

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em
amostras de águas superficiais no Estado de São Paulo**

Ana Tereza Galvani

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em Ciências.**

Área de Concentração: Saúde Pública

Orientadora: Prof^a Dra. Maria Tereza Pepe Razzolini

São Paulo

2016

Quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais no Estado de São Paulo

Ana Tereza Galvani

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Saúde Pública

Orientadora: Prof^a Dra. Maria Tereza Pepe Razzolini

São Paulo

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição, ano da tese.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Dimer Galvani e Gláucia Garcia Galvani (*in memorian*), meus irmãos Nelo Galvani Neto e Vitor Galvani (*in memorian*), meu marido Eduardo Flores Auge e aos meus sobrinhos Lucas Santoro Galvani e Thiago Santoro Galvani.

“Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que se quer.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.
A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância
das pessoas que passam por suas vidas.”

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me proporcionar saúde, força, sabedoria e esperança para seguir em frente.

Aos meus pais Dimer Galvani e Gláucia Garcia Galvani (*in memorian*), meus irmãos Nelo Galvani Neto e Vitor Galvani (*in memorian*) pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Sem vocês nada teria conseguido. Meu amor e gratidão por vocês é imensurável e será eterno.

Ao meu querido irmão Vitor Galvani (*in memorian*): uma parte de mim também se foi quando você nos deixou precocemente, mas uma nova parte renasce a cada lembrança que você me deixou. Hoje, entendo que você assim como a mãe cumpriram suas missões por aqui e sei que um dia poderei abraçá-los novamente no plano superior. Isto me consola muito e me faz seguir em frente. Só posso agradecer o privilégio de ter convivido com vocês.

Aos meus sobrinhos Lucas e Thiago, vocês são a razão da minha vida e minha força para seguir.

Ao meu marido Eduardo Flores Auge (alma gêmea) pelo carinho, apoio incondicional, incentivo, parceria e muita paciência durante toda esta difícil jornada. Você é muito especial e sem sua ajuda não teria conseguido. Eternamente agradecida por tudo.

Aos meus sogros Francisca Flores Auge (*in memorian*) e Abelardo Auge (*in memorian*) por todo amor e carinho que sempre tiveram comigo. Vocês me deixaram um grande tesouro.

À toda minha família Auge e respectivos agregados: Marisa, Thiago, Antônio Pedro, Roseli, Bruno (*in memorian*), Carolina, Betina, Filippo, Abelardo, Margareth, Luíza e Felipe, vocês são muito especiais em minha vida. Muito feliz por fazer parte desta família.

À Ana Lúcia Santoro, minha amiga e irmã de coração. Obrigada pelo seu carinho e por sempre estar ao meu lado me apoiando e ajudando incondicionalmente. Sempre muito especial na minha jornada terrestre e científica.

Ao meu amigo e irmão de coração, José Antonio Padula: existem pessoas especiais, que não tem o nosso sangue, mas que temos certeza que tem o mesmo coração. Obrigada por tudo, não teria conseguido realizar este desafio sem seu carinho, apoio, muita paciência e ajuda incondicional. Eternamente agradecida!

À Sara Velloso Galvani, recente integrante de nossa família. Muito feliz em tê-la conosco. Você é um ser iluminado, muito especial.

À minha orientadora Prof^a Dra. Maria Tereza Pepe Razzolini, pela carinhosa acolhida e oportunidade de realizar este trabalho. Sua competência, apoio, suporte, incentivo e muita paciência foram essenciais. Você é muito especial.

À Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo pela acolhida, apoio e importantes ensinamentos transmitidos por seus professores nas respectivas disciplinas cursadas.

À toda a equipe do Laboratório do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo pela acolhida e todo apoio fornecido durante esta jornada.

À CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo e em especial a Diretoria de Engenharia e Qualidade Ambiental pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional, proporcionando incentivo e apoio para a realização deste mestrado.

À Prof^a Dra. Maria Inês Zanolli Sato, gerente do Departamento de Análises Ambientais da CETESB, pelo apoio, carinho, paciência e todo conhecimento transmitido para a minha formação como microbiologista e profissional na área de Meio Ambiente. Obrigada também por aceitar o convite para integrar a banca de avaliação deste estudo.

À Prof^a Dra. Elayse Maria Hachich pela amizade e importante apoio nesses longos anos de CETESB.

À Mikaela Renata Funada Barbosa, gerente de Divisão do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia Ambiental da CETESB, pela importante ajuda e apoio. Não teria conseguido sem sua extrema dedicação, empenho e competência. Obrigada por tudo.

Àos meus grandes amigos (minha família CETESB): Maria Inês, Judith, Mikaela,

Marcília, Suzi, Vilma, Padula, Octávio, José Augusto, Hilda, Adalgisa, Maria Cristina, Mariza, Solange, Elayse, Débora, Célia, Flávia, Cíntia, Paulo, Liliana, Luciana e a tantos outros que neste momento de nervosismo com certeza esqueci de listar. Nancy (minha mestra predileta) e Vânia, apesar de não estarem mais conosco na CETESB, sempre estarão em nossos corações, portanto fazem parte desta família. Esta equipe me apoiou incondicionalmente, sempre com muita paciência e carinho. Sem vocês não estaria aqui, com certeza.

À Dra. Ana Paula Guarnieri Christ, meu eterno agradecimento. Sem seu profundo conhecimento e importantes contribuições nos ensaios de biologia molecular eu não teria conseguido. Seu apoio foi essencial.

À Profª Dra. Ronalda Araújo pelo carinho, apoio e importantes contribuições para a realização deste estudo.

À Profª Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo pelas importantes contribuições para a realização deste estudo e por aceitar o convite para integrar a banca de avaliação do mesmo.

A Dra. Tatiana Prado, pelo apoio, ensinamentos e importantes contribuições para a realização deste estudo.

À Profª Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, Profª Dra. Solange Maria Gennari e Profº Dr. Rodrigo Martins Soares, do Laboratório de Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelas importantes contribuições e doações (oocistos de *Toxoplasma gondi*) para a realização deste estudo.

À Dra. Daniela Pontes de Chibao pelas importantes contribuições e doações (oocistos de *Toxoplasma gondi*) para a realização deste estudo.

Desculpem, mas não poderia deixar de agradecer meu irmão canino: Paco, você me torna uma pessoa melhor todos os dias. Obrigada pelo amor e lealdade incondicionais.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

GALVANI, A.T. Quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais no Estado de São Paulo. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 2016.

Introdução: A água tem sido considerada um importante veículo para a disseminação de surtos de toxoplasmose em vários países. Os oocistos de *Toxoplasma gondii* podem persistir no ambiente durante longos períodos, sendo altamente resistentes aos vários processos químicos de inativação, inclusive aos processos comuns de desinfecção utilizados pelos sistemas produtores de água. Pouco se tem registrado no país sobre a real extensão da contaminação dos recursos hídricos por *Toxoplasma gondii*, sendo que a sua detecção em amostras de águas é muito importante na implantação de ações preventivas. As metodologias existentes no momento para identificação e quantificação deste parasita nestes tipos de amostras não estão universalmente padronizadas e apresentam limitações. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo verificar a possível presença do protozoário em águas superficiais de abastecimento público no Estado de São Paulo mediante a implantação de uma metodologia específica para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* por reação quantitativa de PCR em tempo real nessas amostras. **Método:** Um total de 39 amostras de águas superficiais provenientes de 10 mananciais do Estado de São Paulo foram analisadas durante o período de maio a dezembro de 2015. Volumes de 20L da amostra foram concentrados por meio de filtração em cápsulas Envirocheck® HV (Pall Gelman Laboratory), sendo a cápsula filtrante tratada com uma solução dispersante, eluída e o eluato concentrado por centrifugação. O sedimento obtido após a centrifugação da amostra foi submetido à extração de DNA, sendo utilizado o kit de extração PowerSoil DNA isolation® (MO BIO Laboratories). A sequência alvo selecionada para detecção e quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* através da reação quantitativa de PCR em tempo real foi um fragmento de 62 pares de bases do gene B1, sendo utilizado o seguinte conjunto de iniciadores: 5' CTAGTATCGTGCGGCAATGTG 3' (531-551) e 5'GGCAGCGTCTCTTCCTCTTTT 3' (571-592). A sonda utilizada foi: 5' (6-FAM) CCACCTCGCCTCTTGG-(NFQ-MGB) 3'. **Resultados:** Do total das amostras analisadas, 7,7% (3/39) foram positivas para oocistos de *Toxoplasma gondii* e dentre os 10 mananciais estudados, detectou-se a ocorrência do protozoário em 30% (3/10) dos mesmos. **Conclusão:** Os dados obtidos no presente estudo demonstram que o protozoário *Toxoplasma gondii* está circulando em águas superficiais de abastecimento público no Estado de São Paulo.

Descritores: Água. *Toxoplasma gondii*. Oocistos. DNA. qPCR.

ABSTRACT

GALVANI, A.T. Quantification of *Toxoplasma gondii* oocysts in surface water samples in São Paulo. [Master degree]. Sao Paulo: School of Public Health - USP, 2016.

Introduction: Water is an important vehicle for the spread of toxoplasmosis outbreaks in several countries. *Toxoplasma gondii* oocysts may remain for a long period in the environment and are highly resistant to chemical inactivation, including the routine classical disinfection procedures in water treatment facilities. Few reports have been published in Brazil about the real extent of the contamination of water resources by *Toxoplasma gondii*, which is of major importance to implement preventive actions. Methods for the identification and quantification of the parasite in water bodies are not standardized and have limitations.

Objective: This study aimed to verify the presence of these protozoa in surface waters used as source for drinking water production in the State of São Paulo by implementing a specific methodology to quantify *Toxoplasma gondii* oocysts with quantitative real-time PCR.

Method: Thirty nine samples of surface waters from 10 different sites in the State of São Paulo were analyzed from May to December 2015. Volumes of 20L of each sample were concentrated by filtration with capsule Envirocheck® HV (Pall Gelman Laboratory). The filter capsule was treated with a dispersant solution, eluted, and the eluate concentrated by centrifugation. DNA was extracted from the resulting pellet with PowerSoil DNA isolation® (MO BIO Laboratories) extraction kit. A fragment of 62 base pairs of the B1 gene was selected as target sequence for detection and quantitation the *Toxoplasma gondii* oocysts by the quantitative real-time PCR reaction, and the following primers: 5' TAGTATCGTGCGGCAATGTG 3' (531-551) and 5'GGCAGCGTCTCTTCCTCTTTT 3' (571-592) were used. The probe employed was 5 '(6-FAM) CCACCTCGCCTCTTGG-(NFQ-MGB) 3'. **Results:** *Toxoplasma gondii* oocysts were detected in 30% (3/10) of the sites evaluated and 7.7% (3/39) of all samples analyzed were positive. **Conclusion:** The results of the present study show that the protozoan *Toxoplasma gondii* is circulating in surface waters used as drinking water supply in the State of São Paulo.

