant impact over Δp (eq.1) and k_1 (eq.2). On the other hand, UV-LED excitation presented the best distinction between gL, g0, g1, g2 and gf groups concerning the k_1 and the k_2 constants (eq.2).

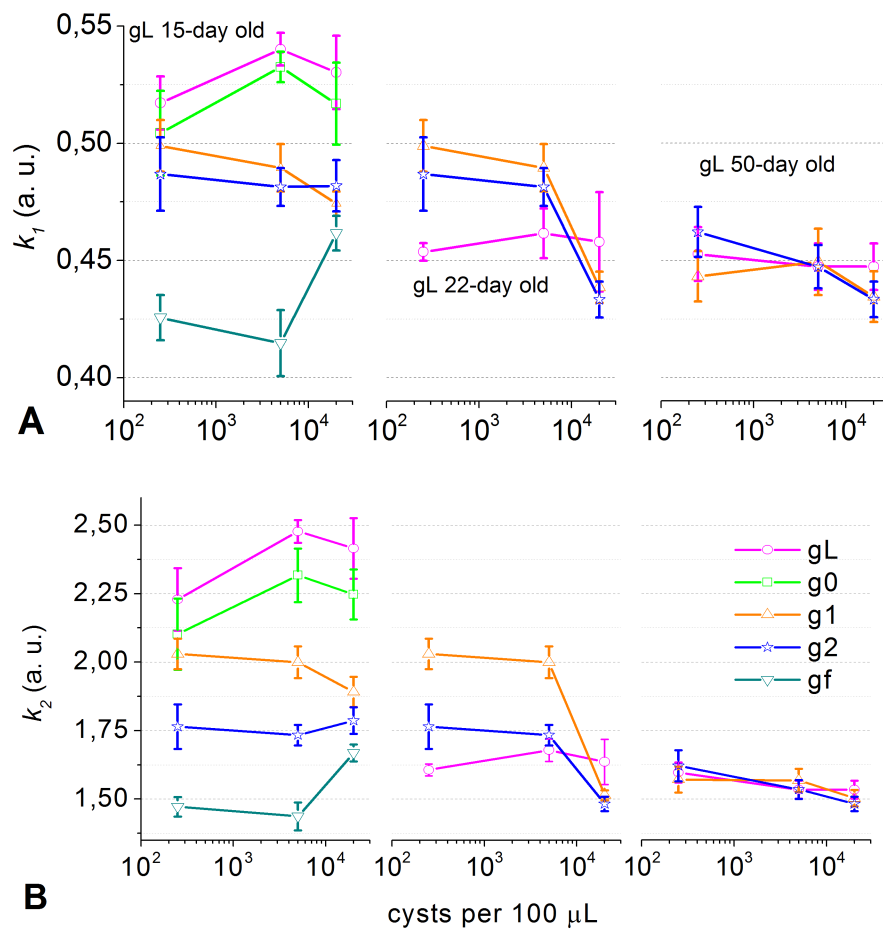


Figure 5 Decay constants k_1 and k_2 for DF's exponential decay (30s @365nm excitation) fitting versus number of cysts, for *Giardia lamblia* samples with age of 15, 22 and 50 days; g0 sample is older than 30 days but tested in the same day of gL with 15 days. Decay constant expressed as an arbitrary units (a. u.)

Discussion

Giardia is a challenging organism in modern environmental monitoring, and its viability detection is an important step to avoid risks in public health [3,26–29]. Moreover, water treatment stations should be able to detect and check the viability of this parasite and provide proper disinfection of water supplies. Several works have shown how to kill this organism in different procedures [18,19,30,31]. But infectivity tests in animal model are required to check the efficiency of those treatments [32].

Trying to provide alternative procedures for viability detection, estimating infectiveness, some staining probes and/or PCR procedures have been studied in easier protocols [33–37]. CFDA-SE has already been applied for bacteria cell tests [38,39], and recently suggested as staining probe able to detect viability of *Cryptosporidium parvum* [20], another important protozoa in environmental science.

Here, CFDA-SE at 0.5, 2.5 and 5.0 μM were able to stain dead and damaged cysts only, with best results obtained for 5.0 μM . Fresh, intact cysts do not interact with CFDA-SE even at high concentrations [40]. Therefore, in this case to have a stained cyst does not mean that it is viable, but probably that it is damaged and maybe that it is already non-infective. These results can be related to the tenacity of cyst's wall - after aging or stress the wall permeability increases and so the probe can pass through, once inside the esterase reaction takes place, giving the expected green fluorescence.

The stained ratio increased from 30%, for younger samples (8-day old, Fig. 2A) to almost 100% for aged ones (50-day old, Fig. 2C). Details of temporal evolution (age of cysts) for the staining performance are shown at Figure 2F. After 20 days most of cysts start to die and their DF intensities decreases as well. So probably aged cysts suffered because they were kept in phosphate buffer saline (PBS) with antibiotics; the supplier datasheet (WaterBorne Inc.) indicates the expiration date after 21 days. However, those cysts still have significant differences between the groups g1 and g2, since CFDA-SE is a stain related to enzymatic activity.

Delayed Fluorescence analysis appears so as a candidate for viability detection schemes, when it could be related to metabolic activity [41]. Even with CFDA-SE not working as expected, the alterations in DF profiles related to cyst's state had appeared in all experiments. The sum of DF, the k_1 and k_2 parameters present good correlation to the sample condition, distinguishing non-stressed from dead and stressed samples, when fresh ones were available.

UV stress induced apoptosis and other effects, as protein cross-linking, as well as generation of reactive oxygen species (ROS) that inhibit some protein synthesis [42]. Expressive damage is also observed at Figure 2E for the g2 group, with all cysts stained by CFDA-SE. This group also presented low ΣDF and k_1 and k_2 coefficients. Younger and dying cysts presented complete different DF decays from that of stressed and dead samples.

Recently Propidium Monoazide PMA was proposed for staining and viability detection of *Cryptosporidium parvum*, with good correlation of dead cells to the PMA fluorescence [43]. So, combining the exposed DF analyses and PMA would be a further test to be studied.

Conclusion

Giardia lamblia cysts present different interaction with CFDA-SE accordingly to their age and physiological state. Only dead cysts and old (damaged/dying) ones were found to interact with CFDA-SE. Dead cysts, UV-C stressed and aged ones present changes in DF profiles, characterized by total photon-counts and kinetics decay parameters. Living and fresh samples presented different DF profiles when compared to dead and stressed groups.

Acknowledgements

The authors are thankful to the partial support from Hamamatsu Photonics K.K. and useful discussions with Dr. Masakazu Katsumata, as well as with Dr. Shinji Izumiyama (National Institute of Infectious Diseases – NIID) Japan, and from FAPESP (grants #11/10763-6, #10/07792-1 and #13/01501-3). Special acknowledgements to Anjaína Albuquerque, Josiane Vendemiatti, João Viana, Jéssica Maise and Geyna Souza for technical support at FT/UNICAMP.

References

- [1] WHO, Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*), in: Guidel. Drink. Qual. Add. Microbiol. Agents Drink. Water, World Health Organization, Geneva, 2002: pp. 70–118.
- [2] A.A. Gajadhar, J.R. Allen, Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites., *Vet. Parasitol.* 126 (2004) 3–14.
- [3] J.A. Castro-Hermida, I. García-Presedo, A. Almeida, M. González-Warleta, J.M.C. Da Costa, M. Mezo, Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals., *Water Res.* 43 (2009) 4133–42.
- [4] T.E. Nash, D.R. Hill, Giardiasis, in: Goldman's Cecil Med., 24th ed., Elsevier Inc., 2012: pp. 2040–2043.
- [5] M. of Health, *Giardia intestinalis*, (2001) 1–3.
- [6] R. Thompson, The impact of *Giardia* on Science and Society, in: G. Ortega-Pierres (Ed.), *Giardia Cryptosporidium* from Mol. to Dis., CABI North American Office, 2009: pp. 1–11.

- [7] J.A. Cotton, J.K. Beatty, A.G. Buret, Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections., *Int. J. Parasitol.* 41 (2011) 925–33.
- [8] S. Tangtrongsup, V. Scorza, Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp infections in dogs and cats., *Top. Companion Anim. Med.* 25 (2010) 155–62.
- [9] M. Olson, N. Leonard, J. Strout, Prevalence and diagnosis of *Giardia* infection in dogs and cats using a fecal antigen test and fecal smear, *Can. Vet. J.* 51 (2010) 16–18.
- [10] R. Rimhanen-Finne, M.-L. Hänninen, R. Vuento, J. Laine, T.S. Jokiranta, M. Snellman, et al., Contaminated water caused the first outbreak of giardiasis in Finland, 2007: a descriptive study., *Scand. J. Infect. Dis.* 42 (2010) 613–9.
- [11] A.E. Karon, K.D. Hanni, J.C. Mohle-Boetani, R.A. Beretti, V.R. Hill, M. Arrowood, et al., Giardiasis outbreak at a camp after installation of a slow-sand filtration water-treatment system., *Epidemiol. Infect.* 139 (2011) 713–7.
- [12] E.R. Daly, S.J. Roy, D.D. Blaney, J.S. Manning, V.R. Hill, L. Xiao, et al., Outbreak of giardiasis associated with a community drinking-water source., *Epidemiol. Infect.* 138 (2010) 491–500.
- [13] EPA, Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA, United States Prot. Agency. (2012) 83.
- [14] AWWA, PATHOGENIC PROTOZOA: 9711 *Giardia* and *Cryptosporidium* Methods, in: *Stand. Methods Exam. Water Wastewater*, 21st ed., American Public Health Association, Washington, D.C, 2012: pp. 9–161 to 9–169.
- [15] A. Garcia, W. Yanko, G. Batzer, G. Widmer, *Giardia* Cysts in Tertiary-Treated Wastewater Effluents: Are They Infective?, *Water Environ. Res.* 74 (2002) 541–544.
- [16] A.T. Campbell, P. Wallis, The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia* cysts, *Water Res.* 36 (2002) 963–969.
- [17] A.A. Mofidi, E.A. Meyer, P.M. Wallis, C.I. Chou, B.P. Meyer, S. Ramalingam, et al., The effect of UV light on the inactivation of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cysts as determined by animal infectivity assay (P-2951-01)., *Water Res.* 36 (2002) 2098–108.
- [18] W.Q. Betancourt, J.B. Rose, Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*., *Vet. Parasitol.* 126 (2004) 219–34.
- [19] A.M. Nasser, D. Vaizel-Ohayon, A. Aharoni, M. Revhun, Prevalence and fate of *Giardia* cysts in wastewater treatment plants., *J. Appl. Microbiol.* 113 (2012) 477–84.
- [20] P.L. Scheid, R. Schwarzenberger, Free-living amoebae as vectors of cryptosporidia., *Parasitol. Res.* 109 (2011) 499–504.
- [21] WHO, Determination of Helminth Eggs Viability, in: *Integr. Guid. To Sanit. Parasitol.*, World Health Organization, 2004: pp. 65–73.
- [22] S. Kabani, M. Waterfall, K.R. Matthews, Cell-cycle synchronisation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* using Vybrant DyeCycle Violet-based sorting., *Mol. Biochem. Parasitol.* 169 (2010) 59–62.
- [23] E. Bertogna, S.R. Santos, J.E.S. Paterniani, E. Conforti, C.M. Gallep, Compact, automatic set-up for ultra-weak photon emission measurements in organisms, in: *2011 SBMO/IEEE MTT-S Int. Microw. Optoelectron. Conf. (IMOC 2011)*, IEEE, 2011: pp. 449–452.
- [24] OriginLab, Boltzmann Function, *Append. 3 - Built-in Funct.* (2014) 1.
- [25] OriginLab, Fit Exponential, *Append. 3 - Built-in Funct.* (2014) 1.
- [26] R.C.A. Thompson, The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis., *Vet. Parasitol.* 126 (2004) 15–35.
- [27] L. Polley, Navigating parasite webs and parasite flow: emerging and re-emerging parasitic zoonoses of wildlife origin., *Int. J. Parasitol.* 35 (2005) 1279–94.

- [28] R.C.A. Thompson, S.J. Kutz, A. Smith, Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues., *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 6 (2009) 678–93.
- [29] P. Orlandi, D. Chu, J. Bier, G. Jackson, Parasites and the food supply, *Food Technol.* 56 (2002) 72–81.
- [30] S.L. Hayes, E.W. Rice, M.W. Ware, F.W. Schaefer, Low pressure ultraviolet studies for inactivation of *Giardia muris* cysts., *J. Appl. Microbiol.* 94 (2003) 54–9.
- [31] M. Belosevic, S. a Craik, J.L. Stafford, N.F. Neumann, J. Kruithof, D.W. Smith, Studies on the resistance/reactivation of *Giardia muris* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to medium-pressure ultraviolet radiation., *FEMS Microbiol. Lett.* 204 (2001) 197–203.
- [32] D. Li, S.A. Craik, D.W. Smith, M. Belosevic, Infectivity of *Giardia lamblia* cysts obtained from wastewater treated with ultraviolet light., *Water Res.* 43 (2009) 3037–46.
- [33] R. Iturriaga, S. Zhang, G.J. Sonek, H. Stibbs, Detection of respiratory enzyme activity in *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts using redox dyes and immunofluorescence techniques, *J. Microbiol. Methods*. 46 (2001) 19–28.
- [34] J. Barbosa, S. Costa-de-Oliveira, A.G. Rodrigues, C. Pina-Vaz, Optimization of a flow cytometry protocol for detection and viability assessment of *Giardia lamblia*., *Travel Med. Infect. Dis.* 6 (2008) 234–9.
- [35] G.H. Grit, E. Bénéré, A. Ehsan, N. De Wilde, E. Claerebout, J. Vercruysse, et al., *Giardia duodenalis* cyst survival in cattle slurry., *Vet. Parasitol.* 184 (2012) 330–4.
- [36] S. Nam, G. Lee, A new duplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts., *Biomed. Environ. Sci.* 23 (2010) 146–50.
- [37] R.H. Baque, A.O. Gilliam, L.D. Robles, W. Jakubowski, T.R. Slifko, A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters., *Water Res.* 45 (2011) 3175–84.
- [38] X.-Q. WANG, X.-M. DUAN, L.-H. LIU, Y.-Q. FANG, Y. TAN, Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester Fluorescent Dye for Cell Labeling, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 37 (2005) 379–385.
- [39] U.P. Cronin, M.G. Wilkinson, Monitoring growth phase-related changes in phosphatidylcholine-specific phospholipase C production, adhesion properties and physiology of *Bacillus cereus* vegetative cells., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2008) 1695–703.
- [40] S.R. dos Santos, M. Katsumata, R.M.B. Franco, N. Branco, J.E.S. Paterniani, C. de M. Gallep, Evaluation of CFDAE , C12-resazurin and Green SYTOX as staining probes for viability detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*, *Exp. Parasitol.* submitted (2014).
- [41] C. LEE, J. YANG, S. Park, Delayed luminescence imaging system and its application, *J. Int. Soc. Life Inf. Sci.* 22 (2004) 445–449.
- [42] H. V. Smith, B.H. Al-Adhami, R.A.B. Nichols, J.R. Kusel, J.O. Grady, Towards Methods for Detecting UV-induced Damage in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* Oocysts by Immunofluorescence Microscopy, in: Ortega-Pierres, G. Cacciò, S. Fayer, R. Mank, T.G. Smith, H. V. Thompson (Eds.), *Giardia Cryptosporidium From Mol. to Dis.*, CAB eBooks, 2009: pp. 179–197.
- [43] C.C. Brescia, S.M. Griffin, M.W. Ware, E.A. Varughese, A.I. Egorov, E.N. Villegas, *Cryptosporidium* propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts., *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 6856–63.

5 Considerações finais

Giardia e *Cryptosporidium* são organismos desafiadores em monitoramento ambiental, especificamente em monitoramento de qualidade de água. A detecção desses organismos é etapa obrigatória em muitas recomendações e legislações em diversos países. Inferir infecciosidade desses parasitos é tarefa importante, pois, somente através deste procedimento é que se podem avaliar os reais impactos na saúde pública e ambiental.

Métodos de detecção de infecciosidade em modelos animais e modelos celulares já foram descritos na literatura e são aceitos hoje como o melhor procedimento para análise de infecciosidade destes parasitos. No entanto, tais métodos requerem laboratórios com infraestrutura sofisticada, profissionais bem treinados além de biotérios para o cultivo e manutenção dos modelos animais.

Para uma estação de tratamento de água essa prática torna-se inviável do ponto de vista econômico. Além do mais, o tempo necessário para a obtenção dos resultados com esses modelos, torna inviável o uso desses nas ETA.

Detectar a viabilidade de *Cryptosporidium* e *Giardia* através de métodos moleculares tem sido objeto de estudos nos últimos anos. Desde o episódio de Milwaukee, diversos pesquisadores têm estudado a aplicação de marcadores fluorescentes com intuito de estimar a infecciosidade destes parasitos. Diversas metodologias estão descritas na literatura onde a correlação entre metabolismo celular, marcação de DNA, respirometria, detecção enzimática e morte celular são analisadas com uso de marcadores fluorescentes. Porém, muitas destas metodologias requerem o uso de equipamentos caros e, portanto, impeditivos para muitas estações de tratamento de água especialmente no Brasil.

O uso de microscopia de fluorescência tem sido empregado em larga escala na detecção, quantificação e análise da morfologia destes parasitos. Contudo, diversos pesquisadores relatam que essa técnica é extremamente laboriosa, demorada e requer profissionais altamente treinados em morfologia de parasitos para inferir presença/ausência em amostras ambientais.

Neste trabalho avaliou-se a aplicabilidade de dispositivos de fóton-contagem compactos na detecção de padrões de fluorescência retardada em cistos de *Giardia*, visando à caracterização desses comportamentos em função da viabilidade deste organismo. Os resultados aqui

apresentados demonstram a capacidade de detectar tais padrões em amostras marcadas com CFDA-SE, estando todas elas conectadas com as condições fisiológicas dos cistos analisados.

CFDA-SE já havia sido testado em 2011 como indicador de viabilidade em *C. parvum*. Porém, os dados aqui apresentados divergiram daqueles resultados. *Cryptosporidium* e *Giardia* vivos e infecciosos não são marcados por esse reagente e, portanto, um resultado positivo com CFDA-SE não indica viabilidade desses parasitos.

Os ensaios de fluorescência retardada executados no dispositivo projetado e a comparação com o dispositivo comercial demonstram que o uso desses equipamentos permite a detecção de padrões de DF, conectada com a condição fisiológica dos organismos. Embora CFDA-SE não apresente o comportamento descrito por Sheid e Schwarzenberger (2011), os resultados descritos nas Figuras 12 a 14 evidenciam que há diferenças significativas entre os diferentes grupos analisados em função da fluorescência retardada.

C12-resazurina e SYTOX Green apresentaram comportamentos semelhantes ao CFDA-SE. Os resultados descritos na Figura 8 mostram claramente que os (oo)cistos mortos são duplamente marcados com esses reagentes. Os dados descritos na Figura 8(B) demonstram que a permeabilidade da parede celular interfere na marcação com o reagente. Cistos de *Giardia* vivos (sem marcação), mortos (duplamente marcados) e provavelmente morrendo (marcados apenas com C12) podem ser observados naquela Figura. Esses resultados mostram que a perda da viabilidade dos cistos é acompanhada por diferentes interações com os reagentes, sendo esta interação relacionada com a idade dos cistos.

Do ponto de vista econômico, os resultados obtidos com fluorescência retardada na (PMT01) mostram-se promissores e futuros candidatos no monitoramento de qualidade de água. A câmara de fóton-contagem aqui projetada está orçada em U\$ 10 mil (dólares americanos). Já o dispositivo comercial Type6100-IR pode ser adquirido por U\$ 35 mil.

As evidências apontadas nesta pesquisa deixam claro que (oo)cistos vivos possuem comportamentos completamente diferentes daqueles estressados e mortos. Os resultados com as capturas de imagens descritas nas Figuras 8, 9 e 11, mais os dados de fluorescência retardada, sugerem a possibilidade da construção de um microscópio de fóton-contagem capaz de detectar organismos de interesse, classificá-los com base na captura de imagens e inferir viabilidade em função da fluorescência retardada.

6 Recomendações

Futuros trabalhos aplicando microscopia de fluorescência, aquisição de imagens com câmeras CCD de alta sensibilidade e fluorescência retardada após excitação luminosa, trarão avanços significativos na análise de viabilidade de parasitos. Tratamentos de imagens permitirão a aquisição de dados e identificação de organismos de interesse. Tratamentos matemáticos e estatísticos contribuirão para a análise da fluorescência retardada e identificação da viabilidade. Essa abordagem multidisciplinar permitirá o desenvolvimento de novos sistemas aplicados ao monitoramento de qualidade de água com resultados rápidos obtidos através de metodologia prática e de fácil execução.

7 Conclusões

Diante do contexto apresentado e com base nos resultados obtidos, é possível concluir que:

- Cistos de *G. intestinalis* e oocistos de *C. parvum* quando incubados em carboxifluoresceína-succinimidil-diacetato-éster, C12-resazurina e SYTOX Green - apresentam interações em função das condições fisiológicas dos organismos;
- Cistos de *G. intestinalis* e oocistos de *C. parvum* vivos e infecciosos não são marcados com CFDA-SE, C12-resazurina e SYTOX Green;
- Cistos de *G. intestinalis* sem estresse com mais de 30 dias de idade, apresentam fluorescência após incubação em CFDA-SE e C12-resazurina quando incubados em concentrações superiores a 0,5 μM ;
- Cistos de *G. intestinalis* e oocistos de *C. parvum* mortos apresentam dupla marcação celular com C12-resazurina e SYTOX Green;
- Cistos de *G. intestinalis* e oocistos de *C. parvum* mortos apresentam marcação celular com CFDA-SE;
- O tempo de exposição para captura de imagens em microscópio de epifluorescência depende da concentração do reagente e do estado metabólico dos organismos;
- Cistos de *G. intestinalis* irradiados com luz UV-254 nm, 18 W pelo período de 1h apresentaram fluorescência em microscópio de epifluorescência, cuja intensidade difere em função da concentração do marcador, sendo esta menor que aquela apresentada por cistos sem estresse;
- Cistos de *G. intestinalis* quando incubados em CFDA-SE 5,0 μM apresentam diferentes comportamentos em função da fluorescência retardada, estando conectada com as condições fisiológicas dos organismos;
- Dispositivos de fóton-contagem compactos permitem a detecção de fluorescência retardada em cistos de *G. intestinalis*;
- A fluorescência retardada é parâmetro que indica alterações morfológicas e fisiológicas em *G. intestinalis*;

- O decaimento luminescente após excitação com luz UV 365 nm pode ser analisado com base em modelos matemáticos do tipo Boltzman e Exponential Fitting Decay com correlações superiores a 95%;
- Curvas integrais são indicativas para distinguir cistos estressados daqueles vivos e sem estresse.

Os resultados apresentados demonstram que os dispositivos de fóton-contagem portáteis apresentam futuro promissor na análise de viabilidade de protozoários com resultados em poucas horas de análise frente aos testes em modelos animais. A técnica apresenta versatilidade e facilidade de execução além do baixo custo associado aos experimentos.

8 Referências Bibliográficas

- ADAM, R. D. Giardiasis. In: **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease**. 9. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. p. 668–672.
- AWWA. PATHOGENIC PROTOZOA: 9711 *Giardia* and *Cryptosporidium* Methods. In: **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington, D.C: American Public Health Association, 2012. p. 9–161 to 9–169.
- BARBOSA, J. et al. Optimization of a flow cytometry protocol for detection and viability assessment of *Giardia lamblia*. **Travel medicine and infectious disease**, v. 6, n. 4, p. 234–239, jul. 2008.
- BATTERMAN, S. et al. Sustainable control of water-related infectious diseases: a review and proposal for interdisciplinary health-based systems research. **Environmental health perspectives**, v. 117, n. 7, p. 1023–1032, jul. 2009.
- BELLAMY, J. E. C. Quality assurance considerations for detection of waterborne zoonotic parasites using *Cryptosporidium* oocyst detection as the main example. **Veterinary parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 235–248, 9 dez. 2004.
- BELOSEVIC, M. et al. Nucleic acid stains as indicators of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 7, p. 787–798, jul. 1997.
- BERTOONA, E. G. **Projeto, construção e aplicações de câmara escura portátil para medidas de bioluminescência ultra-fraca**. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Tese de Doutorado, 206 folhas, Campinas, 2013.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria MS n. 2.914/2011** Brasília Editora do Ministério da Saúde, , 2011.
- BRESCIA, C. C. et al. *Cryptosporidium* propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 21, p. 6856–6863, nov. 2009.
- CASTRO-HERMIDA, J. A. et al. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. **The Science of the total environment**, v. 405, n. 1-3, p. 45–53, 1 nov. 2008.
- CASTRO-HERMIDA, J. A. et al. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. **Water research**, v. 43, n. 17, p. 4133–4142, set. 2009.
- CHAIDEZ, C. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in irrigation water and its impact on the fresh produce industry. **International journal of environmental health research**, v. 15, n. 5, p. 339–345, out. 2005.
- CHEN, W. et al. Rapid determination of rice seed vigour by spontaneous chemiluminescence and singlet oxygen generation during early imbibition. **Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence**, v. 18, n. 1, p. 19–24, 2003.

- CORSO, P. S. et al. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 426–431, abr. 2003.
- COSTANZO, E. et al. Single seed viability checked by delayed luminescence. **European biophysics journal : EBJ**, v. 37, n. 2, p. 235–238, fev. 2008.
- COTTON, J. A.; BEATTY, J. K.; BURET, A. G. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 9, p. 925–933, 1 ago. 2011.
- CRAIK, S. A. et al. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation. **Water Research**, v. 35, n. 6, p. 1387–1398, abr. 2001.
- CRONIN, U. P.; WILKINSON, M. G. Monitoring growth phase-related changes in phosphatidylcholine-specific phospholipase C production, adhesion properties and physiology of *Bacillus cereus* vegetative cells. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1695–1703, dez. 2008.
- DE GRAAF, D. C. et al. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 1269–1287, ago. 1999.
- DIAS, G. M. F. et al. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1291–1300, dez. 2008.
- DRUMMEN, G. P. C. Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques - illuminating biological and biomedical research. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 12, p. 14067–14090, jan. 2012.
- EPA. **Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA** United States Protect Agency Environmental Protection Agency, , 2012. Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/labcert/upload/epa816r12001.pdf>>
- ETHELBERG, S. et al. A foodborne outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection. **Epidemiology and infection**, v. 137, n. 3, p. 348–356, mar. 2009.
- FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 37–56, 9 dez. 2004.
- FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in parasitology**, v. 20, n. 11, p. 531–536, nov. 2004.
- FORD, B. The Discovery of *Giardia*. **Microscope**, v. 53, n. September 2004, p. 147–153, 2005.
- FRANCO, R. M. B. **Infecções parasitárias em creche: estudo em uma área urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis***. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Rev Panam Infectol**, v. 9, n. 4, p. 36–43, 2007.
- FRANCO, R. M. B.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of cryptosporidial oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 205–207, mar. 2002.

- GAJADHAR, A. A.; ALLEN, J. R. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. **Veterinary parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 3–14, 9 dez. 2004.
- GALLEP, C. DE M. Ultraweak, spontaneous photon emission in seedlings: toxicological and chronobiological applications. **Luminescence**, n. doi: 10.1002/bio.2658, 28 mar. 2014.
- GALLEP, C. M.; SANTOS, A. M. O.; CONFORTI, E. Low-cost, simplified systems for photon-counting measurements in biological samples. **SBMO/IEEE MTT-S International Conference on Microwave and Optoelectronics, 2005.**, p. 188–191, 2005.
- GALLEP, C. M.; SANTOS, S. R. Photon-counts during germination of wheat (*Triticum aestivum*) in wastewater sediment solutions correlated with seedling growth. **Seed Science and Technology**, v. 35, n. 3, p. 607–614, 2007.
- GARCIA, A. et al. *Giardia* Cysts in Tertiary-Treated Wastewater Effluents: Are They Infective? **Water Environment Research**, v. 74, n. 6, p. 541–544, 1 nov. 2002.
- GENNACCARO, A. L. et al. Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Final Reclaimed Effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4983–4984, 5 ago. 2003.
- GOMEZ-BAUTISTA, M. et al. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1866–1870, maio 2000.
- GRACZYK, T. K. et al. Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. **Parasitology research**, v. 100, n. 2, p. 247–253, jan. 2007.
- GRIMASON, A. M. et al. Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced identification of *Cryptosporidium* spp oocysts in water samples. **Water Research**, v. 28, n. 3, p. 733–736, mar. 1994.
- GRIT, G. H. et al. *Giardia duodenalis* cyst survival in cattle slurry. **Veterinary parasitology**, v. 184, n. 2-4, p. 330–334, 23 mar. 2012.
- HAMMES, F.; BERNEY, M.; EGLI, T. Cultivation-independent Assessment of Bacterial Viability. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 124, n. November 2010, p. 123–150, jan. 2011.
- HAUGLAND, R. P. Introduction to Fluorescence Techniques. In: **Handybook of Fluorescent Probes and Research Products**. 9. ed. [s.l.] Molecular Probes, 2002. p. 1–6.
- HESPANHOL, I.; MIERZWA, J. C. **Água na Indústria: Uso racional e reúso**. 1. ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2005. p. 143
- HOEFEL, D. et al. A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. **Journal of microbiological methods**, v. 52, n. 3, p. 379–388, mar. 2003.
- INABA, H. Measurement of Biophoton from Human Body. **J Int Soc Life Inf Sci**, v. 18, n. 2, p. 448–452, 2000.

- ITURRIAGA, R. et al. Detection of respiratory enzyme activity in *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts using redox dyes and immunofluoresce techniques. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, n. 1, p. 19–28, 30 jul. 2001.
- KABANI, S.; WATERFALL, M.; MATTHEWS, K. R. Cell-cycle synchronisation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* using Vybrant DyeCycle Violet-based sorting. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 169, n. 1, p. 59–62, jan. 2010.
- KARANIS, P. *Giardia* and *Cryptosporidium*: Occurrence in Water Supplies. **Encyclopedia of Environmental Health**, p. 946–954, 2011.
- KARON, A. E. et al. Giardiasis outbreak at a camp after installation of a slow-sand filtration water-treatment system. **Epidemiology and infection**, v. 139, n. 5, p. 713–717, maio 2011.
- KATSUMATA, M. et al. Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Water research**, v. 40, n. 18, p. 3393–400, out. 2006.
- KATSUMATA, M. et al. New feature of delayed luminescence: preillumination-induced concavity and convexity in delayed luminescence decay curve in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 90, n. 3, p. 152–162, 28 mar. 2008.
- KEEGAN, A. et al. Effect of water treatment processes on *Cryptosporidium* infectivity. **Water research**, v. 42, n. 6-7, p. 1805–1811, mar. 2008.
- KESERUE, H.-A. et al. Comparison of rapid methods for detection of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. (oo)cysts using transportable instrumentation in a field deployment. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 16, p. 8952–8959, 21 ago. 2012.
- KIM, J. et al. Measurements of spontaneous ultraweak photon emission and delayed luminescence from human cancer tissues. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, v. 11, n. 5, p. 879–884, out. 2005.
- KOTHAVADE, R. J. Potential molecular tools for assessing the public health risk associated with waterborne *Cryptosporidium* oocysts. **Journal of medical microbiology**, v. 61, n. Pt 8, p. 1039–1051, ago. 2012.
- LALLO, M. A.; BONDAN, E. F. Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 1, p. 120–125, fev. 2006.
- LEAL, D. A. G.; FRANCO, R. M. B. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. **Rev Panam Infectol**, v. 10, n. 4, p. 48–57, 2008.
- LEE, M. Y. et al. A survey of *Cryptosporidium* oocysts in water supplies during a 10-year period (2000-2009) in Seoul. **The Korean journal of parasitology**, v. 48, n. 3, p. 219–224, set. 2010.
- LI, D. et al. Infectivity of *Giardia lamblia* cysts obtained from wastewater treated with ultraviolet light. **Water research**, v. 43, n. 12, p. 3037–3046, jul. 2009.
- MAC KENZIE, W. R. et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **The New England journal of medicine**, v. 331, n. 3, p. 161–167, 21 jul. 1994.

- MOLDEN, D. et al. Improving agricultural water productivity: Between optimism and caution. **Agricultural Water Management**, v. 97, n. 4, p. 528–535, abr. 2010.
- MOLDEN, D.; VITHANAGE, M.; FRAITURE, C. Water availability and its use in agriculture. **Treatise on Water Science**, v. 4, p. 707–732, 2011.
- MONIS, P. .; THOMPSON, R. C. . *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 233–244, nov. 2003.
- NASH, T. E.; HILL, D. R. Giardiasis. In: **Goldman's Cecil Medicine**. 24. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. v. 2p. 2040–2043.
- NETO, R. C. et al. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, southeast Brazil. **Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 62, n. 1, p. 217–222, jan. 2010.
- NEUMANN, N. F. et al. Comparison of animal infectivity and nucleic acid staining for assessment of *Cryptosporidium parvum* viability in water. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 1, p. 406–412, jan. 2000.
- NICHOLS, R. A. B.; CAMPBELL, B. M.; SMITH, H. V. Identification of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in United Kingdom Noncarbonated Natural Mineral Waters and Drinking Waters by Using a Modified Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4183–4189, 1 jul. 2003.
- NOOMNARM, U.; CLEGG, R. M. Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations. **Photosynthesis research**, v. 101, n. 2-3, p. 181–194, 2009.
- ORIGINLAB. **Boltzmann Function**. Disponível em: <<http://www.originlab.com/www/helponline/origin/en/UserGuide/Boltzmann.html>>.
- ORIGINLAB. **Fit Exponential**. Disponível em: <http://originlab.com/doc/Origin-Help/Fitting-Exponential#Second_order_exponential_decay_28Exponential_Decay.2C_2_term.26ldots.3B.29>.
- PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 213, n. 5, p. 321–333, set. 2010.
- POLLEY, L. Navigating parasite webs and parasite flow: emerging and re-emerging parasitic zoonoses of wildlife origin. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1279–94, out. 2005.
- REAL, F.; POUCHELET, M.; RABINOVITCH, M. *Leishmania* (L.) *amazonensis*: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. **Experimental parasitology**, v. 119, n. 1, p. 15–23, maio 2008.
- ROCHELLE, P. A. et al. **Comparing Cell Culture and Mouse Assays for Measuring Infectivity of *Cryptosporidium***. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.waterrf.org/PublicReportLibrary/91027F.pdf>>.
- ROSS, J. A. et al. Measurement of action spectra of light-activated processes. **Journal of biomedical optics**, v. 11, n. 1, p. 014008–1 – 4, 2006.