Key words: Water. *Toxoplasma gondii*. Oocysts. DNA. qPCR.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose	22
2.2 Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	28
2.3 Caracterização molecular e estrutura populacional do <i>Toxoplasma gondii</i>	32
2.4 Métodos de detecção de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de águas	37
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	42
4 METODOLOGIA	42
4.1 Amostragem	42
4.1.1 Pontos de coleta	42
4.1.2 Coleta	44
4.2 Concentração das amostras	44
4.2.1 Filtração	45
4.2.2 Tratamento da cápsula de filtração com solução dispersante antes da eluição da amostra	45
4.2.3 Eluição	46
4.2.4 Centrifugação	47
4.3 Extração de DNA	48
4.4 Ensaio de PCR em tempo real (qPCR)	49
4.4.1 Iniciadores e sondas	49
4.4.2 Curva Padrão	50
4.4.3 Condições de amplificação da qPCR	53
4.5 Avaliação do desempenho do método de quantificação de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de águas superficiais	54
4.5.1 Recuperação inicial	55
4.5.2 Recuperação em matrizes	55

4.6 Avaliação de possíveis interferentes presentes nas amostras de águas superficiais na reação de qPCR	56
4.7 Análises estatísticas	56
5 RESULTADOS	57
5.1 Ensaio de validação da qPCR	57
5.1.1 Análise de sensibilidade dos iniciadores e sondas	57
5.1.2 Análise de especificidade dos iniciadores e sondas	59
5.1.3 Avaliação da reprodutibilidade da curva padrão	60
5.2 Avaliação da pureza do DNA extraído das amostras de águas superficiais	60
5.3 Avaliação de possíveis interferentes das amostras de águas superficiais na reação de qPCR	61
5.4 Avaliação do desempenho do método de quantificação de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de águas superficiais: recuperação inicial e recuperação em matrizes	62
5.5 Resultados das análises de quantificação de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de águas superficiais amplificadas pela reação de qPCR	63
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÕES	73
8 PERSPECTIVAS	75
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS	
Anexo 1 Currículo Lattes	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do complexo apical em <i>Toxoplasma gondii</i>	24
Figura 2 – Distribuição geográfica mundial da toxoplasmose no período de 1992 a 2009	26
Figura 3 – Ciclo biológico do <i>Toxoplasma gondii</i>	29
Figura 4 – Formas evolutivas do <i>Toxoplasma gondii</i>	30
Figura 5 – Oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	31
Figura 6 – Mapa genético dos 14 cromossomos do <i>Toxoplasma gondii</i>	33
Figura 7 – Diversidade genotípica do <i>Toxoplasma gondii</i>	35
Figura 8 – Delineamento experimental do método de quantificação de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de águas superficiais e dos testes de avaliação de desempenho do método	42
Figura 9 – Localização e vocação das 22 UGRHIs do Estado de São Paulo	44
Figura 10 – Sistema de filtração da amostra e agitador Envirocheck®	45
Figura 11 – Adição de solução dispersante (NaHMP) à cápsula de filtração	45
Figura 12 – Filtração da solução dispersante	46
Figura 13 – Eluição da amostra	47
Figura 14 – Alinhamento do fragmento gênico selecionado para utilização como curva padrão de DNA com o produto de PCR gerado pelos iniciadores utilizados nesse estudo	51
Figura 15 – Representação das curvas de amplificação da curva padrão. O eixo X está representado pela quantidade de ciclos na reação e o eixo Y pelos valores de magnitude do sinal gerado (ΔR_n) nas condições da qPCR	58

- Figura 16** – Curva padrão (B1 Partial) representando a curva de regressão linear utilizada na reação de qPCR. No eixo X são apresentados os 6 pontos da curva ($5,0 \times 10^6$ a 5×10^1 cópias/5 μ L) e no eixo Y os valores de Cts 58
- Figura 17** – Representação das curvas de amplificação do controle positivo (DNA extraído da suspensão contendo oocistos de *Toxoplasma gondii*) e de DNA extraído da suspensão contendo cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.. De acordo com a legenda as amostras referentes às linhas A, B, C, D, E e F estão relacionadas com a curva padrão, a linha H com resultado positivo de amplificação referente ao DNA de *Toxoplasma gondii* e a linha G com resultado negativo de amplificação referente ao DNA de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. 59
- Figura 18** – Resultados da reação de qPCR das diluições seriadas dos DNAs extraídos das amostras de águas superficiais contaminadas artificialmente (semeadura experimental) na ordem de 10 vezes (DNA puro, 1:10 e 1:100) 61
- Figura 19** – Resultados obtidos nas análises de avaliação da recuperação inicial do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* (Nº de cópias de DNA de *Toxoplasma gondii* e % de recuperação) 62
- Figura 20** – Resultados obtidos nas análises de avaliação da recuperação em matrizes do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* (Nº de cópias de DNA de *Toxoplasma gondii* e % de recuperação) e turbidez das respectivas amostras de águas superficiais (NTU) 63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Pontos de coleta com respectivas coordenadas geográficas	43
Quadro 2 – Iniciadores e sonda (qPCR)	50
Quadro 3 – Especificação técnica da sequência sintética de 466 pb utilizado na curva padrão de qPCR para quantificação de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de águas superficiais	50
Quadro 4 - Condições de amplificação do DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> pela qPCR	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores com as médias de Cts por número de cópias obtidas na reação de qPCR no ensaio de validação	57
Tabela 2 – Avaliação da reprodutibilidade da curva padrão utilizada nas amostras de águas superficiais para a quantificação de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> pela qPCR, apresentando os valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação	60
Tabela 3 – Resultados de detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> pela qPCR em amostras de águas superficiais avaliadas nesse estudo	64
Tabela 4 – Resultados das amostras de águas superficiais positivas para <i>Toxoplasma gondii</i> pela qPCR e o número de ciclos necessários para atingir o <i>threshold</i> durante a amplificação	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
°C	Graus Celsius
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
cM	Centimorgan
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Cv	Coefficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
et al.	E colaboradores
FAM	Carboxi-fluoresceína
FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
G	Aceleração da gravidade
IMS	Separação Imunomagnética
Kb	Kilobase
L	Litro
LAMP	Amplificação Isotérmica-Mediada por Loop
Mb	Megabase
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
MLEE	Eletroforese de enzimas multilocus
mM	Milimolar
ng	Nanograma
NaHMP	Hexametáfosfato de sódio
NTC	<i>Non Template Controls</i>
NTU	Unidade nefelométrica de turbidez
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase com polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RLU	Unidade Relativa de Luz
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa a partir da transcrição reversa
spp.	Espécies
TE	Tampão Tris-EDTA
UGRHIs	Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos
µL	Microlitro
µm	Micromilímetro
µM	Micromolar
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As doenças relacionadas a patógenos de veiculação hídrica constituem-se em preocupação em saúde pública em âmbito global, não só pela morbidade e mortalidade que causam, mas pelo alto custo na prevenção e tratamento. Estas doenças estão diretamente relacionadas à deterioração e poluição ambiental. Apesar dos constantes esforços para manter a segurança da água, surtos de veiculação hídrica ainda são relatados globalmente (RAMÍREZ-CASTILLO et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) no relatório “Progress on Sanitation and Drinking Water: 2015 Update and MDG Assessment”, 2.4 milhões de pessoas em todo mundo continuam a não ter acesso aos serviços de saneamento básico. Cerca de 80% das diarreias agudas ocorridas mundialmente estão relacionadas ao uso de água imprópria para consumo, ausência ou inadequação de sistemas de esgoto ou a práticas insuficientes de higiene.

O estudo “Esgotamento Sanitário Inadequado e Impactos na Saúde da População”, realizado pelo Instituto Trata Brasil no período de 2008 a 2011 e publicado em 2013, mostrou que em 2011, quase 400 mil pessoas foram internadas por diarreia no Brasil. Dados do estudo apontam que apenas 38% do esgoto produzido no país passa por algum tipo de tratamento e que mais de 100 milhões de brasileiros não possuem acesso aos serviços de saneamento básico. Todo o esgoto produzido por essa população é despejado in natura em nossos mananciais, afetando a qualidade das águas e ocasionando as doenças de veiculação hídrica (INSTITUTO TRATA BRASIL, 2013.).

As doenças de veiculação hídrica ocorrem predominantemente nos países em desenvolvimento, porém constituem-se em sério desafio mundial (RAMÍREZ-CASTILLO et al., 2015). Globalmente cerca de 3,4 milhões de pessoas, a maioria crianças, morrem todos os anos devido a ocorrência dessas doenças. Investir na qualidade da água pode reduzir a carga mundial das doenças de veiculação hídrica em aproximadamente 4% (WHO, 2010). Compreender a ecologia e epidemiologia da doença no contexto dos ecossistemas também é fundamental para preservar a saúde da população humana e animal (VANWORMER et al., 2013).

Patógenos excretados nas fezes de animais e seres humanos são responsáveis por doenças transmitidas pela água. Protozoários patogênicos e vírus entéricos são responsáveis por surtos de veiculação hídrica semelhantes aos causados pelos agentes bacterianos (AUBERT e VILLENA, 2009).

Dentre os protozoários causadores de doenças de veiculação hídrica vêm se destacando o *Toxoplasma gondii* pela elevada incidência de casos, devido às suas características de resistência aos tratamentos convencionais de água e capacidade de permanência no ambiente. É reconhecidamente um protozoário de interesse em saúde humana, devido à propagação de oocistos através da água, causando surtos de toxoplasmose em diferentes partes do mundo (KARANIS et al., 2013). A veiculação hídrica dos oocistos do *Toxoplasma gondii* é favorecida devido ao longo período que os mesmos podem permanecer viáveis no ambiente, a baixa dose infecciosa e sua resistência à cloração, ozônio e raios ultravioleta (JONES e DUBEY, 2010).

Toxoplasma gondii apresenta importância no contexto de produção animal e de saúde pública, envolvendo graves alterações fetais e abortos na espécie humana e em animais, sendo também um importante patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos. Em média, um terço da população humana mundial está cronicamente infectada com *Toxoplasma gondii* (TENTER et al., 2000).

A toxoplasmose é prevalente em muitas regiões do mundo, sendo considerada a mais cosmopolita de todas as zoonoses (SILVA et al., 2003). A prevalência da toxoplasmose na população mundial pode variar entre os diferentes países, entre diferentes áreas geográficas dentro de um mesmo país e entre diferentes grupos étnicos vivendo numa mesma área geográfica (TENTER et al., 2000).

A infecção por *Toxoplasma gondii* é comum na América do Sul. Segundo estimativas de Dubey et al. (2012), o Brasil é uma das regiões com as maiores prevalências de *Toxoplasma gondii* em humanos, sendo que cerca de 50% das crianças e 50 a 80% das mulheres em idade fértil têm anticorpos contra esse protozoário. A alta prevalência do protozoário em humanos no Brasil também foi evidenciada por BAHIA-OLIVEIRA et al. (2003), SOBRAL et al. (2005), DE MOURA et al. (2006).

A toxoplasmose pode ser considerada uma grave ameaça à saúde humana e um desafio em saúde pública, principalmente devido ao grande número de pessoas que podem ser afetadas através de uma única fonte de contaminação (KARANIS et al., 2013).

Uma importante fonte de contaminação em regiões com toxoplasmose endêmica entre a população de baixo e médio poder socioeconômico vem sendo relatada nos últimos anos no Brasil e refere-se principalmente à falta de tratamento da água. No estado do Rio de Janeiro, a constatação de alta soroprevalência de toxoplasmose foi relacionada ao consumo de água não filtrada como potencial fonte de disseminação de oocistos de *Toxoplasma gondii* entre a população de baixa renda daquela região (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003).