- SANTOS, L. U. DOS et al. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 115–120, jun. 2011.
- SANTOS, S. R.; PATERNIANI, J. E. S.; GALLEP, C. M. Detecção de emissão espontânea de luz em ensaios de colimetria aplicados ao monitoramento de efluentes sanitários. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 16, n. 1, p. 55–62, mar. 2011.
- SCHEID, P. L.; SCHWARZENBERGER, R. Free-living amoebae as vectors of cryptosporidia. **Parasitology research**, v. 109, n. 2, p. 499–504, ago. 2011.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jun. 2012.
- SCHWARZENBACH, R. P. et al. Global Water Pollution and Human Health. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 35, n. 1, p. 109–136, 21 nov. 2010.
- SCOTT, R. Q.; INABA, H. Single photon counting imagery. **Journal of bioluminescence and chemiluminescence**, v. 4, n. 1, p. 507–511, jul. 1989.
- SILVA, C. DA et al. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitas em hortaliças consumidas in natura, no Recife. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, p. 63–69, 2005.
- SIMMONS, O. D.; SOBSEY, M. D. A chemiluminescent immunofocus assay (CIFA) for non-microscopic enumeration of *Cryptosporidium parvum* infectivity in cell culture. **Water science and technology**, v. 47, n. 3, p. 137–142, jan. 2003.
- SMITH, H.; GRIMASON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. **The Handbook of Water and Wastewater Microbiology**, p. 695–756, 2003.
- SMITH, H. V. et al. Significance of Enhanced Morphological Detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in Water Concentrates Determined by Using 4',6'-Diamidino-2-Phenylindole and Immunofluorescence Microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5198–5201, 1 out. 2002.
- SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B. *Cryptosporidium*: detection in water and food. **Experimental parasitology**, v. 124, n. 1, p. 61–79, jan. 2010.
- SPRONG, H.; CACCIÒ, S. M.; VAN DER GIESSEN, J. W. B. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 12, p. e558, jan. 2009.
- STOREY, M. V.; VAN DER GAAG, B.; BURNS, B. P. Advances in on-line drinking water quality monitoring and early warning systems. **Water research**, v. 45, n. 2, p. 741–747, jan. 2011.
- TASHYREVA, D.; ELSTER, J.; BILLI, D. A novel staining protocol for multiparameter assessment of cell heterogeneity in *Phormidium* populations (cyanobacteria) employing fluorescent dyes. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e55283, jan. 2013.
- THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 15–35, 9 dez. 2004.
- TRAVASSOS, T.; CARVALHO, R. DE. Estado atual do conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 1, p. 1–16, 2009.

- TUDISCO, S. et al. Advanced research equipment for fast ultraweak luminescence analysis. **Review of Scientific Instruments**, v. 74, n. 10, p. 4485, 2003.
- URBANO, L.; FRANCO, R. M. B. Criptosporidiose. In: AMATO NETO, V. et al. (Eds.). **Parasitologia: uma abordagem clínica**. 1a. ed. São Paulo: Elsevier, 2008. p. 59–65.
- VAREA, M. et al. Fuchsin fluorescences and autofluorescence in *Cryptosporidium*, *Isospora* and *Cyclospora* oocysts. **International journal for parasitology**, v. 28, p. 1881–1883, 1998.
- VERONESI, F. et al. Epidemiological survey on equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Italy and molecular characterization of isolates. **Zoonoses and public health**, v. 57, n. 7-8, p. 510–7, dez. 2010.
- WANG, X.-Q. et al. Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester Fluorescent Dye for Cell Labeling. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 6, p. 379–385, jun. 2005.
- WHO. Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*). In: **Guidelines for drinking-water quality: Addendum Microbiological agents in drinking water**. Geneva: World Health Organization, 2002. p. 70–118.
- WHO. **Guidelines for drinking-water quality**. 4. ed. Switzerland: World Health Organization, 2011. v. 38p. 564
- WOODALL, C. J. Waterborne diseases – What are the primary killers? **Desalination**, v. 248, n. 1-3, p. 616–621, nov. 2009.
- ZARLENGA, D. S.; TROUT, J. M. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. **Veterinary parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 195–217, 9 dez. 2004.

Apêndice (1)

Construção da Câmara de fóton-contagem

Compilação a partir de: BERTOOGNA, E. G. **Projeto, construção e aplicações de câmara escura portátil para medidas de bioluminescência ultra-fraca**. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Tese de Doutorado, 206 folhas, Campinas, 2013.

Projeto da Parte Mecânica da Câmara Escura

A parte mecânica da câmara escura capaz de acomodar diversos tipos de amostras biológicas, válvula fotomultiplicadora PMT e iluminador, foi feita em aço inox, sendo as dimensões das partes inferior e superior, mostradas na Figura A1. Nas Figuras A2 e A3 são apresentados os detalhes construtivos da câmara.

O projeto consiste também de adaptações para diferentes experimentos em desenvolvimento no laboratório de fotônica aplicada (LaFA) a saber:

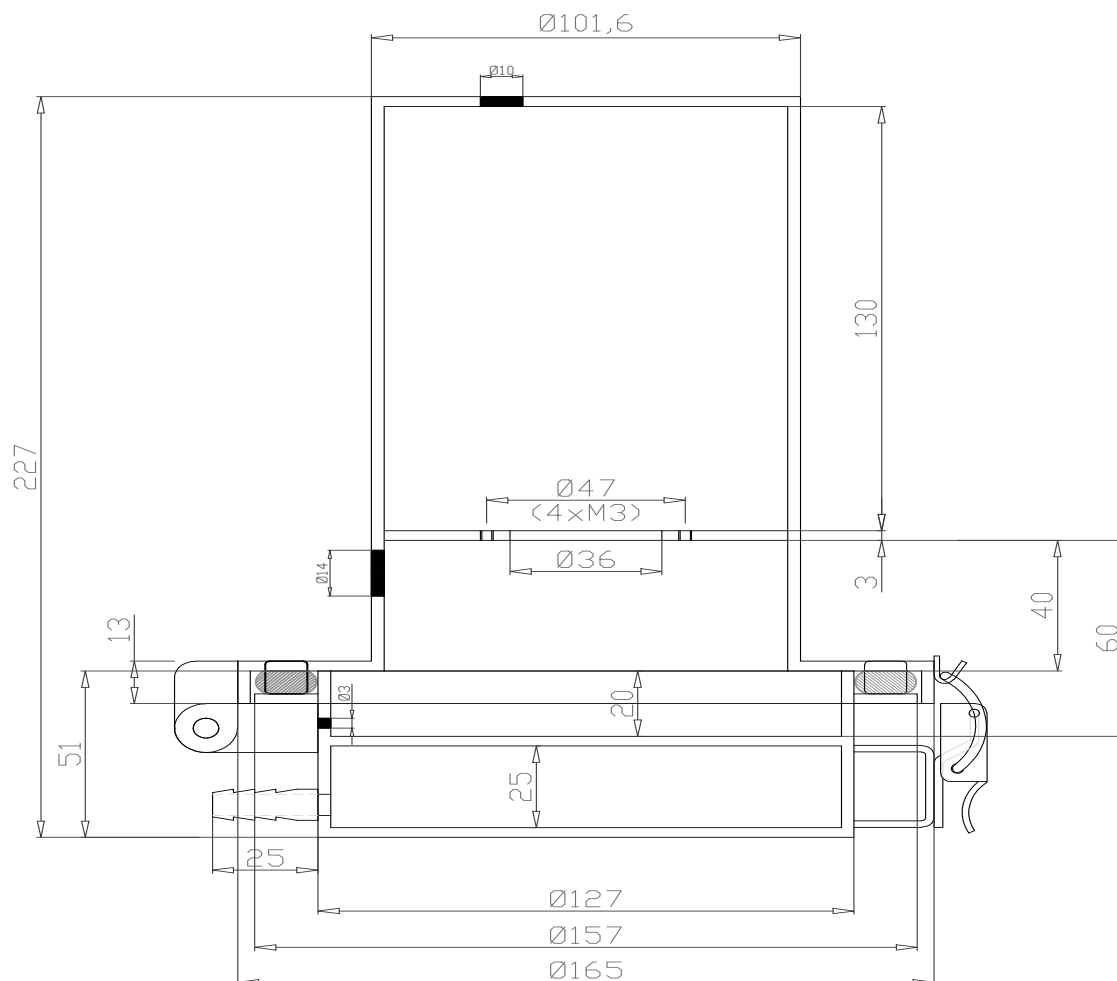
- Ensaios em agronomia;
- Ensaios em microbiologia;
- Ensaios de ecotoxicologia;
- Fluorescência retardada em amostras biológicas.

Figura A 1 - Detalhes construtivos da câmara de fóton-contagem em aço inox.



Fonte: Bertogna (2013).

Figura A 2 Projeto original da câmara de fóton-contagem. Medidas em milímetros (mm)



Fonte: Bertogna (2013).

Cuidado especial foi tomado na vedação das partes superior e inferior da câmara quando fechada, já que nenhuma luz deve ser capaz de entrar no interior desta. De forma ainda a garantir a integridade da válvula fotomultiplicadora contra a sua ativação inadvertida quando a câmara estiver aberta um push-button do tipo normalmente aberto foi colocado de modo que somente quando a câmara estiver fechada será possível o acionamento da PMT através do programa de controle feito em LabVIEW.

Na Figura A3 é mostrado o sistema de vedação utilizado para evitar a entrada de luz externa no sistema de fóton-contagem. Detalhe para o dispositivo de desarme do sistema de fornecimento de energia para a operação da câmara. A adoção deste procedimento permite maiores seguranças operacionais e protege a câmara de eventuais acidentes como abertura quando em operação. Desta forma a válvula PMT é completamente desligada e assim evita-se o seu desgaste por conta do excesso de luz dentro da câmara.

Figura A 3 Detalhes construtivos do sistema de fóton-contagem com dispositivo de proteção que impede o acionamento da válvula fotomultiplicadora quando a câmara encontra-se aberta. À esquerda destaca-se o sistema de vedação com borracha seladora. À direita o sistema de proteção do tipo “Push-Botton”



Fonte: Bertogna (2013).

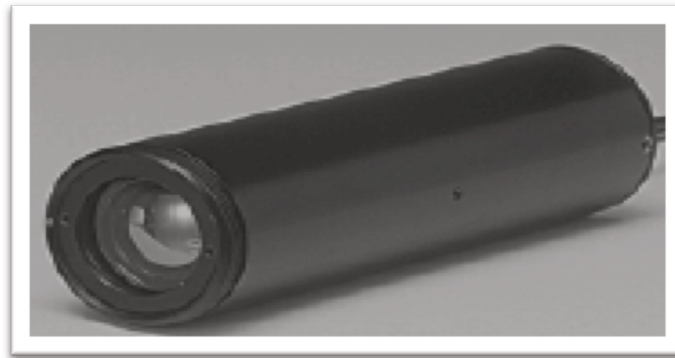
Projeto da Parte Eletrônica da Câmara Escura

Os dispositivos que constituem o sistema eletrônico de detecção e contagem de fótons são descritos a seguir. Basicamente o sistema eletrônico da câmara escura é constituído do módulo PMT, placa de contagem de pulsos USB, dispositivo iluminador anelar da amostra, shutter para a fonte de luz do iluminador, controlador de temperatura da amostra e fonte de alimentação controlada via GPIB.

Módulo PMT

O Módulo PMT da empresa japonesa Hamamatsu modelo H7360, cuja foto é mostrada na Figura A4 incorpora válvula fotomultiplicadora sensível ao espectro da luz visível e circuitos eletrônicos associados, fonte de alta tensão e condicionador de pulsos. Este módulo, portanto detecta e condiciona os pulsos de contagem que serão entregues à placa de contagem com um mínimo de circuitos eletrônicos sendo necessária apenas uma fonte de tensão contínua de +5V.

Figura A 4 Foto do módulo PMT modelo H7360 da Hamamatsu Corp. utilizado no sistema.

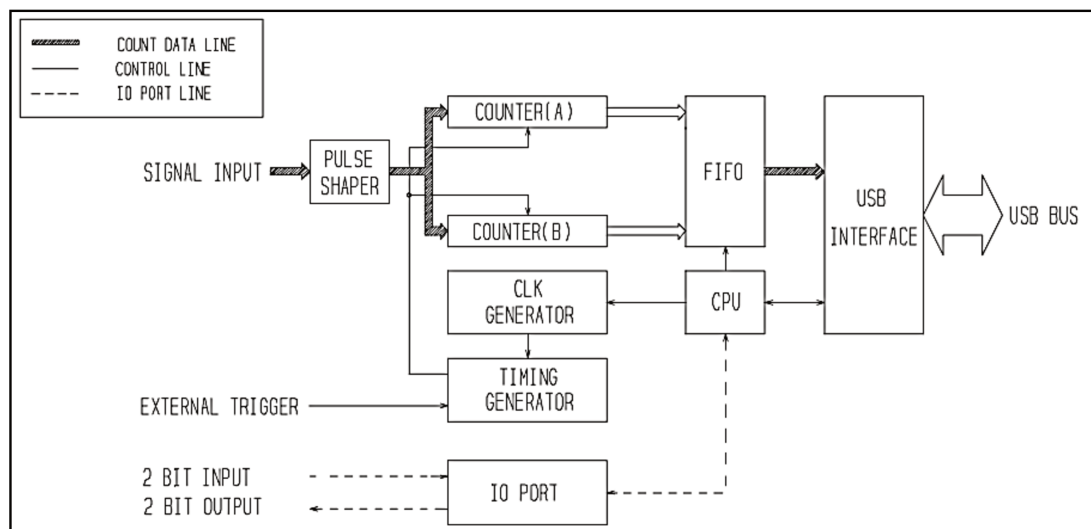


Fonte: Bertogna (2013)

Placa de Contagem USB

A Placa de Contagem de pulsos, modelo C8855, também da empresa Hamamatsu possui interface de comunicação USB para a transferência de dados com o PC, sendo capaz de proporcionar intervalos de contagem de dezenas de milissegundos a dezenas de segundos conforme mostra a Figura A5.

Figura A 5 Esquema eletrônico da placa de fóton-contagem



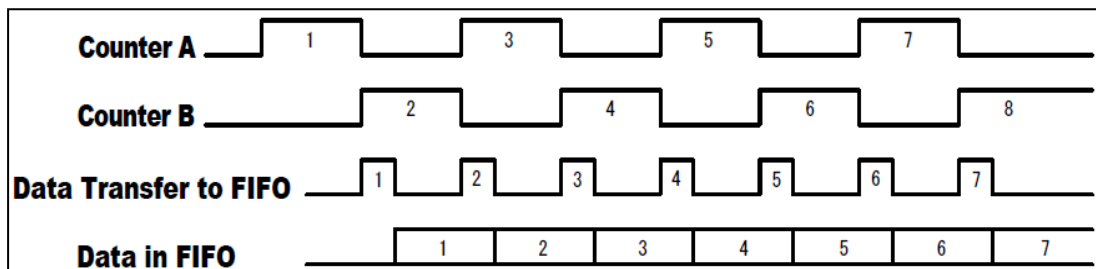
Fonte: Bertogna (2013)

De acordo com a Figura A5, esta placa de contagem é micro-controlada e possui memória tipo FIFO (first-in first-out) alimentada por dois contadores (A e B) o que permite a contagem dos pulsos provenientes do condicionador de pulsos logo após a entrada de sinal de contagem.

Na Figura A6 é descrito resumidamente o esquema de dupla contagem da placa de fóton-contagem. Nela é possível observar que quando um contador termina uma contagem no intervalo de tempo especificado no painel frontal, o outro contador imediatamente inicia a contagem

subsequente, possibilitando que o dado de contagem do canal que concluiu a contagem possa ser transferido através do barramento USB para o PC.

Figura A 6 Temporização da contagem de pulsos de fótons



Fonte: Bertogna (2013).

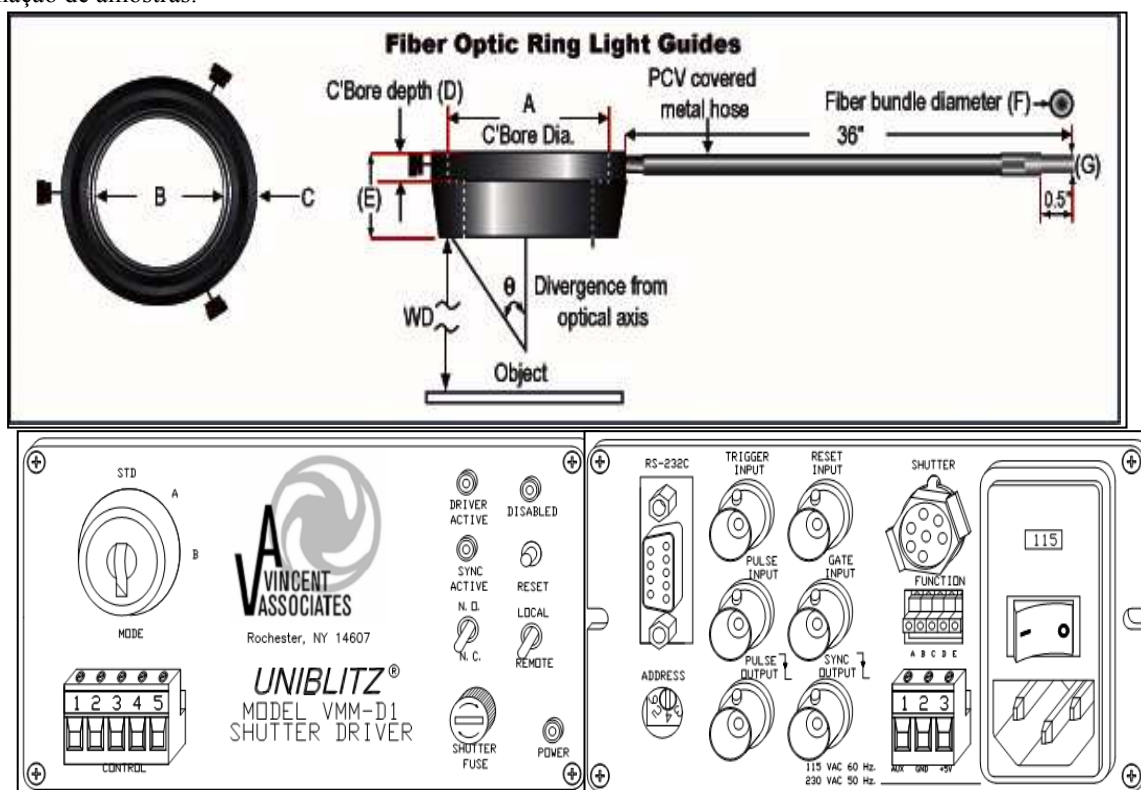
O micro-controlador se comunica via USB com o aplicativo no PC de modo a controlar e selecionar as várias funções da placa tais como: origem do sinal de trigger que pode ser interno ou externo, ativação dos dois pinos de entrada e saída (I/O) de uso geral padrão TTL, ativação da saída de tensão DC, dentre outras funções.

Illuminador Anelar

O dispositivo iluminador anelar consiste de um guia de luz de fibra óptica com um anel iluminador na saída da luz o qual é fixado 20 mm acima do local para amostra de modo a proporcionar uma iluminação uniforme no interior da câmara. O iluminador anelar escolhido para o projeto é fabricado pela Edmund Optics, modelo cujo desenho esquemático é mostrado na Figura A7.

Este iluminador será usado em experimentos de detecção da luminescência retardada que a qual é produzida logo após a amostra biológica ser submetida a uma fonte de luz. A fonte de luz deve ser completamente desligada antes que o módulo PMT possa ser acionado, o que é garantido pelo programa de controle em LabVIEW através de um driver controlador de shutters modelo VMM-D1 da empresa Uniblitz, conectado através de uma interface RS232 com um PC e que aciona e desliga o shutter que acopla a luz ao guia de luz do iluminador anelar.

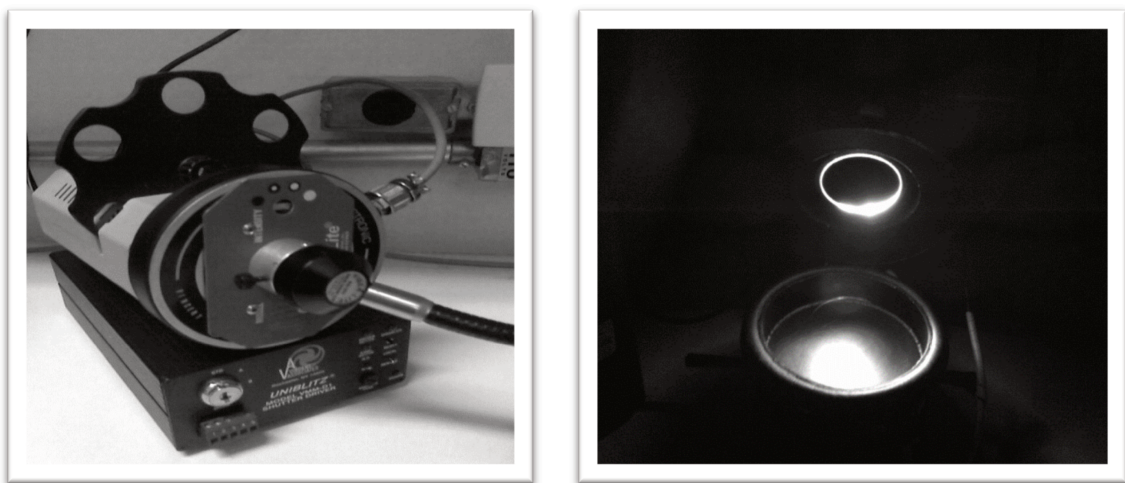
Figura A 7 Sistema de iluminação para ensaios com luminescência retardada. No topo anel iluminador composto de fibra óptica e anel distribuidor homogêneo de luz. Abaixo esquema do driver de controle do obturador para iluminação de amostras.



Fonte: Bertogna (2013).

Imagem ilustrando a fonte de luz sobre o driver para acionamento do shutter desta está mostrado na Figura A8. Apresenta-se também o cabo de fibra óptica que conduz a luz a partir da fonte iluminadora composta de lâmpada halôgena, shutter e disco para colocação e seleção de filtros ópticos. Ao lado encontra-se a foto do sistema iluminador em operação com luz branca.

Figura A 8 Foto da fonte de luz sobre o driver do shutter, e o disco de filtros ópticos e cabo de fibra óptica além do sistema iluminador em operação.



Fonte: Bertogna (2013).

Controlador de Temperatura

O hardware do controlador de temperatura está baseado em um sistema micro-controlado de 8 bits e driver de potência baseado em TRIAC controlado por ângulo de fase, acionando uma resistência para aquecimento de um fluido circulante no reservatório situado na base da câmara logo abaixo do local para a placa de petri.

A comunicação do controlador com o PC implementada utiliza a comunicação serial padrão RS232, sendo esta escolhida por estar presente na maioria dos micro-controladores comerciais de 8 bits, e de fácil programação e utilização, ainda com a possibilidade de se usar um conversor de RS232 para USB, caso o PC não possua a interface RS232, o que vem se tornando a realidade atual.

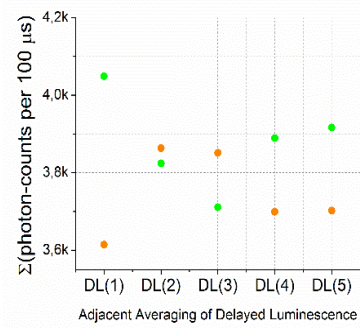
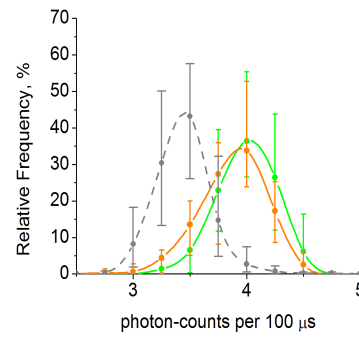
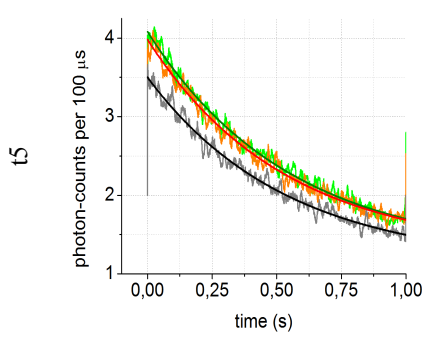
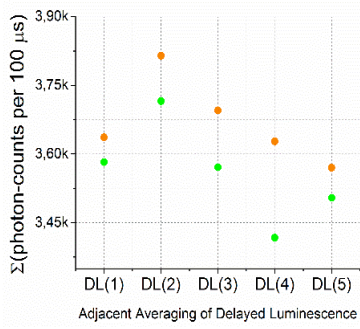
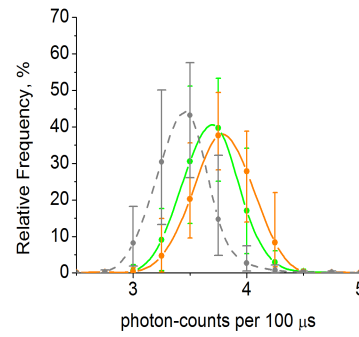
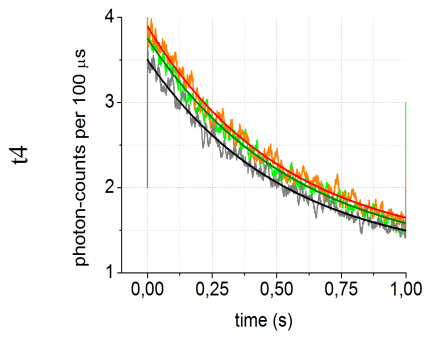
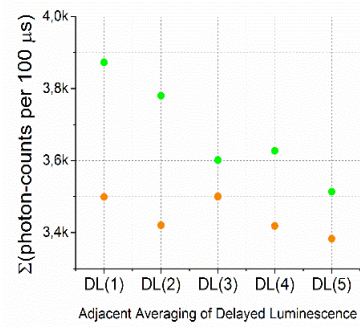
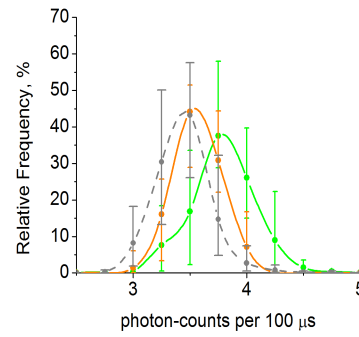
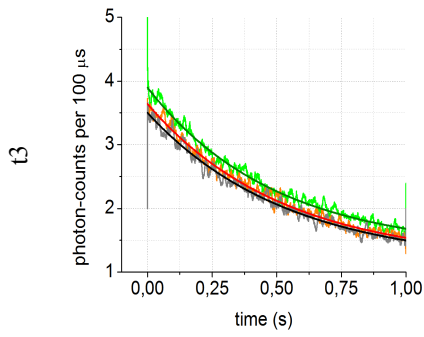
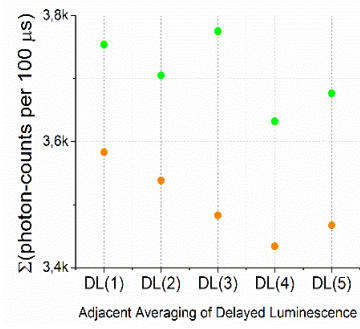
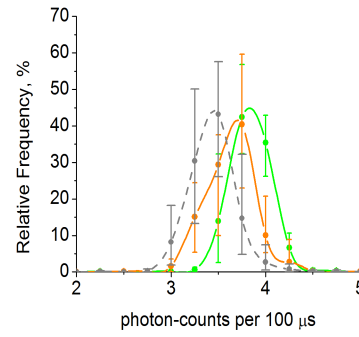
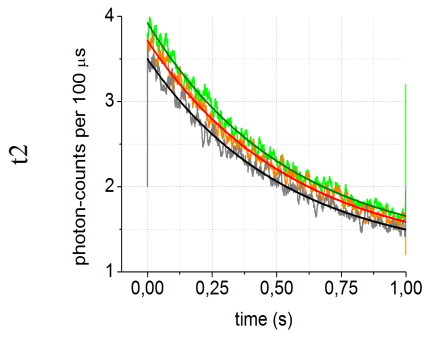
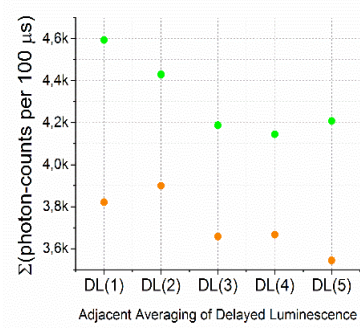
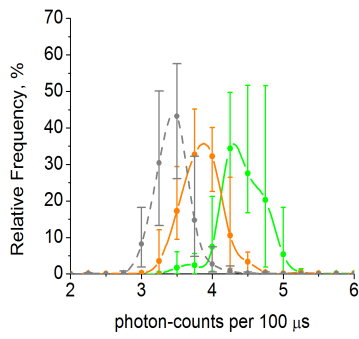
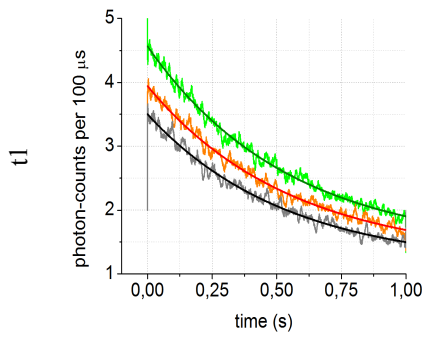
O sensor de temperatura no interior da câmara escura é do tipo integrado LM35 que informa a temperatura através de um conversor analógico/digital presente no micro-controlador. O sinal do sensor recebido pelo micro-controlador fecha a malha de controle do algoritmo PID para chegar ao menor erro possível em relação ao valor da temperatura desejada. No instrumento virtual em LabVIEW são apresentados o valor da temperatura desejada e o valor real informado pelo sensor de temperatura, além do canal serial utilizado.

Apêndice (2)

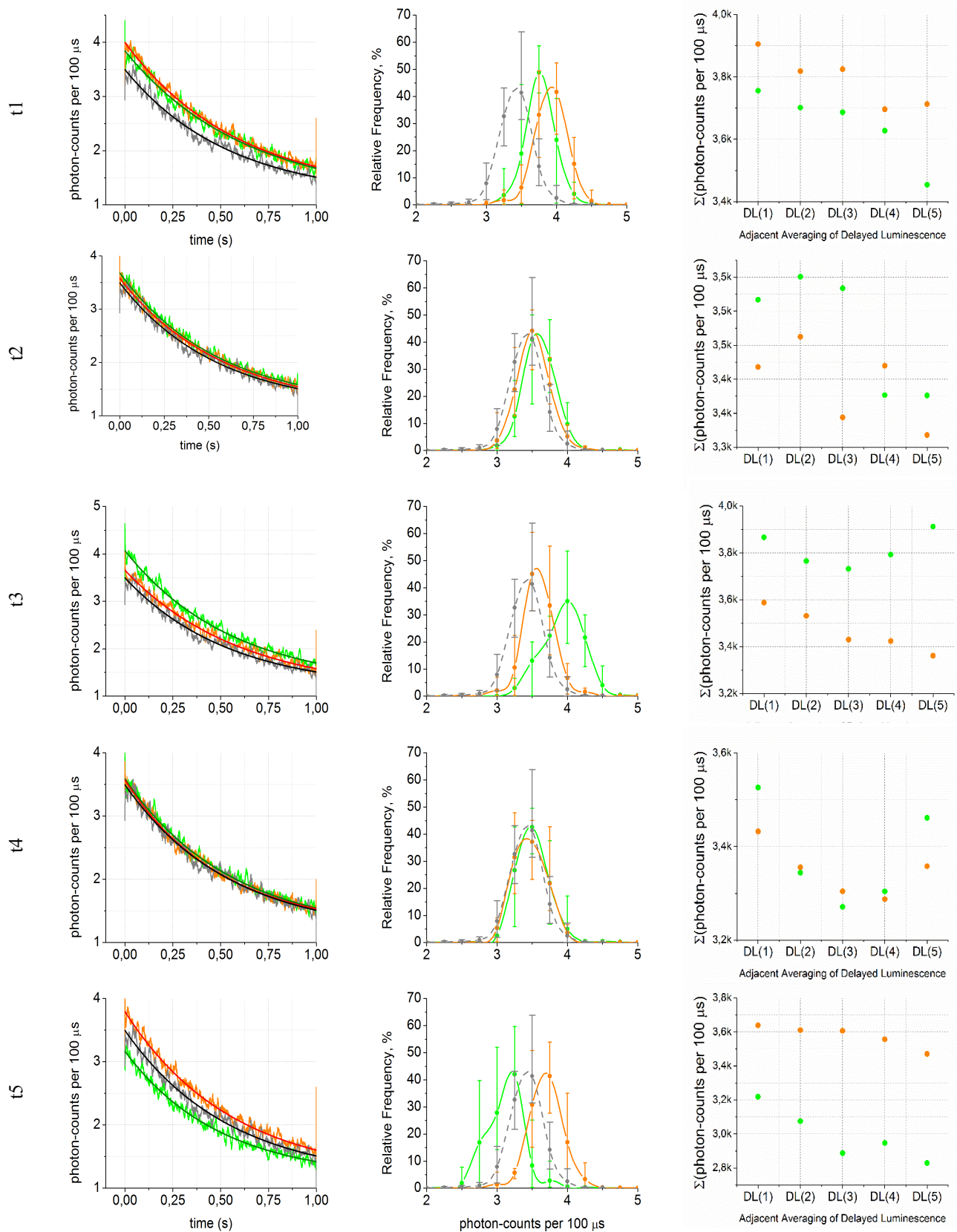
**Ensaio de Fluorescência Retardada em
cistos de *G. intestinalis***