Vários surtos de toxoplasmose têm sido associados à água contaminada por oocistos do protozoário em todo o mundo. A infecção está presente principalmente na Europa, América do Sul, América Central e África (AUBERT e VILLENA, 2009).

O primeiro surto de toxoplasmose disseminado pela água foi relatado em 1979, no Panamá, com a infecção de 39 soldados do Exército dos Estados Unidos, que beberam água de três nascentes contaminadas (BENENSON et al., 1982).

No Canadá, foi relatada a ocorrência de surto de toxoplasmose envolvendo cerca de 100 indivíduos com faixa etária entre 6 e 83 anos, em Greater Vitoria, em 1995. Estes apresentaram sintomas sugestivos de toxoplasmose, dentre eles a retinite e a linfadenopatia. A água do reservatório municipal fornecida à população foi evidenciada como via de transmissão da doença. Constatou-se deficiências no sistema de distribuição de água da cidade que favoreceram a ocorrência do surto: presença de felídeos domésticos e selvagens no reservatório, uso de produtos químicos não efetivos na desinfecção primária e também as condições bastante precárias do sistema de filtração (BOWIE et al., 1997).

Em 1999, no campus da Universidade de São Paulo, na cidade de São Carlos, foi relatada a ocorrência de um surto de toxoplasmose, afetando 113 alunos e este foi associado à contaminação da água e ou comida por fezes de gato. Foi relatada a presença de vários gatos no campus, inclusive no interior da cafeteria (GATTÁS, 2000).

No Brasil, o primeiro e também maior surto mundial de toxoplasmose de veiculação hídrica comprovada ocorreu na cidade de Santa Isabel do Ivaí, Paraná. Durante o período de novembro de 2001 a janeiro de 2002, cerca de 600 pessoas procuraram o serviço de saúde apresentando sintomas característicos de toxoplasmose e destas, 426 apresentaram sorologia compatível com toxoplasmose aguda. A água que abastecia o reservatório da cidade era proveniente de um poço, sendo bombeada, clorada e distribuída para o município. Este tratamento não incluía os processos de coagulação, sedimentação e filtração, sendo que a cloração era realizada de forma inadequada (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DE MOURA et al., 2006).

O aumento da conscientização do risco de surtos de toxoplasmose transmitida pela água tem reforçado a importância do desenvolvimento de métodos de detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* nessas amostras. O desenvolvimento de novas técnicas tem sido um grande desafio para os pesquisadores e apesar de novos métodos estarem sendo desenvolvidos, ainda não há uma metodologia universalmente utilizada (KARANIS et al., 2013; PALOS LADEIRO et al., 2015; VILLENA et al., 2004).

Apesar do oocisto de *Toxoplasma gondii* persistir por um longo período de tempo sob uma variedade de condições ambientais (DUBEY e JONES, 2008), existem algumas características específicas que podem dificultar sua detecção em amostras ambientais, tais como a presença de detritos, grandes quantidades de lodo, ácido húmico, bactérias, algas entre outras (DUMÈTRE e DARDÉ, 2007; ZARLENGA e TROUT, 2004).

A técnica de reação de PCR em tempo real (qPCR) em combinação com os procedimentos convencionais de concentração de protozoários em amostras de águas apresenta grande potencial para uma detecção sensível e específica de oocistos de *Toxoplasma gondii* nestas amostras (YANG et al., 2009).

Embora tenham sido desenvolvidos para a detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras clínicas, não há muitos ensaios de reação de PCR em tempo real adaptados para a detecção de oocistos em amostras de água, possivelmente devido a altas concentrações esperadas de inibidores e também ao baixo número de oocistos de *Toxoplasma gondii* presentes em grandes volumes de amostras ambientais (AUBERT e VILLENA, 2009).

Avanços vêm ocorrendo em relação à pesquisa de métodos mais sensíveis e específicos para a detecção e caracterização de patógenos em amostras de água. Estes métodos desempenham papel fundamental no monitoramento da qualidade da água e também na avaliação do risco microbiológico, crucial para a prevenção de surtos de veiculação hídrica (RAMÍREZ-CASTILLO et al., 2015).

Considerando a relativa escassez de trabalhos associados à presença de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais no Brasil, a ausência de métodos padronizados e também a importância que a água vem assumindo nos últimos anos na veiculação de surtos desse protozoário em várias regiões do mundo, este estudo visa à implantação de uma metodologia para a quantificação do mesmo em amostras de águas superficiais. Esta metodologia irá contribuir para a avaliação e caracterização do grau de contaminação das águas superficiais pelo *Toxoplasma gondii* e também será bastante eficaz no subsídio de programas de prevenção e controle de possíveis surtos de veiculação hídrica causados pelo protozoário.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

A toxoplasmose tem como agente etiológico o *Toxoplasma gondii*, protozoário intracelular obrigatório que apresenta distribuição cosmopolita. Possui os felídeos como hospedeiros definitivos, enquanto o homem, outros mamíferos e as aves são os hospedeiros intermediários (FRENKEL et al., 1970; DUBEY et al., 1970).

A transmissão do protozoário pode ocorrer através da ingestão de água ou alimentos contaminados por oocistos liberados no ambiente junto com as fezes de gatos, de cistos teciduais encontrados em carne crua ou em vísceras cruas ou mal cozidas dos hospedeiros intermediários e, também através da transmissão transplacentária dos taquizoítos. Outras formas de transmissão menos comuns são o transplante de órgãos e a transfusão sanguínea (DUBEY et al., 2012).

O protozoário *Toxoplasma gondii* é capaz de infectar uma ampla variedade de vertebrados, incluindo mamíferos e aves. Normalmente, as infecções causadas por esse protozoário são assintomáticas ou subclínicas. Apenas uma pequena porcentagem da população humana e de animais desenvolvem sinais clínicos para essa doença (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

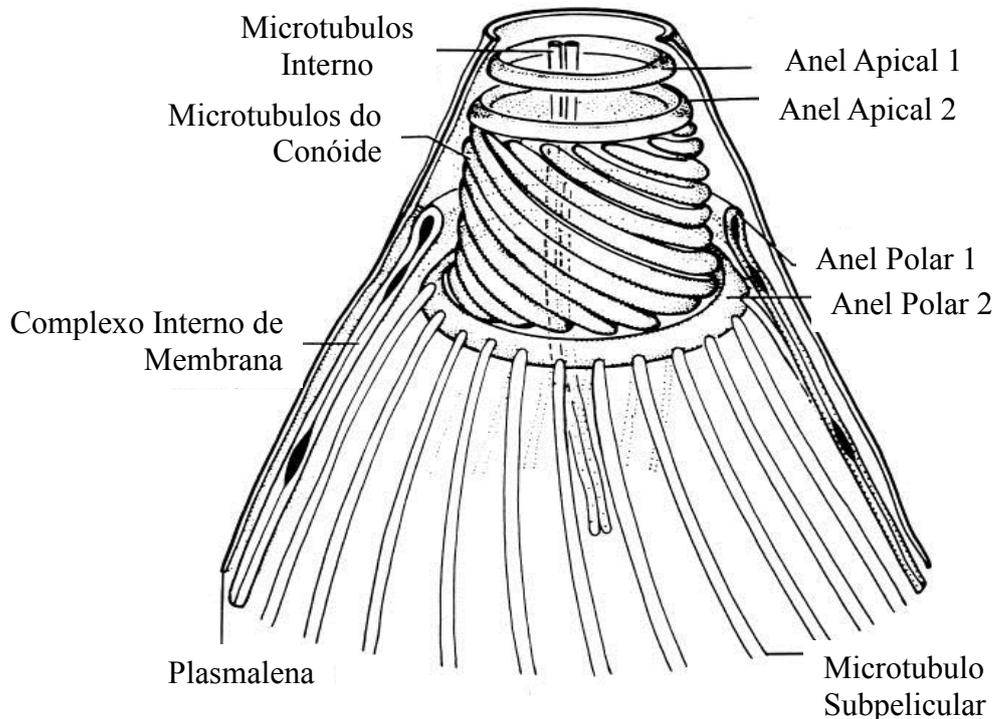
Em mulheres grávidas, o *Toxoplasma gondii* pode causar aborto e morte fetal. A toxoplasmose pode provocar desenvolvimento anormal do feto em gestantes, cegueira e danos oculares em indivíduos saudáveis (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

Em indivíduos imunocomprometidos, como por exemplo, pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) ou receptores de órgãos transplantados, o *Toxoplasma gondii* pode sofrer reativação e replicar rapidamente, podendo causar doenças graves, como a encefalite, coriorretinite e infecções sistêmicas. É um dos agentes etiológicos mais frequentemente identificado em casos de uveíte (HOLLAND et al., 1999), sendo responsável por mais de 85% de casos no sul do Brasil (SILVEIRA et al., 2001).

Em animais, o *Toxoplasma gondii* também pode causar aborto, especialmente em ovinos e caprinos, gerando uma grande perda econômica na pecuária (WEISS e DUBEY, 2009).

O protozoário *Toxoplasma gondii* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma* e espécie única *Toxoplasma gondii* (LEVINE, 1977). O Filo Apicomplexa possui como principal característica o complexo apical (Figura 1), composto de organelas secretórias especializadas, como róptrias e micronemas e de elementos do citoesqueleto, como os anéis polares e o conóide. Este último ocorre apenas nos coccídeos, subclasse que inclui o *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 1998).

Figura 1 – Ilustração do complexo apical em *Toxoplasma gondii*



Fonte: Adaptado de DUBEY et al., 1998

A descoberta do *Toxoplasma gondii* ocorreu em 1908 por Nicole e Manceux no Instituto Pasteur de Tunis, ao observarem um novo protozoário responsável por infecção em roedor africano (*Ctenodactylus gundii*). No mesmo ano, Alfonso Splendore identificou o protozoário em coelho de laboratório (*Oryctolagus cuniculus*), na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (NICOLE e MANCEAUX, 1908; SPLENDORE, 1908).

Inicialmente foi identificado como *Leishmania gondii* e posteriormente denominado *Toxoplasma gondii*. O nome do roedor *Ctenodactylus gundii* determinou a nomenclatura da espécie do protozoário (PFEFFERKORN, 1990). A denominação do gênero foi derivada das palavras gregas *táxon* (arco) e *plasma* (forma) em decorrência da forma alongada e em lua crescente na qual o protozoário é mais observado. Em 1909, Nicole e Manceaux introduziram o gênero *Toxoplasma* no Filo Apicomplexa (DUBEY e BEATTIE, 1988).

Em 1923, Janku descreveu o primeiro caso de infecção por *Toxoplasma gondii* em humanos, envolvendo uma criança com 11 meses de idade que faleceu com coriorretinite e hidrocefalia congênita na cidade de Praga (JANKU, 1923 *apud* WEISS e DUBEY, 2009). No Brasil, a toxoplasmose congênita provavelmente foi reconhecida pela primeira vez por TORRES (1927), que detectou a presença do protozoário em uma menina recém nascida na cidade do Rio de Janeiro. O primeiro caso comprovado de toxoplasmose congênita foi descrito por WOLF et al. (1939) em New York, EUA.