Luz branca PMT

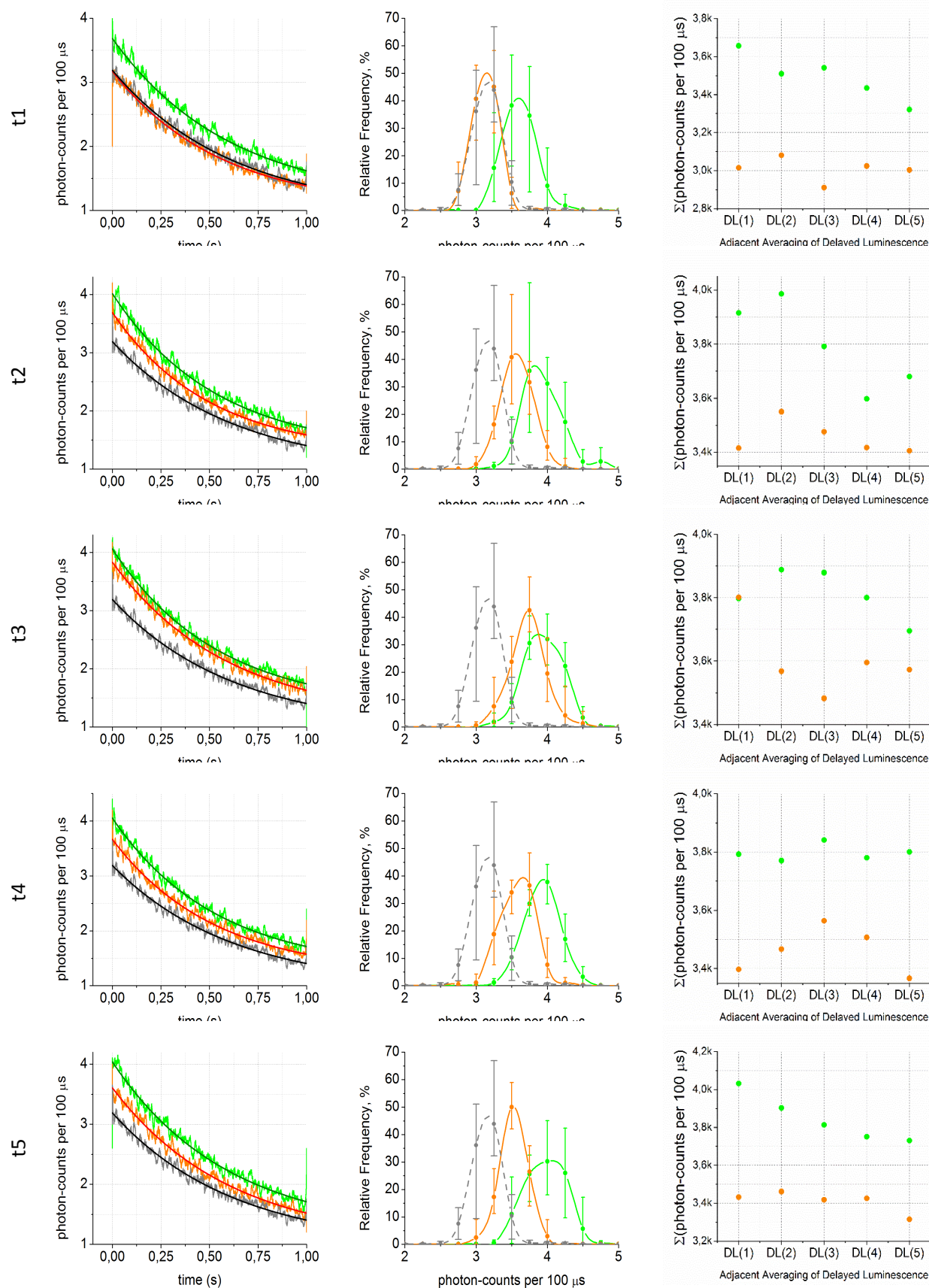
***G. intestinalis* – Série A – 2.5×10^2 cistos/100 μ L – CFDA-SE 5 μ M**



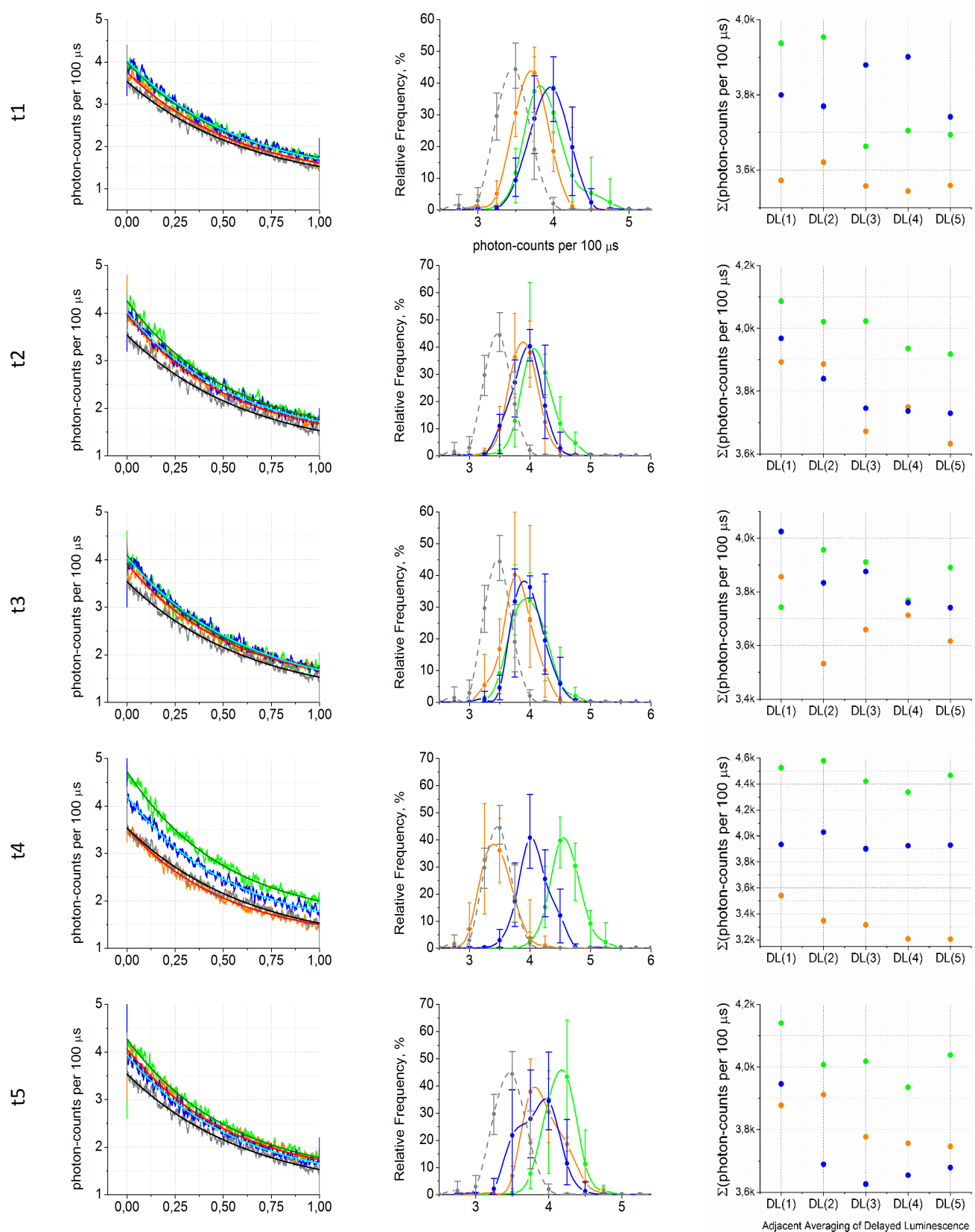
***G. intestinalis* – Série A – 2.5×10^3 cistos/100 μL – CFDA5E 5 μM**



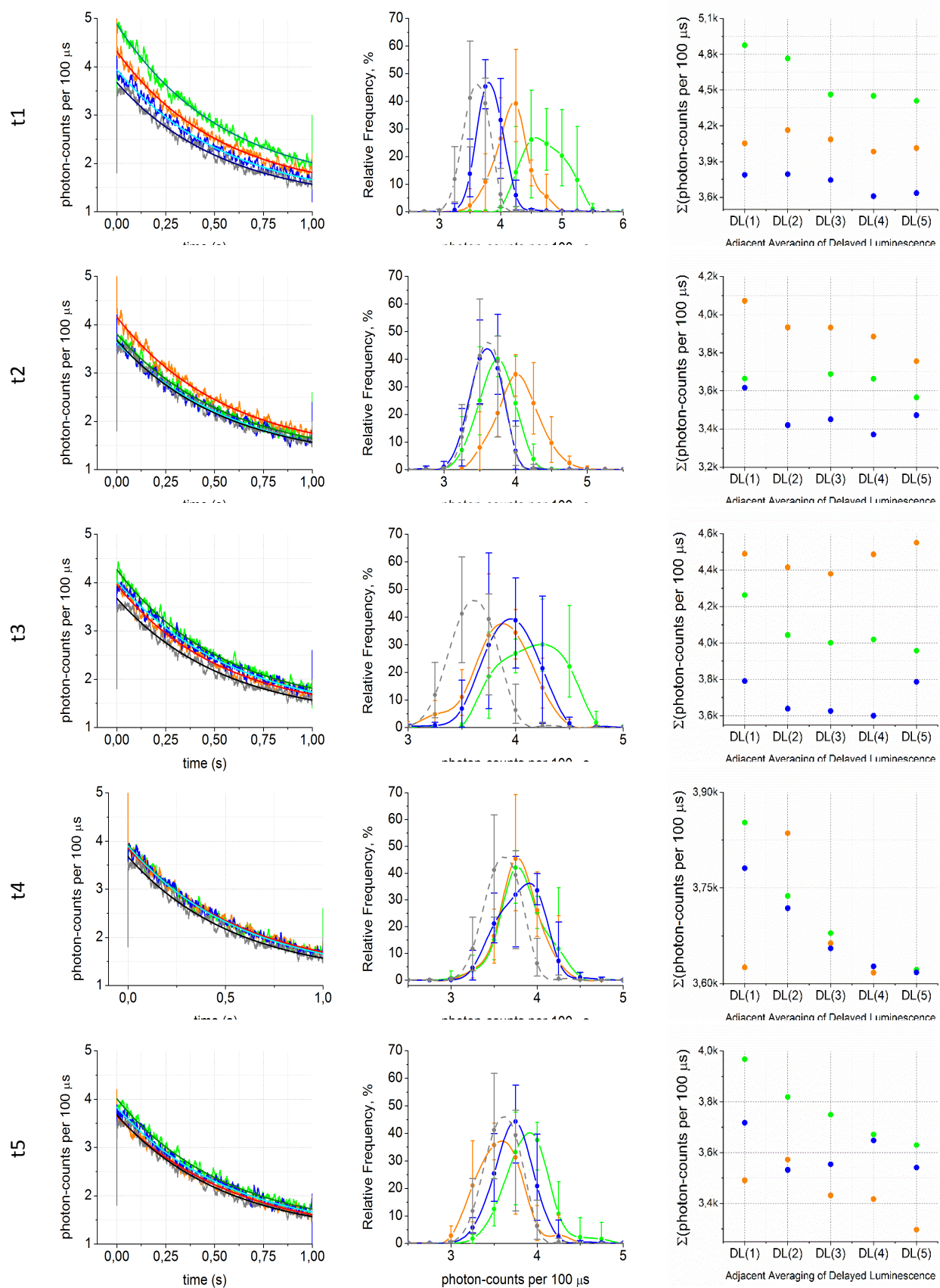
***G. intestinalis* – Série A – 2.5×10^4 cistos/100 μ L – CFDA5E 5 μ M**



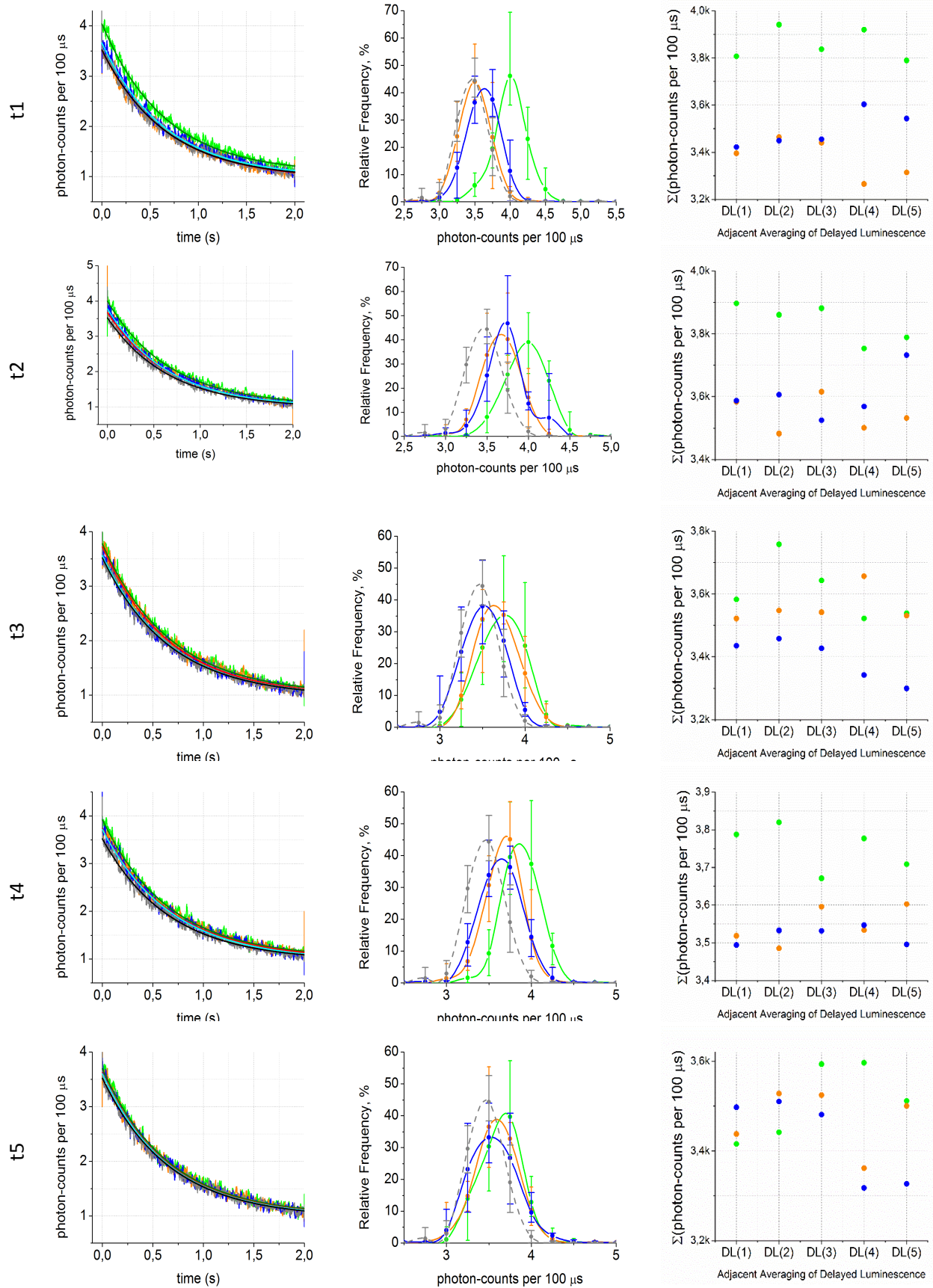
***G. intestinalis* – Série B – 5×10^3 cistos/100 μL – CFDA5E 5 μM**



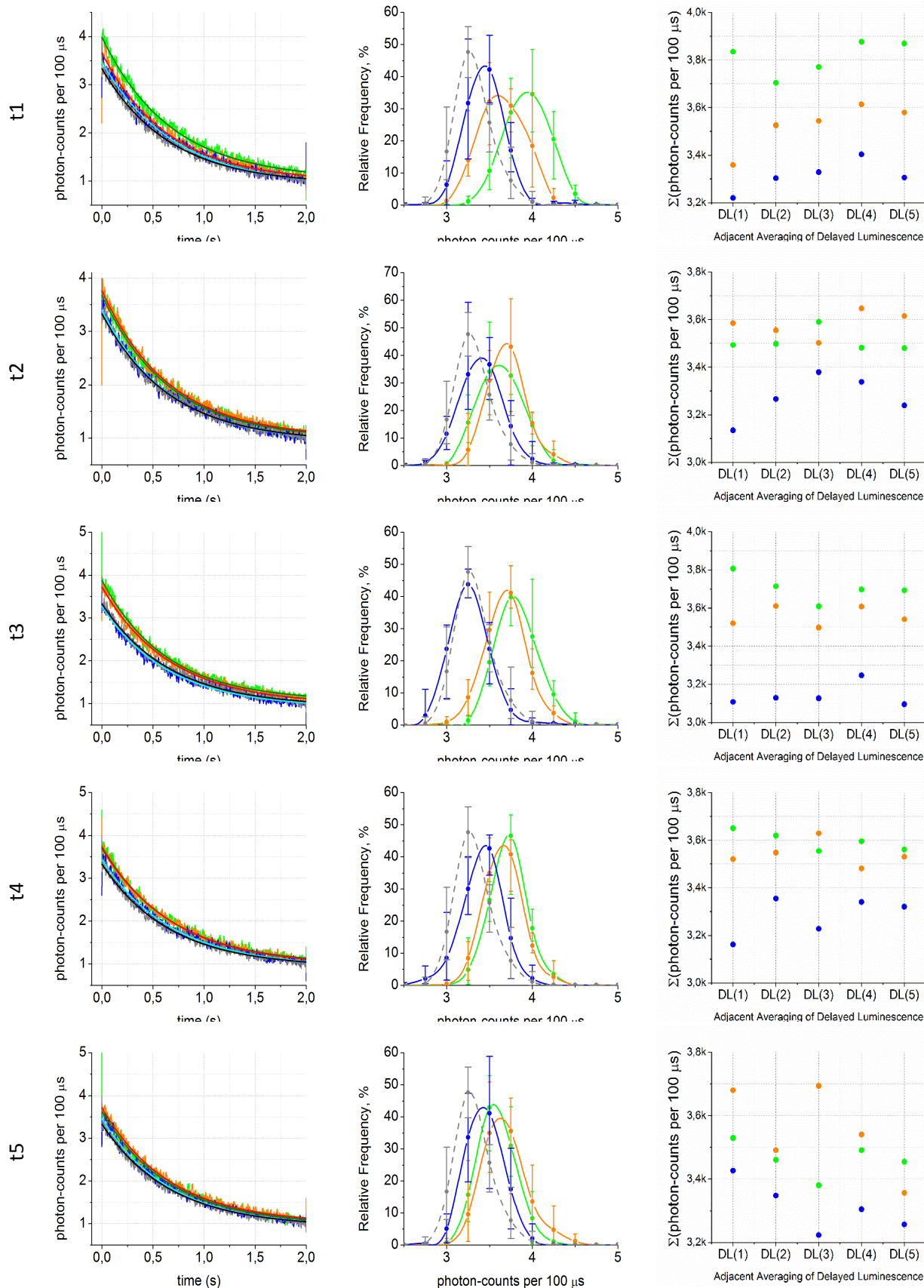
***G. intestinalis* – Série B – 2×10^4 cistos/100 μL – CFDA5 5 μM**



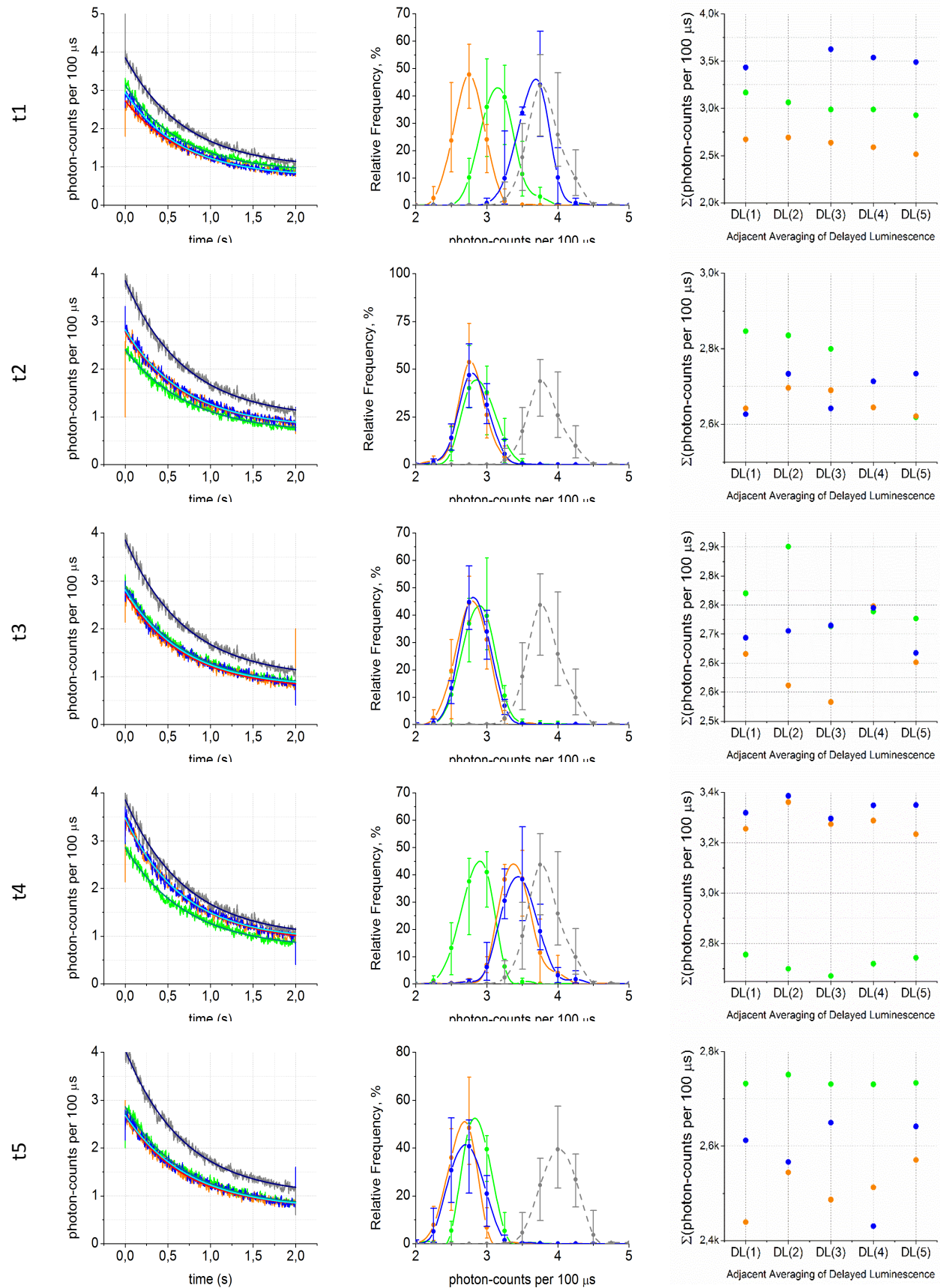
***G. intestinalis* – Série C – 5×10^3 cistos/100 μ L – CFDASE 5 μ M**



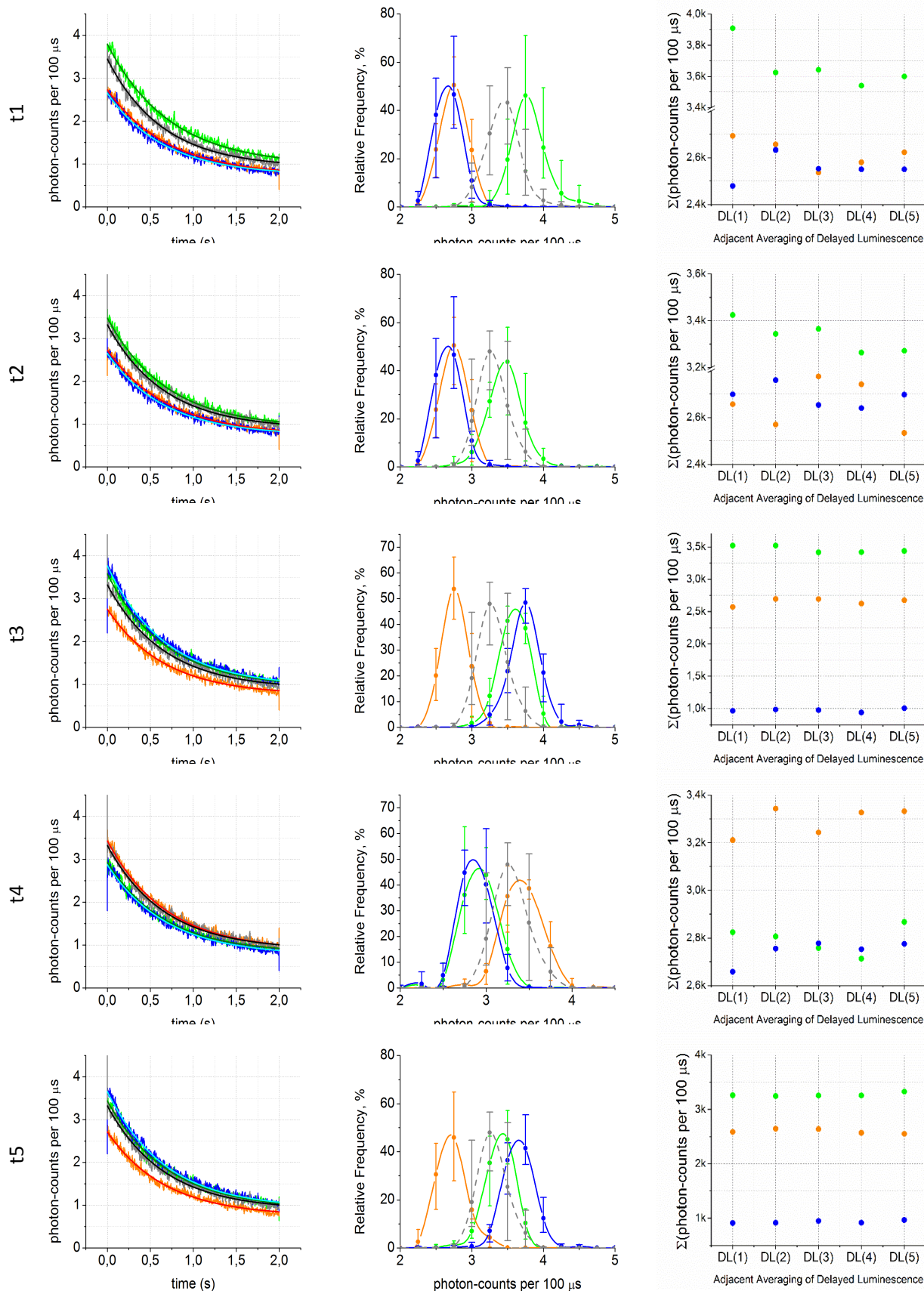
***G. intestinalis* – Série C – 2×10^4 cistos/100 μ L – CFDASE 5 μ M**



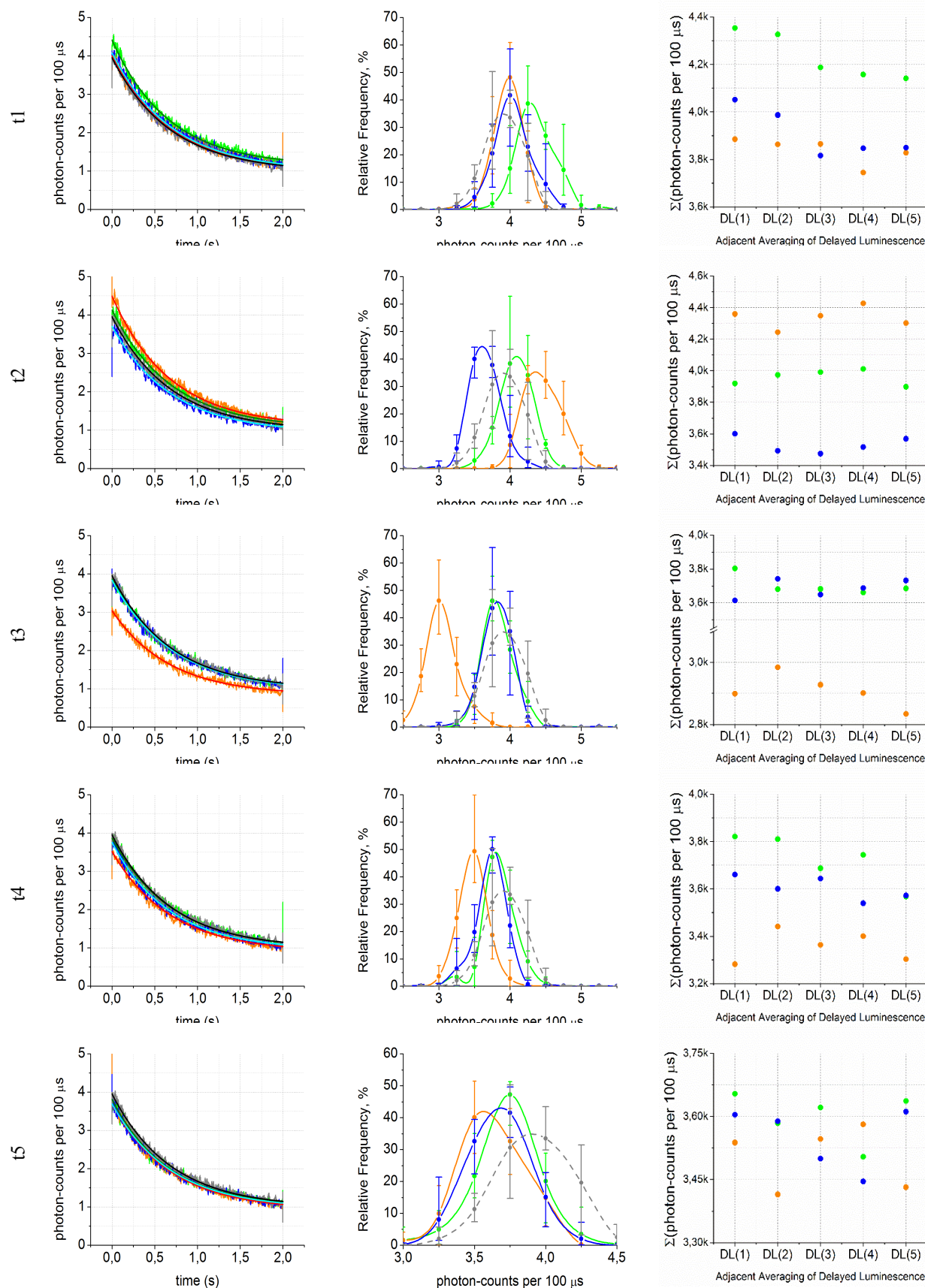
***G. intestinalis* – Série D – 2×10^2 cistos/100 μ L – CFDASE 5 μ M**