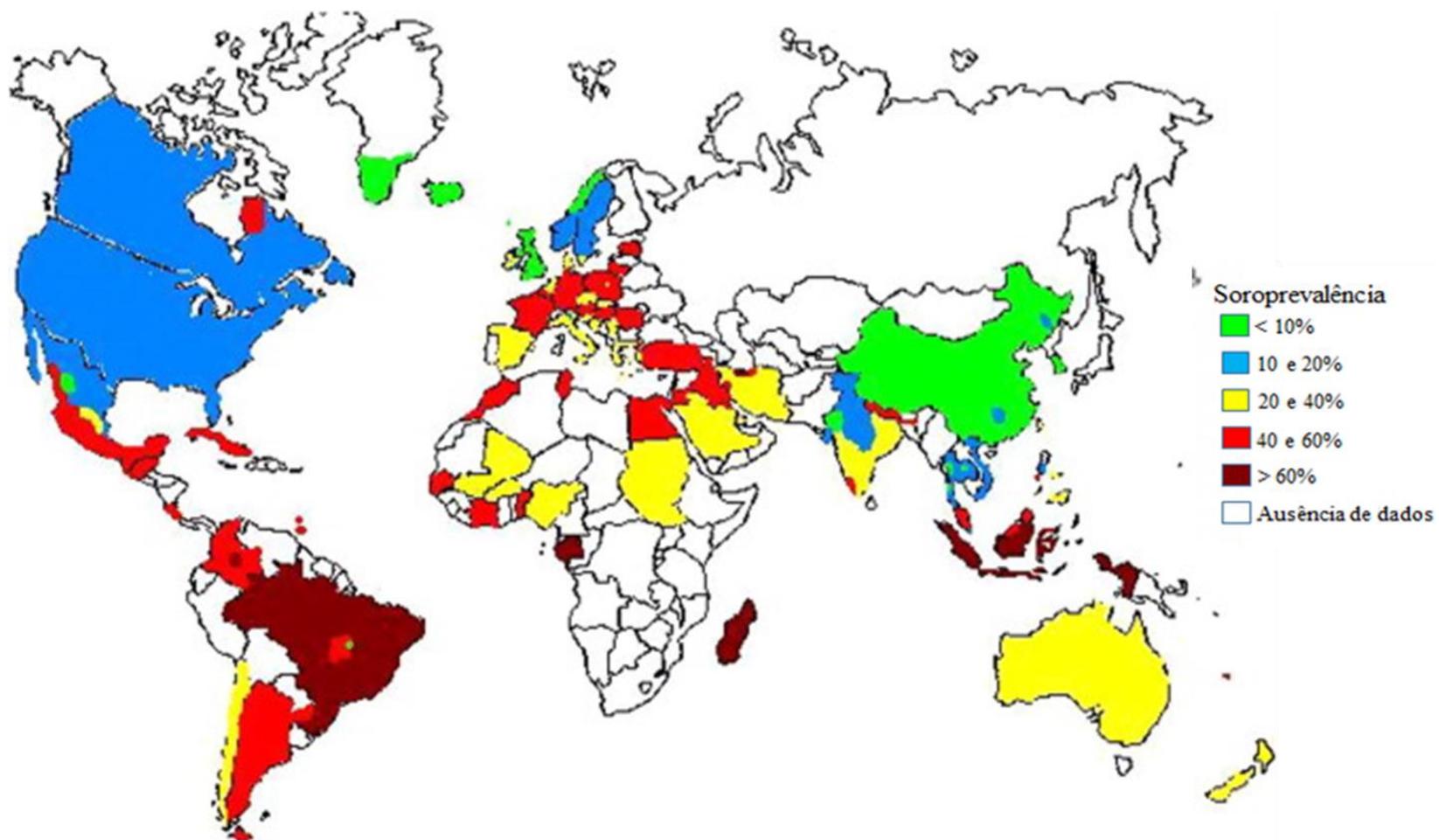
PINKERTON e WEINMAN (1940) foram os primeiros a descreverem a doença em um adulto de 22 anos, no Peru. PINKERTON e HENDERSON (1941) relataram outros dois casos em adultos em Saint Louis, Missouri (EUA), sendo estes os primeiros relatos de toxoplasmose em adultos com ausência de sinais neurológicos.

A realização de estudos epidemiológicos sobre a incidência do protozoário *Toxoplasma gondii* na população mundial somente foi possível após a introdução da técnica sorológica *dye test* (SABIN e FELDMAN, 1948).

O Brasil possui uma das maiores taxas de soroprevalência do protozoário *Toxoplasma gondii*, sendo que diferentes estudos realizados no país indicam uma soroprevalência entre 50 e 80%, variando em diferentes estados (DUBEY et al., 2012).

No período de 1992 a 2009 foram coletados dados referentes a distribuição geográfica mundial da toxoplasmose e respectivas taxas de soroprevalência (Figura 2). Foi observada menor prevalência da infecção na Ásia e uma alta prevalência em países do Oriente Médio e ilhas da Indonésia e Madagascar (PAPPAS et al., 2009).

Figura 2 – Distribuição geográfica mundial da toxoplasmose no período de 1992 a 2009



Fonte: Adaptado de PAPPAS et al., 2009

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose pode ser realizado indiretamente através de métodos sorológicos e diretamente por reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridação, isolamento e anatomopatologia (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

A doença possui tratamento, mas não existem atualmente, vacinas para a toxoplasmose humana (FIALHO et al., 2009). O tratamento mais utilizado consiste na associação de sulfadiazina com a pirimetamina, mas estão disponíveis outras sulfonamidas (sulfamerazina, sulfametazina e sulfapirazina), além de clindamicina, dapsona e atovaquona (NEVES, 2003).

A prevenção da toxoplasmose deve ser realizada através de medidas de higiene, visando evitar o contato e a ingestão de oocistos e cistos teciduais do protozoário. Os oocistos são eliminados nas fezes de felídeos infectados e estão portanto, presentes no meio ambiente. Os cistos teciduais podem estar presentes na musculatura e no tecido encefálico de diversos mamíferos e aves infectados. Indivíduos não infectados, especialmente gestantes e imunocomprometidos devem evitar o contato com as fezes de felídeos e locais possivelmente contaminados (solo e caixas de areia); devendo ainda manter uma higiene adequada em relação a ingestão de alimentos e água. Finalmente, a prevenção da toxoplasmose congênita depende de exame pré-natal e do tratamento das gestantes soropositivas para toxoplasmose (DABRITZ e CONRAD, 2010). Essas ações visam principalmente diminuir a exposição dos grupos de risco como o das mulheres em idade fértil e a dos pacientes imunocomprometidos (BOJAR e SZYMANSKA, 2010; LAGO et al., 2009).

A severidade da toxoplasmose em hospedeiros imunocompetentes pode variar em decorrência do genótipo do protozoário, variabilidade do hospedeiro ou ainda em decorrência de outros fatores desconhecidos. Os genótipos atípicos do *Toxoplasma gondii* podem ser responsáveis por infecções graves ou letais em indivíduos imunocompetentes, podendo provocar pneumonia, miocardite, meningoencefalite, ou polimiosite (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012).

O desenvolvimento de métodos moleculares altamente sensíveis facilitou a detecção, diagnóstico e caracterização genotípica de *Toxoplasma gondii* nos mais diferentes tipos

de amostras. Os genótipos podem ser identificados através de eletroforese de enzimas multilocus (MLEE), reação da polimerase em cadeia com polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e tipagem com microssatélite (DARDÉ et al., 1992; HOWE e SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002).

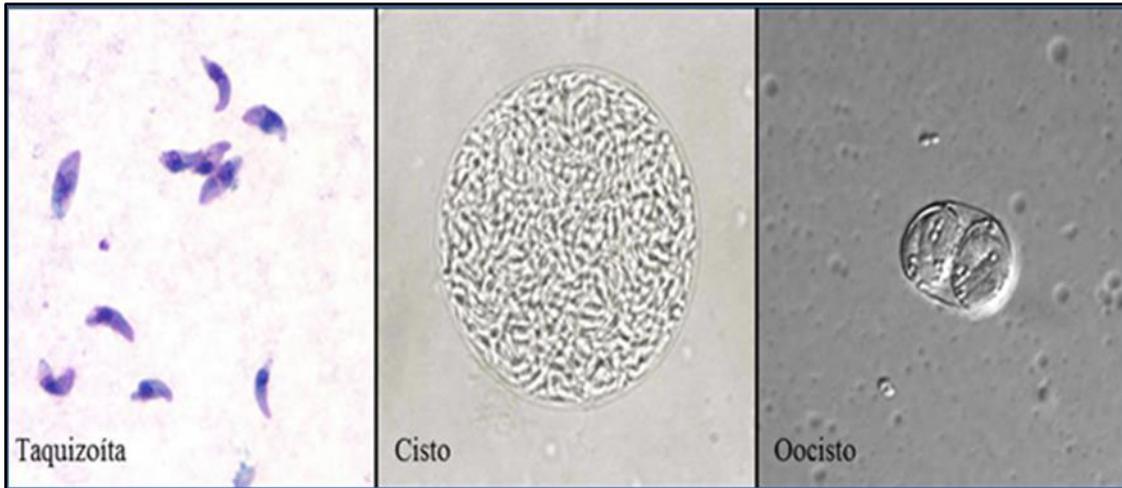
Com este avanço, foi possível estudar a correlação entre o genótipo do protozoário e padrões da doença, epidemiologia, bem como sua estrutura populacional (PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2009).

2.2 Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*

Em 1970, o ciclo de vida completo do *Toxoplasma gondii* foi elucidado, definindo os felídeos como hospedeiros definitivos e os mamíferos e aves como hospedeiros intermediários (FRENKEL et al., 1970; DUBEY et al., 1970).

Nos hospedeiros definitivos esse protozoário realiza dois tipos de reprodução: sexuada e assexuada, enquanto que nos hospedeiros intermediários realiza apenas a reprodução assexuada (Figura 3). Na reprodução assexuada são originados os taquizoítos (encontrados em diversos tecidos e fluidos corporais) e os bradizoítos contidos em cistos teciduais (presentes em carnes e vísceras de hospedeiros infectados). A reprodução sexuada origina os oocistos que são eliminados junto com as fezes dos hospedeiros definitivos (FRENKEL et al., 1970; DUBEY et al., 1970; MONTOYA e LIESENFELD, 2004). Os oocistos ao esporularem no ambiente são uma fonte potencial de infecção para o homem e outros hospedeiros (DUBEY e BEATTIE, 1988; TENTER et al., 2000).

Figura 4 – Formas evolutivas do *Toxoplasma gondii*



Fonte: Adaptado de CDC, 2013

Os taquizoítos possuem forma elíptica, medem 2 μm x 6 μm e consistem no estágio evolutivo do *Toxoplasma gondii* que se multiplica rapidamente no interior de vários tipos de células nucleadas dos hospedeiros. As células hospedeiras se rompem e os taquizoítos são disseminados através da corrente sanguínea, infectando muitos tecidos. Provocam uma forte resposta inflamatória, destruição dos tecidos e como consequência surgem as manifestações clínicas da doença. Os taquizoítos são transformados em bradizoítos e originam os cistos (DUBEY et al., 1998; MONTOYA e LIESENFELD, 2004).

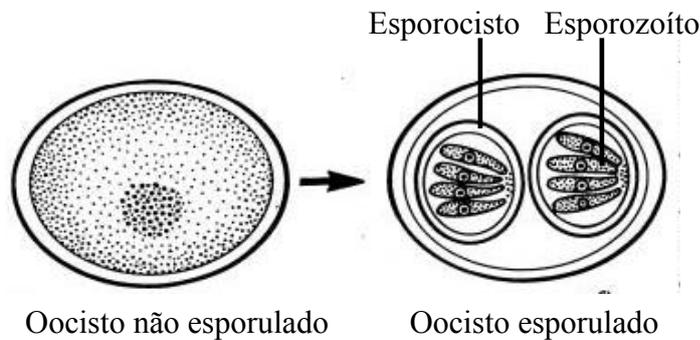
Os bradizoítos medem cerca de 1,5 a 7 μm e formam os cistos teciduais que variam de tamanho, alcançando em média 5 a 70 μm . Estes podem conter poucos a centenas de bradizoítos no seu interior. Os cistos teciduais possuem como principal característica biológica a capacidade de se reproduzir lentamente e podem permanecer latentes por toda a vida no hospedeiro. São mais prevalentes nos tecidos musculares e nervoso, incluindo cérebro, olhos e músculos cardíacos e esqueléticos (DUBEY et al., 1998; DUBEY, 2004; HILL et al., 2005).

Os oocistos são esféricos, possuem cerca de 10 a 12 μm de diâmetro, são provenientes do ciclo sexuado dos felídeos, sendo esta a forma de resistência ambiental do protozoário. Cada oocisto esporulado contém dois esporocistos e dentro de cada um destes existem quatro células haploides denominadas esporozoítos, que são infectantes e medem 2 μm de largura por 6 μm de comprimento (DUBEY et al., 1970; 1998).

Os oocistos são eliminados não esporulados no meio ambiente através das fezes dos felídeos. O processo de esporulação ocorre no período de 2 a 5 dias, dependendo de temperatura, umidade e aeração adequadas (DUBEY et al., 1970; Dubey et al., 1998). Os oocistos esporulados são muito resistentes as condições ambientais, podendo permanecer viáveis por longo período de tempo no ambiente (DUBEY e BEATTIE, 1988).

Na figura 5 observa-se o oocisto de *Toxoplasma gondii* não esporulado e o oocisto esporulado. No oocisto esporulado verifica-se dois esporocistos e no interior destes destaca-se os quatro esporozoítos.

Figura 5 – Oocistos de *Toxoplasma gondii*



Fonte: Adaptado de DUBEY et al., 1998

Dentre as 3 formas evolutivas do *Toxoplasma gondii*, oocistos são considerados mais virulentos que taquizoítos ou bradizoítos (DUBEY e BEATTIE, 1998).

Os gatos eliminam os oocistos no ambiente após a ingestão de qualquer uma das formas evolutivas do protozoário. Somente 30% dos felídeos eliminam os oocistos no ambiente após ingerirem taquizoítos ou oocistos, enquanto que praticamente todos os que ingerirem bradizoítos eliminam os oocistos (DUBEY e JONES, 2008).

O *Toxoplasma gondii* circula do hospedeiro definitivo para o intermediário ou vice-versa, bem como entre os hospedeiros definitivos e entre os hospedeiros intermediários. A prevalência da infecção não depende exclusivamente da presença do hospedeiro definitivo,

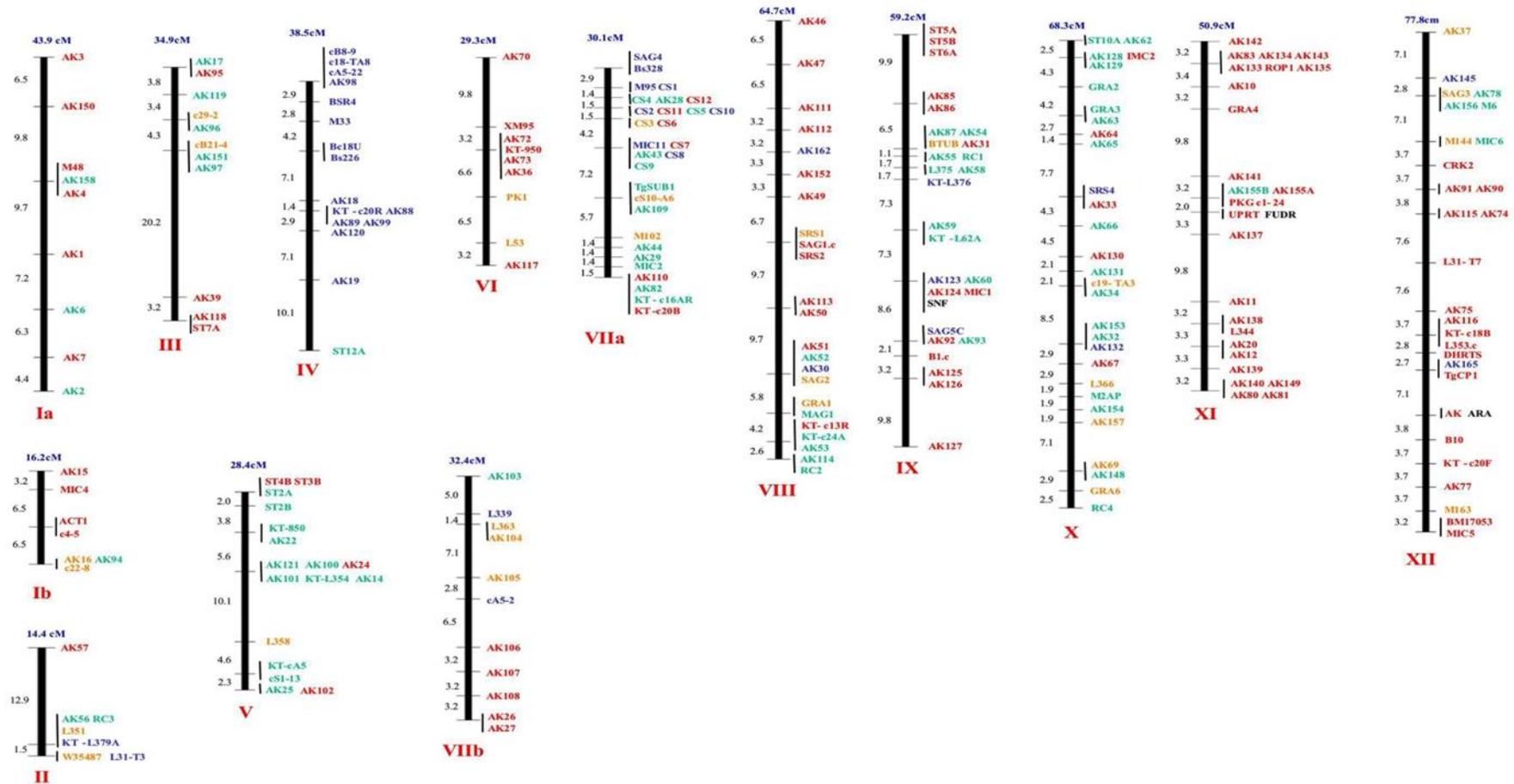
fazendo com que o seu ciclo de vida continue por meio da transmissão de cistos teciduais entre os hospedeiros intermediários (DUBEY, 2009).

2.3 Caracterização molecular e estrutura populacional do *Toxoplasma gondii*

O protozoário *Toxoplasma gondii* apresenta um genoma nuclear estável, composto por aproximadamente 87 Mb. É complementado por um DNA circular extracromossomal de 35 Kb no interior do apicoplasto e um genoma mitocondrial de 6 Kb (SIBLEY e AJIOKA, 2008).

Inicialmente foi dividido em 11 cromossomos (SIBLEY e BOOTHROYD, 1992). Posteriormente um novo mapa genético foi elaborado com 14 cromossomos, os quais foram designados por algarismos romanos (KHAN et al., 2005). O mapa genético dos 14 cromossomos do *Toxoplasma gondii*, assim como a localização dos diferentes genes e *loci* utilizados em estudos de genotipagem podem ser visualizados na Figura 6.

Figura 6 – Mapa genético dos 14 cromossomos do *Toxoplasma gondii*



SNP profile: **Type I specific**, **Type II specific**, **Type III specific**, **3-way markers**.

14 chromosomes; Total genetic size = 589 cM; Average map unit = 110,36 kb per cM

Inicialmente a caracterização genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* em humanos e animais na Europa e na América do Norte apresentou uma estrutura populacional altamente clonal. Os três genótipos predominantes nesta estrutura consistem nos tipos I, II e III (DARDÉ et al., 1992; HOWE e SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002). Posteriormente, análises de cepas atípicas da América do Norte revelaram um quarto genótipo, denominado tipo 12, além dos genótipos descritos acima (KHAN et al., 2011).

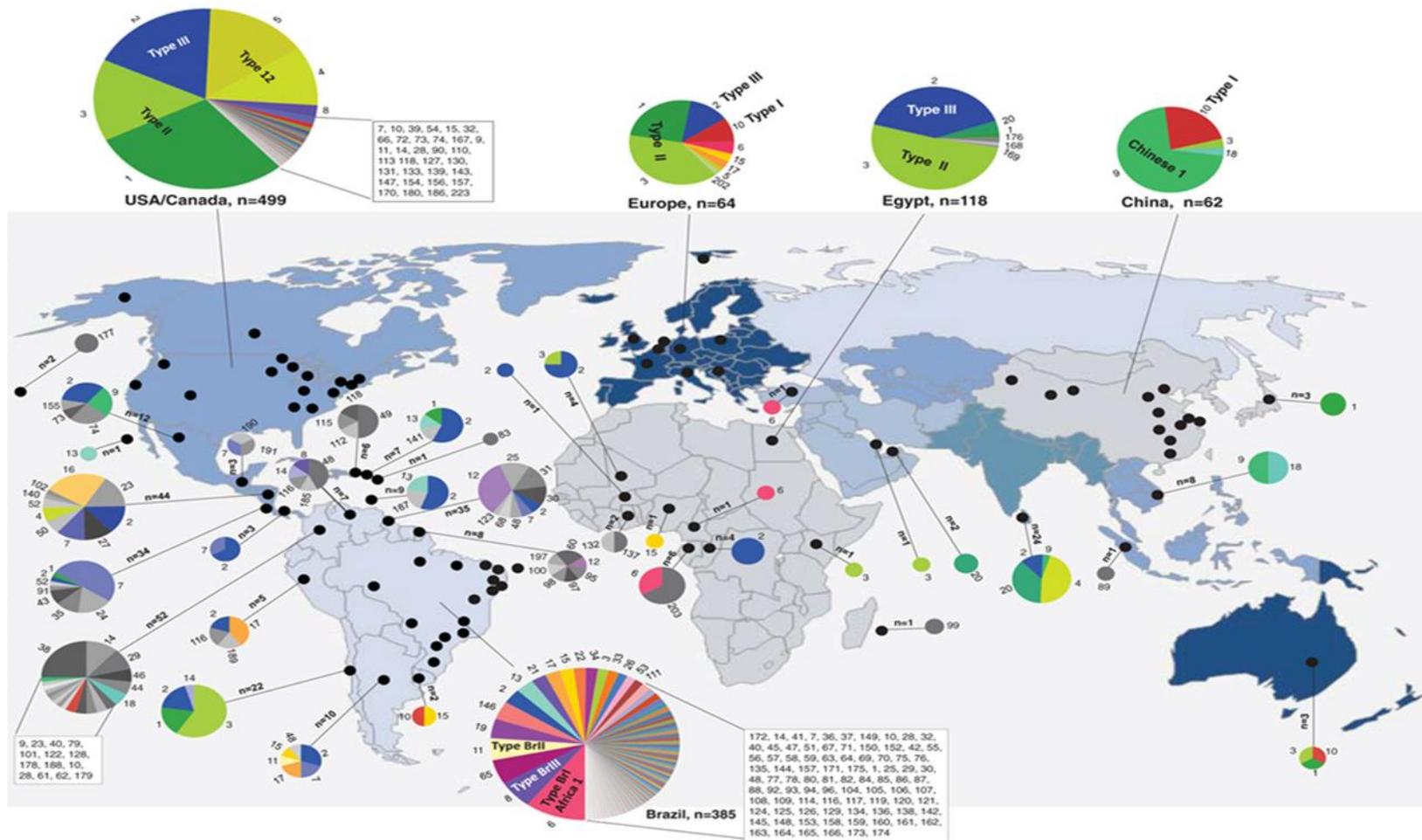
O genótipo tipo I é considerado o mais virulento e está mais associado à infecção congênita. Este comportamento deve estar associado a alguma propriedade intrínseca do protozoário, podendo ocasionar infecções mais graves em seres humanos, principalmente nos indivíduos portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HOWE e SIBLEY, 1995; BOOTHROYD e GRIGG, 2002). O genótipo tipo II é considerado menos virulento e também pode causar toxoplasmose congênita, com comprometimento neurológico e ocular grave. Já o genótipo tipo III, é considerado de virulência intermediária e é encontrado com maior frequência em animais (BOOTHROYD e GRIGG, 2002).