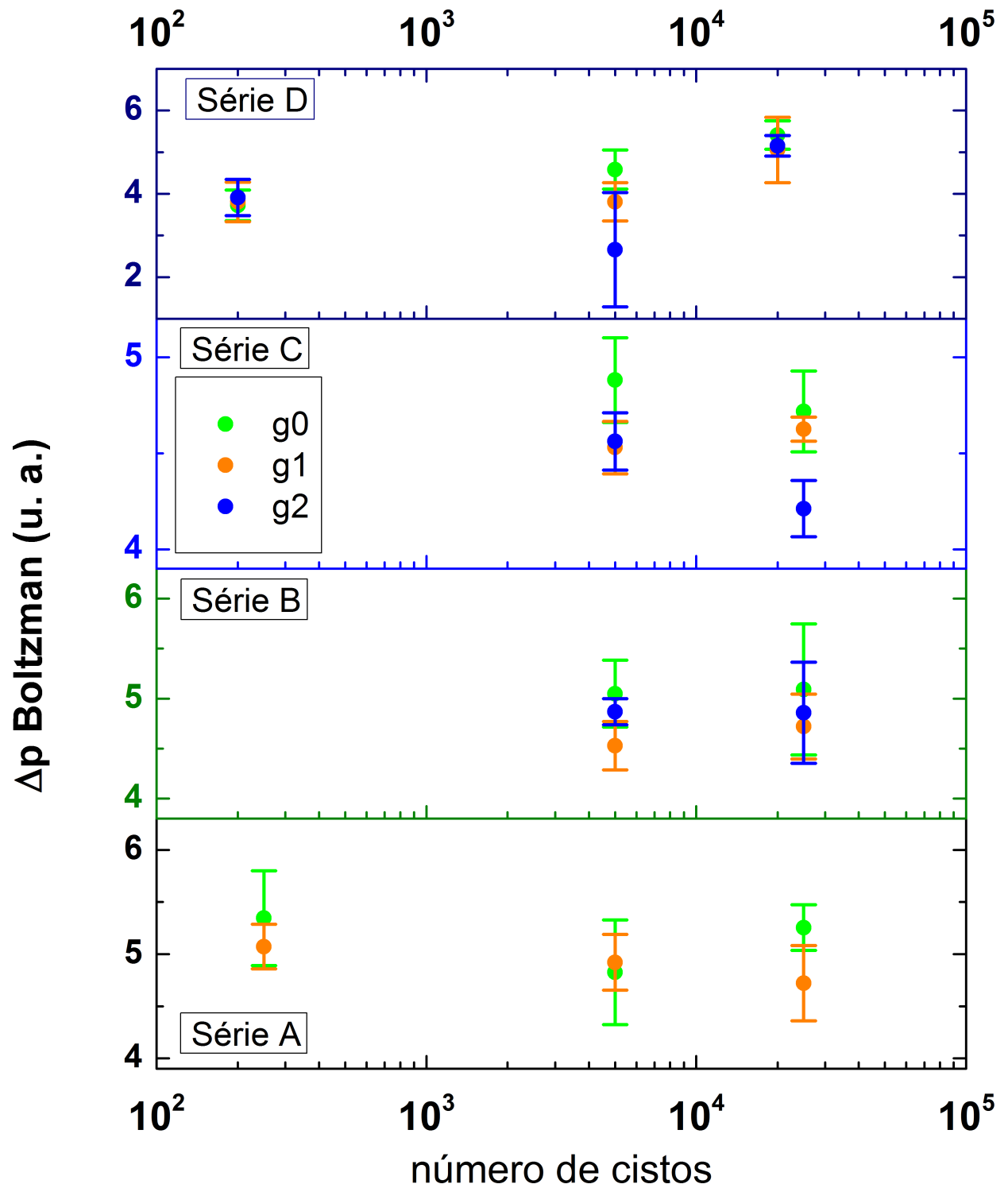


***G. intestinalis* – Série D – 5×10^3 cistos/100 μ L – CFDASE 5 μ M**

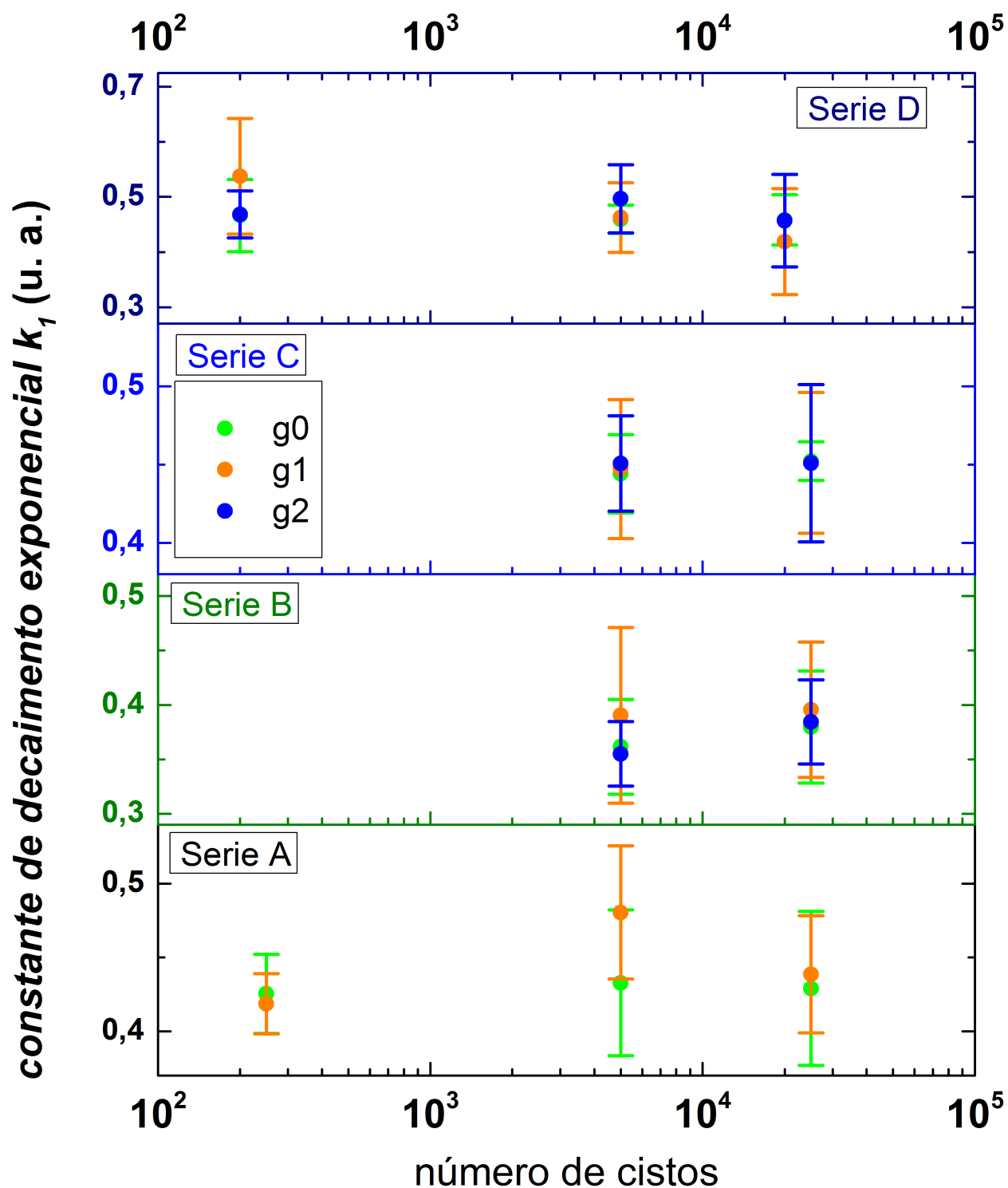


***G. intestinalis* – Série D – 2×10^4 cistos/100 μL – CFDA5E 5 μM**





Variação da fôton-contagem Δp séries A – D, excitação com luz branca – 6970 lux PMT01. *G. intestinalis* g0 sem estresse com mais de 30 dias de idade. g1 cistos mortos a 100°C/20min, g2 UV-C 874 mJ/cm² cistos estressados com luz uv 254 nm.



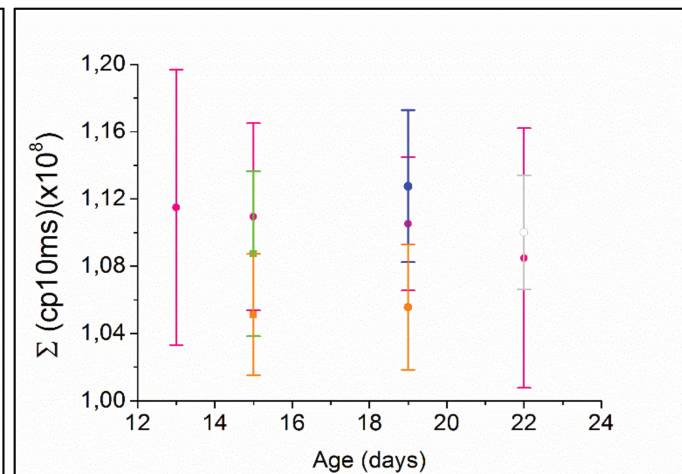
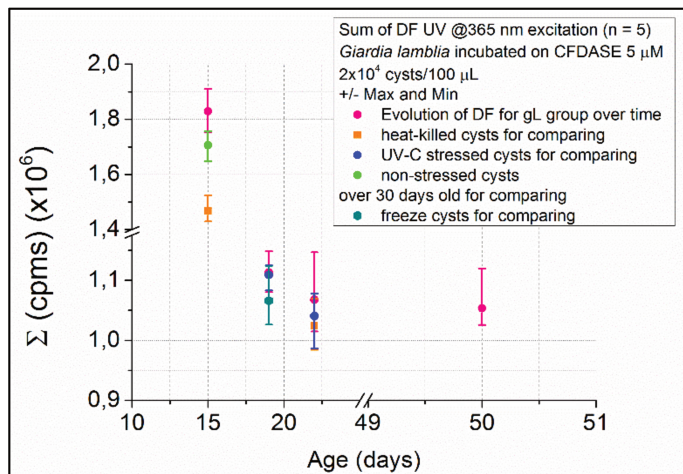
Coefficiente de decaimento exponencial k_1 séries A – D, excitação com luz branca – 6970 lux PMT01. *G. intestinalis* g0 sem estresse com mais de 30 dias de idade. g1 cistos mortos a 100°C/20min, g2 UV-C 874 mJ/cm² cistos estressados com luz uv 254 nm

Apêndice (3)

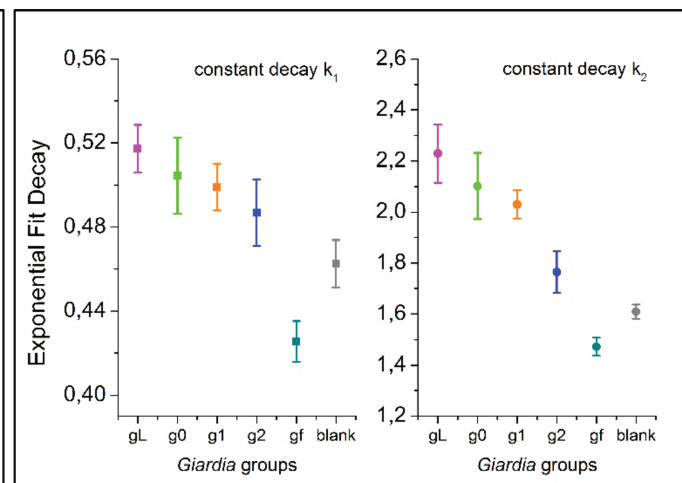
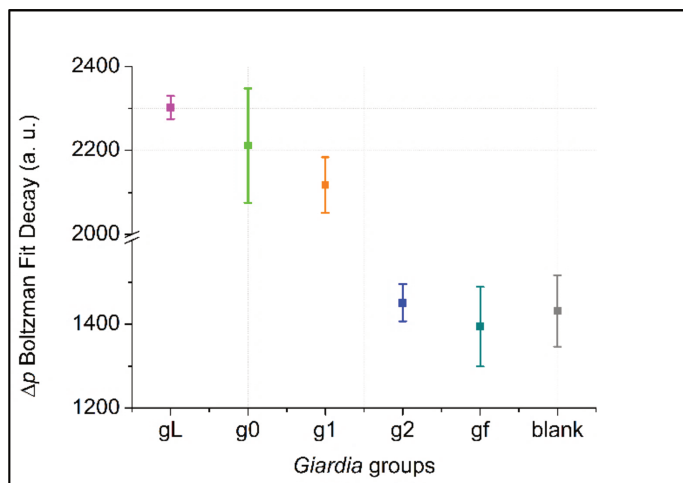
Ensaio de Fluorescência Retardada em cistos de *G. intestinalis*

Coeficientes de decaimento da Fluorescência
Retardada

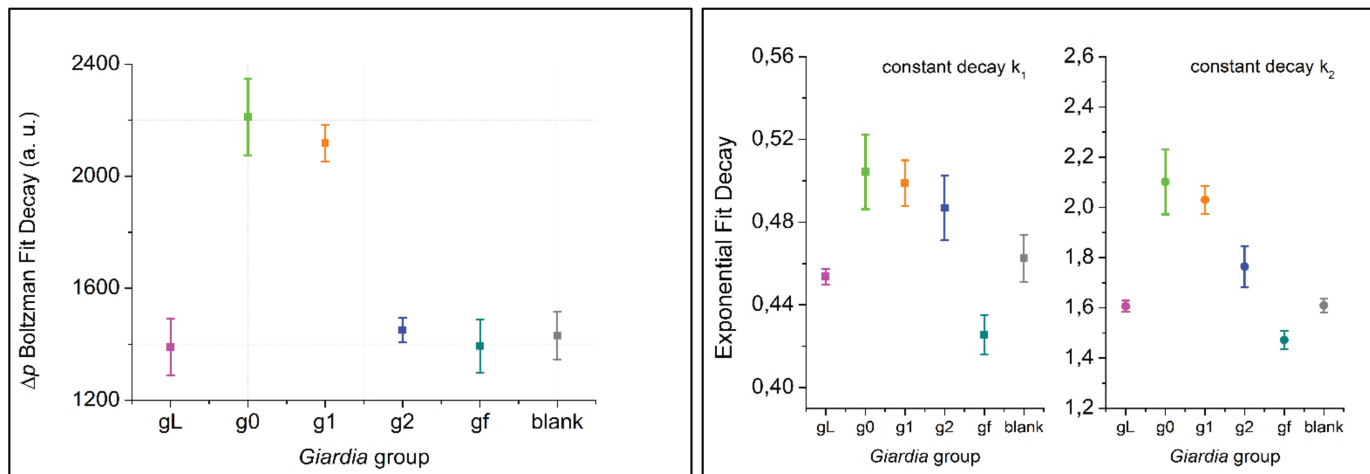
Luz UV@365nm PMT01



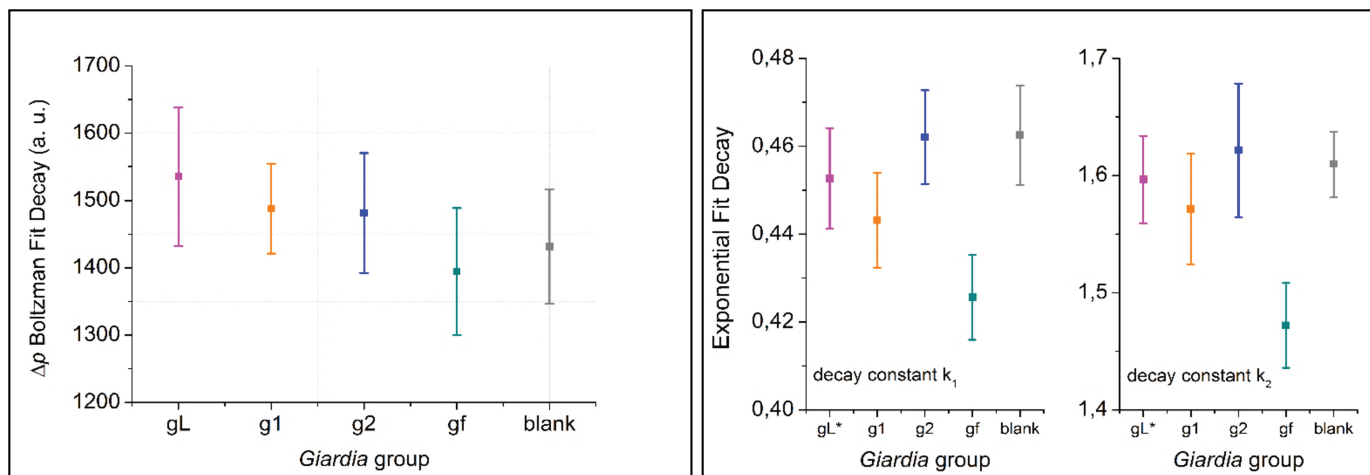
Variação no total de contagem ao longo do tempo: (a) DF, 30 s excitação UV @365 nm PMT01. (b) DF, 1 s de excitação, luz branca PMX-IR. ● gL = Cistos com idade variando entre 15 e 50 dias; ● g0 = Cistos sem estresse com idade superior a 30 dias; ■ g1 = Cistos mortos a 100°C/20min ● gf = Cistos congelados a -20°C; ● g2 = Cistos estressados com UV-C 874mJ/cm².



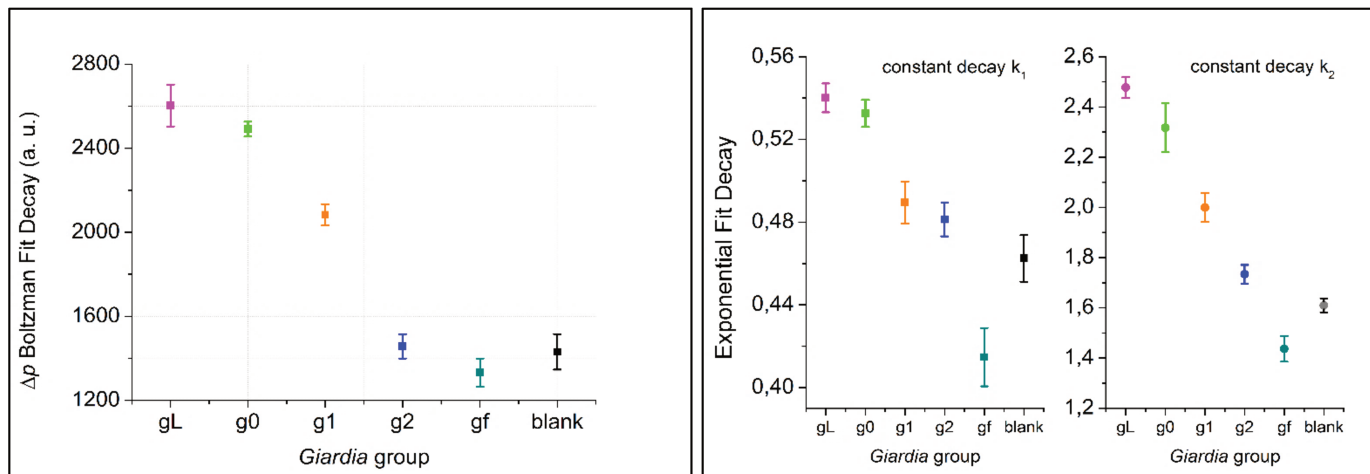
Coefficientes de decaimento da Luminescência Retardada após 30 s de excitação com luz UV @365 nm. *G. intestinalis* 2.5×10^2 cystos/100uL incubados em CFDASE 5 uM série UV(1): ● gL = Cistos com 15 dias de idade; ● g0 = Cistos sem estresse com idade superior a 30 dias; ■ g1 = Cistos mortos a 100°C/20min ● gf = Cistos congelados a -20°C; ● g2 = Cistos estressados com UV-C 874mJ/cm²; ■ Branco CFDASE 5 uM.