Novas pesquisas detectaram grupos de cepas de *Toxoplasma gondii* definidas como recombinantes ou atípicas por não se enquadrarem em nenhum dos grupos descritos acima. Estas diferenças foram relatadas principalmente em isolados obtidos no Brasil (PENA et al., 2008; 2013).

Uma extensa coleção de isolados de *Toxoplasma gondii* vem sendo caracterizado através da técnica de PCR-RFLP (Reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição), utilizando vários marcadores genéticos (SHWAB et al., 2014). A análise em múltiplos *loci* de novos isolados, principalmente os oriundos da América do Sul, demonstram um padrão genotípico que não corresponde com o da América do Norte e Europa e, portanto, não devem ser classificados simplesmente como tipo I, II e III (SHWAB et al., 2014).

Análises estatísticas indicam diferenças significativas entre as populações de *Toxoplasma gondii* presentes na África, Ásia, Europa, América do Norte, América Central e América do Sul (Figura 7), sendo observada uma similaridade populacional do protozoário apenas na Europa e na América do Norte (SHWAB et al., 2014).

Figura 7 – Diversidade genotípica do *Toxoplasma gondii*



Fonte: Adaptado de SHWAB et al., 2014

A amplitude geográfica e a grande biodiversidade da fauna no Brasil podem contribuir para a grande diversidade genotípica das cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas no país. Sugere-se também que a genotipagem das cepas deste protozoário baseada apenas em um ou dois *loci* através da técnica de PCR-RFLP apresenta limitações, impossibilitando a identificação de genótipos recombinantes (FERREIRA et al., 2006).

Um estudo realizado nos estados de São Paulo e Minas Gerais, utilizando isolados de *Toxoplasma gondii* de humanos e animais caracterizados através da técnica de PCR-RFLP em oito *loci* independentes, demonstrou que todas as cepas avaliadas eram recombinantes naturais (FERREIRA et al., 2006). A diversidade genética do *Toxoplasma gondii* no Brasil indica que a recombinação sexual ocorre com maior frequência que a esperada (LEHMANN et al., 2004; 2006, FERREIRA et al., 2006, KHAN et al., 2006, SU et al., 2010).

Vários estudos realizados em isolados de origem animal, como em galinhas (BRANDÃO et al. 2006; DUBEY et al. 2010; SOARES et al., 2011), gatos (PENA et al. 2008), porcos (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011) e animais silvestres (PENA et al. 2011) evidenciaram uma alta diversidade genotípica dos isolados brasileiros.

Os quatro genótipos mais comuns relatados em nosso país são: tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV, evidenciando que a população de *Toxoplasma gondii* no Brasil é altamente diversificada. Baseada na frequência de mortalidade em camundongos infectados, os isolados tipo BrI são considerados virulentos, os isolados tipo BrII e BrIV são considerados virulentos intermediários e os tipo BrIII são considerados como não virulentos (PENA et al., 2008).

Outro estudo realizado com isolados de galinha no estado do Espírito Santo relatou que o genótipo tipo BrI é o mais encontrado nessa região. Embora um grande número de genótipos de *Toxoplasma gondii* já foram identificados a partir de uma variedade de hospedeiros animais no Brasil, novos genótipos são continuamente identificadas a partir de diferentes espécies animais. Este estudo também confirmou a diversidade populacional de *Toxoplasma gondii* no Brasil, demonstrando que os genótipos clonais Tipo I, II e III são raros no país (PENA et al., 2013).

Um estudo sobre a mortalidade em lontras marinhas associada a toxoplasmose na Califórnia resultou na descrição de um novo genótipo de *Toxoplasma gondii* denominado tipo X (CONRAD et al., 2005). Outro genótipo denominado tipo A também foi evidenciado em um estudo realizado com isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de lontras marinhas na Califórnia e em Washington (SUNDAR et al., 2008).

2.4 Métodos de detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas

Embora os métodos de detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de águas já estejam relativamente padronizados e disponíveis há alguns anos, o mesmo não acontece com os métodos para a detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* neste tipo de amostra, não existindo um método padronizado que seja amplamente utilizado (KARANIS et al., 2013).

Vários estudos para a detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de água contaminada vêm sendo publicados por diferentes grupos de trabalho (ISAAC-RENTON et al., 1998, DUMÉTRE e DARDÉ, 2003; KOURENTI e KARANIS, 2004; SOTIRIADOU e KARANIS, 2008; YANG et al., 2009; GALLAS-LINDEMANN et al., 2013; LORA-SUAREZ et al, 2016; TRIVIÑO-VALENCIA et al., 2016).

O aumento da ocorrência de surtos de toxoplasmose por veiculação hídrica vem estimulando os pesquisadores a desenvolverem novos métodos que possam detectar de forma eficiente os oocistos presentes em amostras ambientais, principalmente em amostras de águas (KARANIS et al, 2013).

Os métodos convencionais para a detecção de protozoários em amostras de água geralmente utilizam a concentração da amostra por filtração, floculação ou centrifugação; técnicas de purificação com gradiente de sacarose ou separação imunomagnética (IMS); microscopia de imunofluorescência; bioensaio; técnicas moleculares e até mesmo a combinação dessas técnicas (YANG et al., 2009).

A técnica de concentração através da filtração de grandes volumes de amostra apresenta melhor eficiência na recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas em relação às técnicas de concentração através de floculação e centrifugação (YANG et al., 2009).

Os oocistos de *Toxoplasma gondii* são maiores que os oocistos de *Cryptosporidium* spp. e então passíveis de remoção pela técnica de filtração quando utilizados os mesmos filtros empregados na concentração dos oocistos deste protozoário em amostras de águas através do Método 1623.1 da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2012).

A técnica de concentração de amostras de águas que utiliza a floculação com sulfato de alumínio apresenta boa sensibilidade na recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras ambientais, no entanto, turbidez, baixas temperaturas, alcalinidade, valores extremos de pH entre outros fatores podem resultar baixa precipitação na etapa de concentração da amostra por esta técnica (KARANIS et al., 2013).

Comercialmente não existem kits de IMS disponíveis no mercado que sejam amplamente utilizados e apresentem uma boa sensibilidade e especificidade na detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas. O mesmo acontece com os kits de anticorpos para a técnica de microscopia de imunofluorescência. Técnicas de IMS vêm sendo desenvolvidas para o isolamento dos oocistos e esporozoítos de *Toxoplasma gondii*, no entanto a especificidade para ambos é relativamente baixa, principalmente devido a reações cruzadas dos anticorpos com a parede de *Hammondia hammondi*, *Hammondia heydorni* e *Neospora caninum* (YANG et al., 2009).

A identificação microscópica do *Toxoplasma gondii* também apresenta várias limitações. A característica azul da autofluorescência dos oocistos ou esporozoítos do protozoário permite a diferenciação microscópica de outras partículas presentes na amostra. No entanto, não são todos os oocistos que exibem esta autofluorescência, o que leva a obtenção de resultados falso negativos no caso de uma baixa densidade de oocistos presentes na amostra (YANG et al., 2009).

Resultados falso positivos também podem ocorrer na identificação microscópica, visto que os oocistos de *Toxoplasma gondii* podem ser facilmente confundidos com oocistos de outros protozoários presentes nas amostras ambientais, como *Hammondia* spp., *Besnoitia* spp., *Neospora* spp., que são muito semelhantes e não são patogênicos para o homem e também apresentam esta fluorescência (LINDQUIST et al., 2003).

Em razão de toda esta complexidade, a abordagem de novas metodologias para a detecção deste protozoário em amostras ambientais vem se tornando um contínuo desafio aos pesquisadores. Métodos de detecção cada vez mais sensíveis e eficazes, incluindo técnicas de biologia molecular vêm sendo desenvolvidos para esta finalidade (GALLAS-LINDEMANN et al., 2013).

A técnica de amplificação isotérmica do ácido desoxirribonucleico (DNA) mediada por Loop (LAMP) é uma metodologia promissora para a detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras clínicas e de águas, mas ainda não está bem estabelecida. Consiste na amplificação isotérmica do DNA de *Toxoplasma gondii* associada à detecção por bioluminescência, tendo suas reações contínuas operando a uma única temperatura (GALLAS-LINDEMANN et al., 2013; KARANIS et al., 2013). Durante a amplificação, múltiplos iniciadores se alocaem simultaneamente em posições específicas do genoma, o que confere a tecnologia uma boa sensibilidade. Ao mesmo tempo em que o DNA é amplificado, ocorre também à sua detecção e, por isso, seu resultado ocorre em tempo real. A luz produzida pela reação é mensurada em Unidade Relativa de Luz (RLU) através de um software, que interpreta o resultado graficamente. Quanto mais luz for produzida na reação, mais DNA do micro-organismo alvo está presente na amostra. Vem sendo aplicada no desenvolvimento de testes diagnósticos para a detecção de parasitas em amostras biológicas ou ambientais (KARANIS et al., 2013).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional consiste na identificação de uma região do DNA alvo, para o desenvolvimento de oligonucleotídeos (iniciadores) que em condições ideais de temperatura e pH, hibridizam-se especificamente na região escolhida, levando à amplificação exponencial deste fragmento. Esta técnica convencional é qualitativa, apresentando como grande desvantagem a necessidade de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida para a visualização do produto amplificado (HEID et al., 1996).