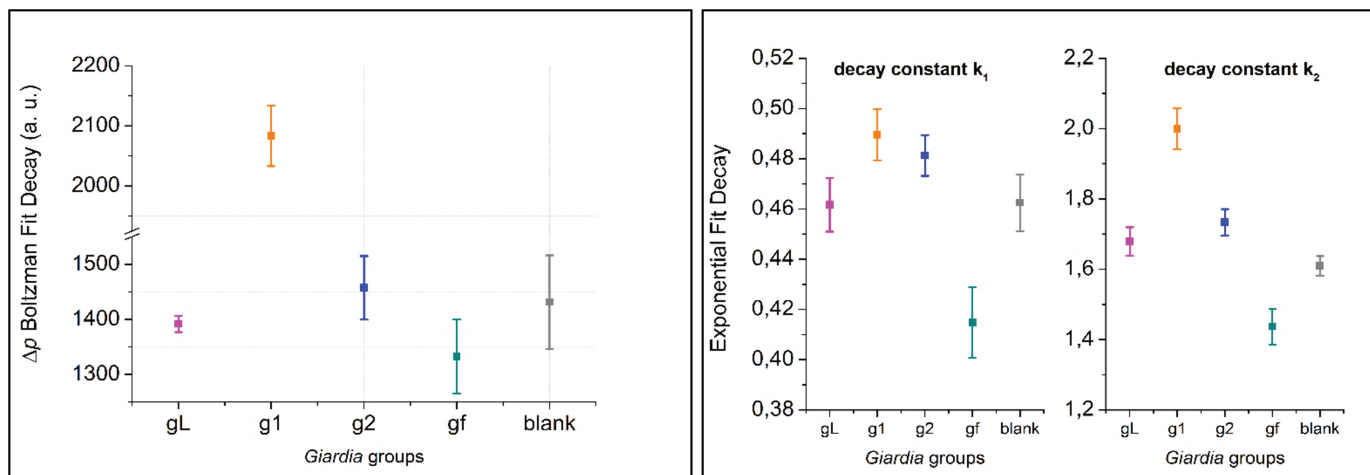
Coeficientes de decaimento da Luminescência Retardada após 30 s de excitação com luz UV @365 nm. *G. intestinalis* 2.5×10^2 cistos/100uL incubados em CFDA5E 5 uM série UV(2): ■ gL = Cistos com 22 dias de idade; ■ g0 = Cistos sem estresse com idade superior a 30 dias; ■ g1 = Cistos mortos a 100°C/20min ■ gf = Cistos congelados a -20°C; ■ g2 = Cistos estressados com UV-C 874mJ/cm²; ■ Branco CFDA5E 5 uM.



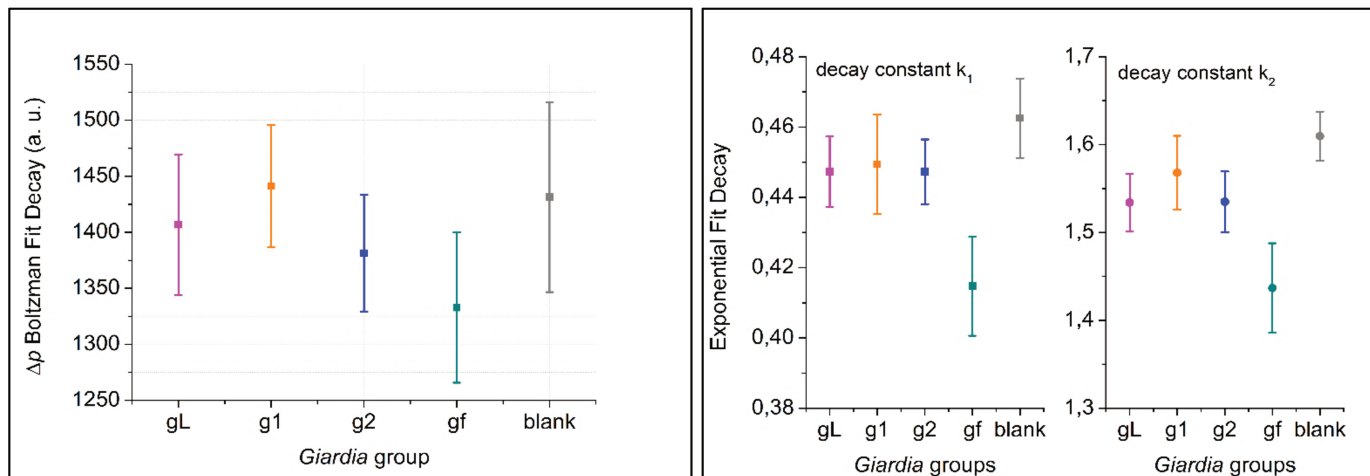
Coeficientes de decaimento da Luminescência Retardada após 30 s de excitação com luz UV @365 nm. *G. intestinalis* 2.5×10^2 cistos/100uL incubados em CFDA5E 5 uM série UV(3): ■ gL* = Cistos com 50 dias de idade; ■ g0 = Cistos sem estresse com idade superior a 30 dias; ■ g1 = Cistos mortos a 100°C/20min ■ gf = Cistos congelados a -20°C; ■ g2 = Cistos estressados com UV-C 874mJ/cm²; ■ Branco CFDA5E 5 uM.



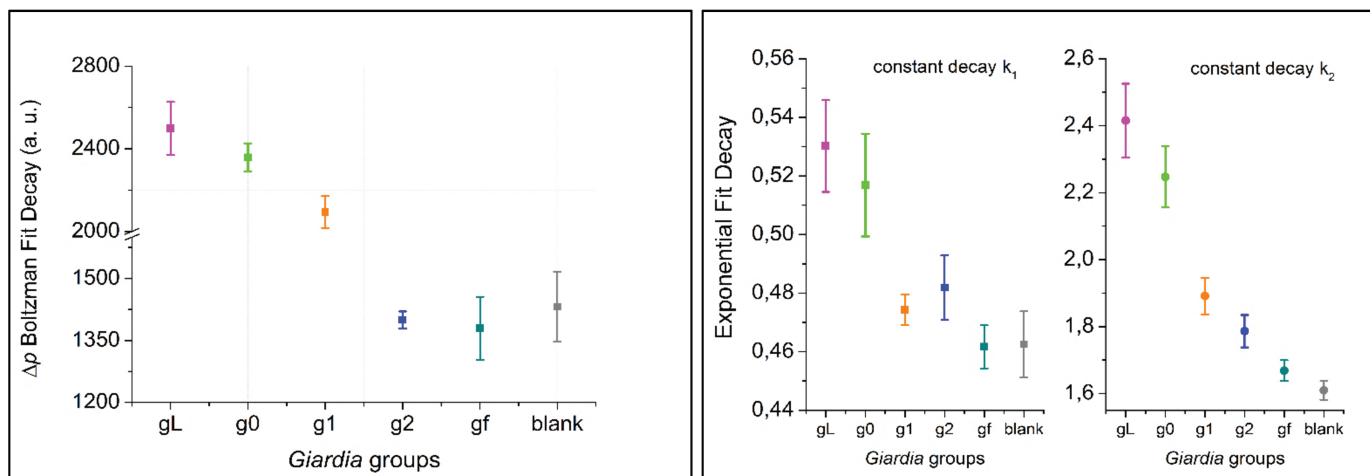
Coeficientes de decaimento da Luminescência Retardada após 30 s de excitação com luz UV @365 nm. *G. intestinalis* 5×10^3 cistos/100uL incubados em CFDA5E 5 uM série UV(1): ■● gL = Cistos com 15 dias de idade; ■● g0 = Cistos sem estresse com idade superior a 30 dias; ■● g1 = Cistos mortos a 100°C/20min ■● gf = Cistos congelados a -20°C; ■● g2 = Cistos estressados com UV-C 874mJ/cm²; ■● Branco CFDA5E 5 uM.



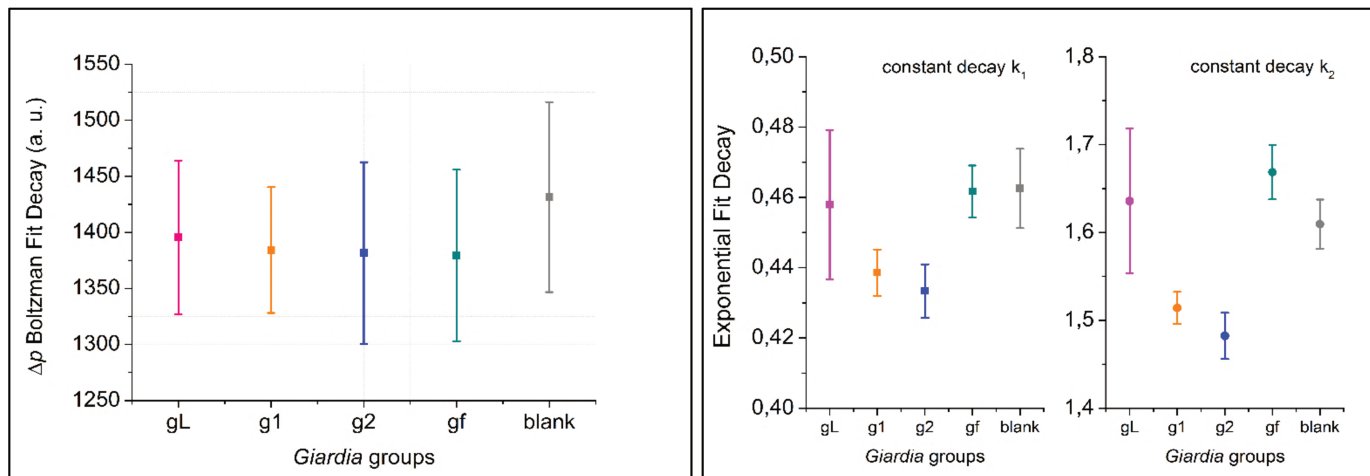
Coeficientes de decaimento da Luminescência Retardada após 30 s de excitação com luz UV @365 nm. *G. intestinalis* 5×10^3 cistos/100uL incubados em CFDA5E 5 uM série UV(2): ■● Cistos com 22 dias de idade ■● Cistos mortos a 100°C/20min ■● Cistos congelados a -20°C; ■● Cistos estressados com UV-C 874mJ/cm²; ■● Branco CFDA5E 5uM.



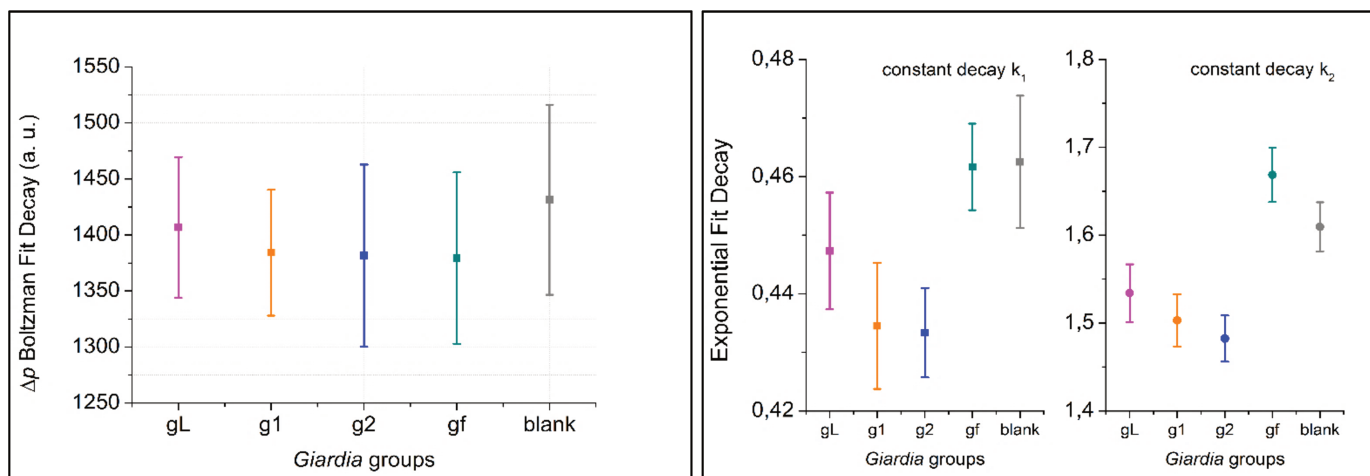
Coefficientes de decaimento da Luminescência Retardada após 30 s de excitação com luz UV @365 nm. *G. intestinalis* 5x10³ cistos/100uL incubados em CFDASE 5 uM série UV(3): ■● gL = Cistos com 50 dias de idade ■● g1 = Cistos mortos a 100°C/20min ■● gf = Cistos congelados a -20°C; ■● g2 = Cistos estressados com UV-C 874mJ/cm²; ■● Branco CFDASE 5uM.



Coefficientes de decaimento da Luminescência Retardada após 30 s de excitação com luz UV @365 nm. *G. intestinalis* 2x10⁴ cistos/100uL incubados em CFDASE 5 uM série UV(1): ■● gL = Cistos com 15 dias de idade; ■● g0 = Cistos sem estresse com idade superior a 30 dias; ■● g1 = Cistos mortos a 100°C/20min ■● gf = Cistos congelados a -20°C; ■● g2 = Cistos estressados com UV-C 874mJ/cm²; ■● Branco CFDASE 5 uM.



Coeficientes de decaimento da Luminescência Retardada após 30 s de excitação com luz UV @365 nm. *G. intestinalis* 2×10^4 cistos/100uL incubados em CFDASE 5 uM série UV(2): ■● gL = Cistos com 22 dias de idade ■● g1 = Cistos mortos a 100°C/20min ■● gf = Cistos congelados a -20°C; ■● g2 = Cistos estressados com UV-C 874mJ/cm²; ■● Branco CFDASE 5uM.



Coeficientes de decaimento da Luminescência Retardada após 30 s de excitação com luz UV @365 nm. *G. intestinalis* 2×10^4 cistos/100uL incubados em CFDASE 5 uM série UV(3): ■● gL = Cistos com 50 dias de idade ■● g1 = Cistos mortos a 100°C/20min ■● gf = Cistos congelados a -20°C; ■● g2 = Cistos estressados com UV-C 874mJ/cm²; ■● Branco CFDASE 5uM.

Anexo (1)

Exemplo de Laudo Técnico Cepas de
Cryptosporidium parvum e *Giardia lamblia*



Clinical and Environmental Parasitology Products * 6045 Hurst Street, New Orleans, LA 70118 USA
TEL / FAX: 504-895-3338 or Toll-Free: 866-895-3338 * Email: custserv@waterborneinc.com * www.waterborneinc.com

WATERBORNE™, INC.

Product Specification and Analysis Report
Cryptosporidium parvum

Product: Suspension of Oocysts of Cryptosporidium parvum, Iowa isolate, for use in research.

Source of the oocysts: Experimentally infected calves.

Species/genus identification method(s): Direct immunofluorescence microscopy with genus-specific monoclonal antibodies; also phase microscopy.

<u>Lot #:</u> 36-11	<u>Date shed:</u> 12/2/11
<u>Total number of oocysts provided:</u> 1×10^{10}	<u>Date purified:</u> 12/4/11

Total volume:

☒ 4 mL ☐ 8 mL ☐ other:

Storage solution:

☒ PBS with penicillin, streptomycin, gentamicin, Amphotericin B, 0.01% Tween 20
☐ 5% Formalin/PBS & 0.01% Tween 20
☐ other:

Purification method(s): Oocysts are purified from feces by sucrose and Percoll density gradient centrifugation, after initial extraction of feces with diethyl ether.

Quantitation Method: Neubauer hemacytometer counting, using red blood cell method.

Storage Conditions: 4 to 6 degrees Celcius (i.e. refrigerator temperature)

Expiration date: The shelf life of live *C. parvum* oocysts is guaranteed up to 2 months after the date of shipment; however, viability and useful life of oocysts for research may continue for a much longer period provided oocysts are stored at refrigerator (4-8 deg. C) temperatures in the presence of antibiotics, including Amphotericin B as fungicide (0.25 ug per ml). Formalinized oocysts are guaranteed for 6 months after date of receipt.

The organisms enclosed in this package are infectious to humans and animals by oral ingestion. The safe handling and disposal of the contents of this package are the responsibility of the recipient.



WATERBORNE™, INC.
Clinical and Environmental Parasitology Products * 6045 Hurst Street, New Orleans, LA 70118 USA
TEL / FAX: 504-895-3338 or Toll-Free: 866-895-3338 * Email: custserv@waterborneinc.com * www.waterborneinc.com

Product Specification and Analysis Report
Giardia lamblia

Product: Suspension of cysts of Giardia lamblia, H3 isolate, for use in research.

Source of Cysts: Experimentally infected gerbils.

Species/genus identification method(s): Direct immunofluorescence microscopy with genus-specific monoclonal antibodies; also phase microscopy.

<u>Lot #:</u> 111207	<u>Date shed:</u> 12/7/11
<u>Total number of cysts provided:</u> 1×10^4 (2)	<u>Date purified:</u> 12/1/11

Total volume:

☒ 4 mL

☐ 8 mL

☐ other:

Storage solution:

☒ PBS with penicillin, streptomycin, gentamicin, 0.01% Tween 20

☐ 5% Formalin/PBS/0.01% Tween 20

☐ other:

Purification Method(s): Cysts are purified from feces by sucrose and Percoll density gradient centrifugation.

Quantitation Method(s): Neubauer hemacytometer counting, using red blood cell method.

Storage Condition(s): 4° Celcius

Expiration Date: Suspensions of live cysts expire 21 days after the date of shipment; formalinized cysts expire 6 months after the date of shipment.

The organisms enclosed in this package are infectious to humans and animals by oral ingestion. The safe handling and disposal of the contents of this package are the responsibility of the recipient.