A reação da PCR em tempo real (Higuchi et al., 1992) representa um significativo avanço biotecnológico para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias (ESPY et al., 2006; GOMES et al., 2006; MDIVANI et al., 2009; PAIVA CAVALCANTI et al., 2008). É capaz de promover uma quantificação acurada e monitoramento em tempo real do produto amplificado e vem sendo utilizada para a detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras clínicas, reduzindo o tempo de detecção de semanas para 1 a 2 dias. Associada às técnicas de concentração de parasitas em amostras de águas é uma alternativa promissora para a detecção específica e sensível de *Toxoplasma gondii* em amostras ambientais. É capaz de detectar baixas concentrações de oocistos do protozoário, provenientes de sedimentos concentrados de amostra de água através da técnica de filtração, sendo uma boa alternativa para métodos tradicionais como o bioensaio e a microscopia (YANG et al., 2009).

Existem divergências entre qual a melhor sequência alvo para o diagnóstico da toxoplasmose. Alguns autores preferem utilizar marcadores provenientes do gene B1, pois além deste ser repetido 35 vezes no genoma do protozoário, tem se mostrado bastante sensível e conservado dentre as diferentes cepas de *Toxoplasma gondii* (BURG et al., 1989). No entanto, com a descrição da sequência de 529 pares de bases (pb) por HOMAN et al. (2000), repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *Toxoplasma gondii*, surgiram vários estudos com o intuito de comparar marcadores provenientes desta nova sequência com os marcadores já em uso, provenientes do gene B1.

Alguns pesquisadores notaram diferenças de sensibilidade entre diferentes materiais biológicos e reportaram que o fragmento de 529 pb só é mais sensível do que o gene B1 quando há pouco DNA do protozoário presente na amostra, sugerindo desta maneira que novos trabalhos deveriam certificar-se de que este fragmento encontra-se realmente conservado entre as diferentes cepas de *Toxoplasma gondii* (EDVINSSON et al., 2006).

O gene B1 possui um tamanho de 2,2 Kb, foi isolado e descrito em 1987 (BOOTHROYD et al., 1987), demonstrando ter uma natureza repetitiva no genoma do protozoário. Possui uma alta sensibilidade e especificidade na reação de PCR para a detecção de *Toxoplasma gondii*. Outra característica demonstrada foi o fato do gene B1 ser uma região conservada em todas as cepas do protozoário (BURG et al., 1989).

Muitos esforços, no entanto, têm sido realizados para aperfeiçoar estas metodologias com o intuito de obter uma recuperação eficaz dos oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras ambientais. A utilização de alguns métodos moleculares torna possível na maioria das vezes,

verificar a ocorrência e prevalência de oocistos de *Toxoplasma gondii* presentes em matrizes ambientais e também especificar a origem das fontes de contaminação, sendo bastante útil para detecção deste protozoário nas investigações de surtos de veiculação hídrica (KARANIS et al, 2013).

Surtos de toxoplasmose são ocorrências comuns em saúde pública e uma análise criteriosa dos casos, sua distribuição e a determinação da extensão do mesmo pode fornecer pistas importantes sobre a fonte da infecção. O conhecimento da fonte de infecção é essencial para que as medidas preventivas adequadas sejam tomadas, principalmente quando a contaminação de um reservatório de água expõe um grande número de indivíduos em risco (MEIRELES et al., 2015).

O desenvolvimento de métodos simples, rápidos e sensíveis para a detecção e quantificação desse protozoário é importante tanto para o aperfeiçoamento do diagnóstico da infecção como também para estudos epidemiológicos da toxoplasmose (SU et al., 2010). A necessidade de desenvolvimento e implantação de metodologia sensível e específica para a detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas tratadas e brutas é atualmente um evento reconhecido internacionalmente pelos principais pesquisadores da área (KARANIS et al., 2013).

A relativa escassez de artigos descrevendo a detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas no Brasil, a ausência de métodos padronizados, rápidos, sensíveis e específicos e também a importância que a água vem assumindo nos últimos anos na veiculação de surtos de toxoplasmose, entre outros fatores, demonstram a relevância deste estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência e concentração de oocistos de *Toxoplasma gondii* em águas superficiais captadas para abastecimento público no Estado de São Paulo, devido à importância da veiculação hídrica deste protozoário.

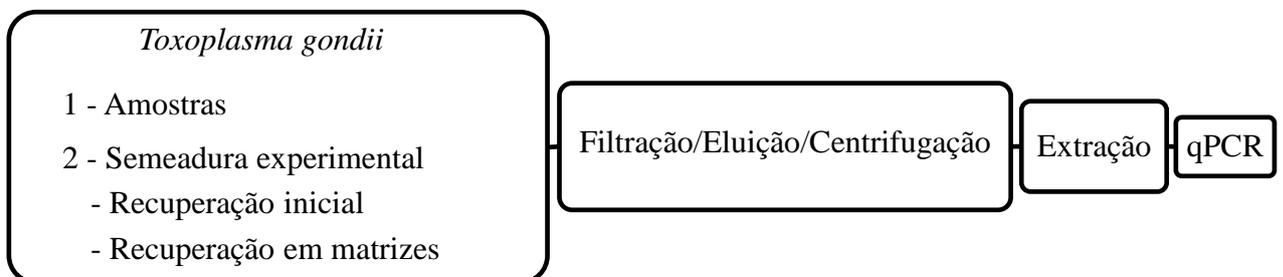
3.2 Objetivos específicos

1. Implantar metodologia para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais captadas para abastecimento público por reação de qPCR.
2. Aplicar a metodologia de qPCR para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais captadas para abastecimento público.

4 METODOLOGIA

O delineamento experimental do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais e dos testes de avaliação de desempenho do método utilizados nesse estudo estão apresentadas na figura 8.

Figura 8 – Delineamento experimental do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais e dos testes de avaliação de desempenho do método



4.1 Amostragem

4.1.1 Pontos de coleta

Para a realização desse estudo foram selecionados 10 pontos de coleta de águas superficiais em áreas de captação para consumo humano (Quadro 1). Esses pontos de coleta foram selecionados por se apresentarem impactados por lançamento de esgoto bruto e tratado, de acordo com o Relatório da Rede de Monitoramento da Qualidade de Águas Interiores do

Estado de São Paulo, realizado pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) durante o ano de 2014 (CETESB, 2015). Foram também utilizados como critérios de seleção, os resultados com alta densidade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. obtidos no respectivo relatório.

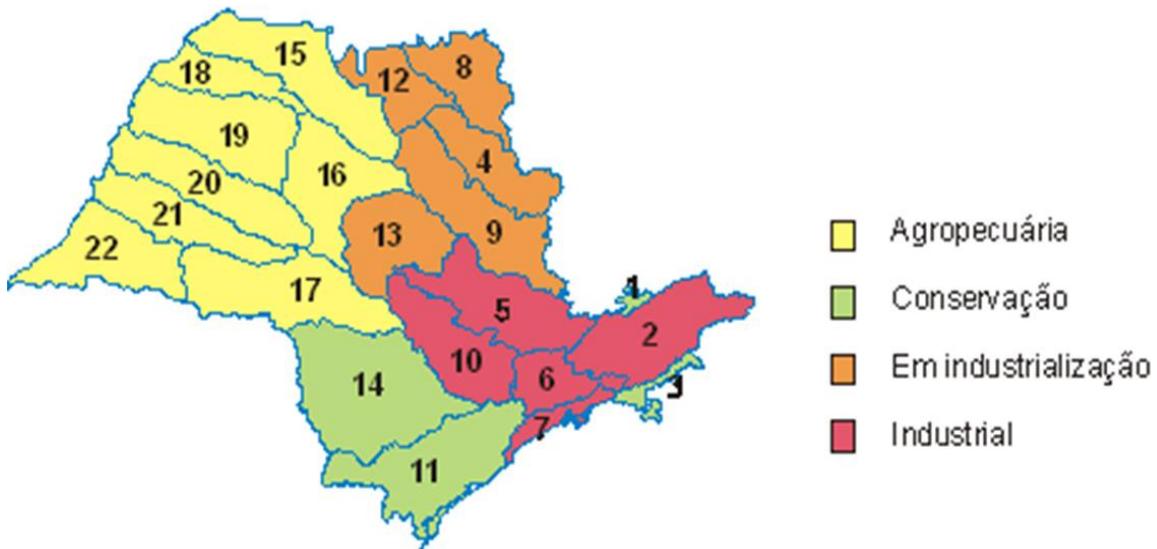
Quadro 1 – Pontos de coleta com respectivas coordenadas geográficas

Corpo Hídrico	Coordenadas		Município	UGRHI
	Latitude	Longitude		
Rio Atibaia	22° 55' 43" S	46° 56' 21" W	Valinhos	5
Rio Atibaia	22° 54' 18" S	46° 58' 26" W	Campinas	5
Rio Jaguari	22° 44' 48" S	46° 53' 52" W	Pedreira	5
Rio Jaguari	22° 42' 44" S	46° 58' 17" W	Jaguariúna	5
Rio Corumbataí	22° 38' 01" S	47° 40' 58" W	Piracicaba	5
Rio Piracicaba	22° 42' 44" S	47° 38' 58" W	Piracicaba	5
Rio Pirapora	23° 36' 53" S	47° 35' 56" W	Salto de Pirapora	10
Rio Paraíba	22° 50' 40" S	45° 14' 04" W	Aparecida	2
Rio Cotia	23° 32' 25" S	46° 51' 45" W	Cotia	6
Ribeirão dos Cristais	46° 51' 45" W	46° 49' 29" W	Cajamar	6

Fonte: CETESB, 2015

A Rede de Monitoramento da Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo foi criada em 1974, em atendimento à Lei Estadual nº 118/73. Tem como principal objetivo avaliar a qualidade das águas de rios e reservatórios do Estado, utilizados entre outros usos, para abastecimento público. As informações obtidas por meio deste monitoramento têm possibilitado a avaliação da qualidade das águas de rios e reservatórios situados nas 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs), em que se divide o Estado de São Paulo. Inclui coletas realizadas bimestralmente em diferentes pontos, nas diferentes UGRHs, nos quais variáveis físicas, químicas e biológicas são avaliadas para estimar a qualidade da água. Os pontos selecionados nesse estudo localizam-se em área de vocação industrial. A localização e vocação das 22 UGRHs do Estado de São Paulo podem ser visualizadas na Figura 9.

Figura 9 – Localização e vocação das 22 UGRHIs do Estado de São Paulo



Fonte: CETESB, 2015

4.1.2 Coleta

Foram coletadas pela Divisão de Amostragem da CETESB, no período de maio a dezembro de 2015, 40 amostras de águas superficiais, nos 10 pontos selecionados. A frequência de amostragem foi bimestral, sendo coletado um volume de 20L de água superficial em cada ponto, conforme procedimento de coleta descrito no Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras de Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos (CETESB, 2011). Os dados de coleta incluíram também os seguintes parâmetros: turbidez, condições meteorológicas (presença de chuvas) e pH. As amostras foram transportadas sob refrigeração (temperatura de 2 a 8°C) ao laboratório e analisadas no período máximo de 24 horas após a coleta.

4.2 Concentração das amostras

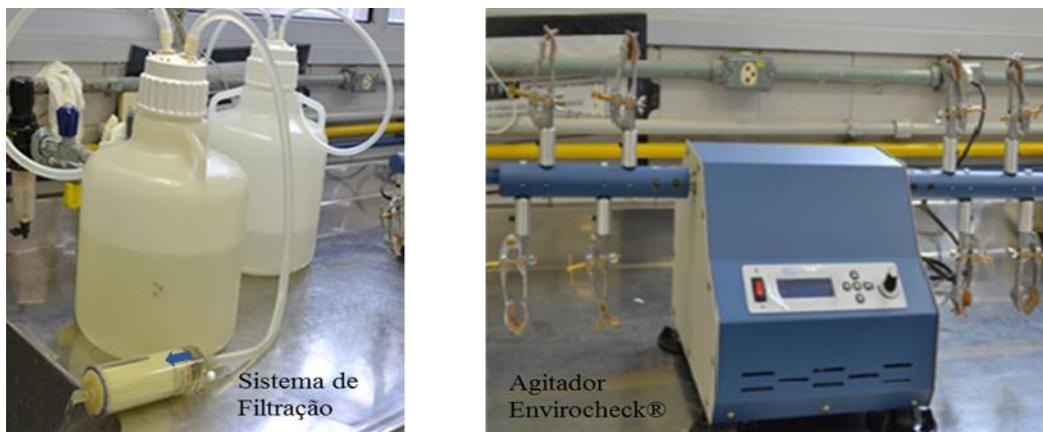
A concentração das amostras de águas superficiais para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* foi realizada de acordo com o método 1623.1 (USEPA, 2012). Volumes de 20L de cada amostra foram filtrados, a cápsula filtrante foi tratada com uma solução dispersante e eluída, sendo o eluato concentrado por centrifugação.

4.2.1 Filtração

O sistema de filtração para a concentração da amostra utilizando a cápsula Envirocheck® HV (1 µm de porosidade) e o respectivo agitador foram devidamente preparados de acordo com as especificações do fabricante (Figura 10).

Foi realizada a filtração de 20 L de cada amostra de água superficial, utilizando uma bomba de pressão positiva, sendo que o fluxo de filtração não excedeu 2 L / minuto.

Figura 10 – Sistema de filtração de amostra e agitador Envirocheck®



Crédito: José Antonio Padula/CETESB

4.2.2 Tratamento da cápsula de filtração com solução dispersante antes da eluição da amostra

Após a filtração da amostra, foi adicionada quantidade suficiente de solução de hexametáfosfato de sódio (NaHMP) através da abertura de entrada da cápsula de filtração até que toda a área da membrana interna estivesse em contato com esta solução (Figura 11).

Figura 11 – Adição de solução dispersante (NaHMP) à cápsula de filtração



Crédito: José Antonio Padula/CETESB

Após recolocar a tampa de entrada da cápsula, a mesma foi fixada firmemente em uma das pinças do agitador com a válvula de purga posicionada no topo do eixo vertical, na posição 12 horas. O processo de agitação foi realizado em velocidade máxima (900 rotações por minuto) durante 5 minutos.

Finalizada a agitação, a cápsula foi desconectada do agitador, sendo retirada a tampa de entrada. Foi anexado o tubo de entrada da cápsula nas conexões da bomba de pressão positiva. A cápsula foi colocada na posição vertical, sendo retirada a tampa de saída. Foi então ligada a bomba de pressão positiva, permitindo passar todo o NaHMP através da cápsula de filtração, no sentido da seta do fluxo de filtração da cápsula (Figura 12). A bomba de pressão positiva foi desligada ao final deste processo, não permitindo que as pregas da cápsula de filtração colabassem durante o bombeamento do NaHMP.

Figura 12 – Filtração da solução dispersante



Crédito: José Antonio Padula/CETESB

Foi realizada uma lavagem da cápsula de filtração, adicionando-se água de osmose reversa à mesma até que toda a membrana interna fosse coberta. Foi permitido o líquido estabilizar e então procedeu-se a filtração de toda a água de osmose reversa através da cápsula (sentido da seta do fluxo de filtração da cápsula).

4.2.3 Eluição

A cápsula de filtração foi fixada no agitador na posição vertical com a extremidade de entrada posicionada para cima. Adicionou-se quantidade suficiente de solução tampão eluição a

mesma até que toda a membrana interna fosse coberta e aguardou-se a estabilização do líquido. A cápsula foi posicionada no agitador com as respectivas tampas de entrada e saída e com a válvula de purga na posição 12 horas. O processo de agitação foi realizado novamente em velocidade máxima (900 rotações por minuto) durante 5 minutos. O eluato obtido foi reservado em tubo cônico, sendo retirado da cápsula no sentido contrário ao da seta do fluxo de filtração (Figura 13).

Figura 13 – Eluição da amostra



Crédito: José Antonio Padula/CETESB

Adicionou-se novamente quantidade suficiente de solução tampão eluição no interior da cápsula e a mesma foi posicionada no agitador com a válvula de purga na posição 4 horas. Foi realizada nova agitação em velocidade máxima (900 rotações por minuto) durante 5 minutos. Mantendo a solução tampão de eluição no interior da cápsula, a mesma foi reposicionada no agitador com a válvula de purga na posição 8 horas e nova agitação foi realizada. O eluato obtido foi adicionado ao tubo cônico contendo o primeiro eluato.

4.2.4 Centrifugação

Após a eluição da amostra, o eluato final foi concentrado por centrifugação a 1500 X G durante 15 minutos. O sedimento obtido foi congelado a -80°C até a realização das extrações de DNA das respectivas amostras.

4.3 Extração de DNA

O sedimento obtido após a centrifugação da amostra foi submetido à extração de DNA, sendo utilizado o kit de extração PowerSoil DNA isolation® (MO BIO Laboratories), de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante e descritos abaixo.

A amostra foi adicionada ao microtubo tipo Eppendorf PowerBead, sendo antes removido todo o conteúdo do mesmo (solução + beads) para um microtubo esterilizado, tipo Eppendorf, com capacidade para 2 mL. A amostra foi então centrifugada no microtubo PowerBead vazio e todo o sobrenadante possível foi retirado. A solução + beads reservada foi adicionada ao microtubo PowerBead contendo o respectivo sedimento da amostra. Adicionou-se ao mesmo 60 µL da solução C1 e foi realizada agitação durante 20 segundos. O microtubo foi aquecido a 70°C durante 10 minutos e então acoplado na plataforma agitadora horizontal Vortex-Genie® 2 (MO BIO Laboratories), sendo realizada agitação durante 10 minutos em velocidade máxima.

Após agitação, o microtubo tipo Eppendorf contendo a amostra foi centrifugado durante 30 segundos a 10.000 X G e o sobrenadante transferido para novo microtubo com capacidade para 2 mL, fornecido no kit de extração. Foi adicionado 250 µL da solução C2 ao microtubo e procedeu-se a agitação no vortex durante 5 segundos, sendo este incubado durante 5 minutos a 4°C. Após incubação, o microtubo foi centrifugado durante 1 minuto a 10.000 X G e então foi transferido cuidadosamente cerca de 600 µL do sobrenadante para novo microtubo tipo Eppendorf com capacidade para 2 mL, fornecido no kit.

Adicionou-se 200 µL da solução C3 ao microtubo, o mesmo foi agitado no vortex durante 5 segundos e incubado durante 5 minutos a 4°C. Após a incubação, procedeu-se a centrifugação durante 1 minuto a 10.000 X G. Foi transferido cuidadosamente cerca de 750 µL do sobrenadante obtido para um novo microtubo tipo Eppendorf com capacidade para 2 mL, fornecido no kit. Adicionou-se 1200 µL de solução C4 ao mesmo, com posterior agitação no vortex durante 5 segundos.

A coluna de purificação foi adicionada a um microtubo tipo Eppendorf com capacidade para 2 ml (ambos fornecidos no kit) e 675 µL da amostra foi adicionada ao respectivo filtro, sendo realizada centrifugação durante 1 minuto a 10.000 X G.

O filtrado foi descartado do microtubo tipo Eppendorf, sendo adicionado mais amostra ao filtro. Realizou-se nova centrifugação, sendo repetido esse processo até que todo o conteúdo da amostra ficasse aderido à coluna.

Foi adicionado 500 µL da solução C5 a coluna de purificação e o microtubo foi centrifugado durante 30 segundos a 10.000 X G. Foi descartado o filtrado e o microtubo novamente centrifugado durante 1 minuto a 10.000 X G.

Cuidadosamente, evitando qualquer respingo do filtrado, foi transferido o filtro da coluna para um novo microtubo tipo Eppendorf com capacidade para 2 mL. Adicionou-se então, 100 µL da solução C6 ao centro do filtro da coluna e foi realizada uma centrifugação durante 30 segundos a 10.000 X G. Após centrifugação, a coluna de purificação foi descartada.

O volume final de 100 µL obtido na extração de cada amostra foi dividido em três microtubos tipo Eppendorf com capacidade para 0,6 mL (baixa retenção) e estes armazenados a -80⁰C até utilização na reação de qPCR.

Após finalização da extração, a pureza do DNA extraído foi verificada por espectrofotometria, utilizando o equipamento Biodrop (Denville Scientific Inc). Foi realizada a leitura de absorbância a 260nm e a 280 nm (A260/A280). Uma razão A260/A280 superior a 1,7 indica DNA de elevada pureza, já razões inferiores indicam uma baixa pureza do DNA extraído (NING et al., 2009). O DNA puro deverá apresentar uma razão A260/A280 entre 1,7 e 2,0 (Thermo Scientific, 2010).

4.4 Ensaio de PCR em tempo real (qPCR)

A reação de qPCR utilizando sonda de hidrólise do sistema TaqMan® para quantificação dos oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais utilizada neste estudo encontra-se descrita nos itens abaixo.

4.4.1 Iniciadores e sonda

A sequência alvo selecionada para quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* pela reação de qPCR foi um fragmento de 62 pares de bases do gene B1, repetido em 35 cópias no genoma do protozoário. Os iniciadores e a respectiva sonda utilizados neste estudo (KOMPALIC-CRISTO et al., 2007) estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 – Iniciadores e sonda (qPCR)

Iniciadores e sonda	Sequência	Localização no gene
GENE_B1_TG-TX2-F	5'CTAGTATCGTGCGGCAATGTG 3'	531-551
GENE_B1_TG-TX2-R	5'GGCAGCGTCTCTTCCTCTTTT 3'	571-592
GENE_B1_TG-TX2M1	5'(6-FAM)-CCACCTCGCCTCTTGG-(QNQ-MGB) 3'	552-567

Fonte: KOMPALIC-CRISTO et al., 2007

4.4.2 Curva Padrão

Para a escolha de um fragmento gênico que pudesse ser utilizado como curva padrão nos experimentos de reação de qPCR para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* foi realizado um alinhamento do tipo Blast n (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) da sequência do produto de PCR de 62 pb gerado pelos iniciadores GENE_B1_TG-TX2-F e GENE_B1_TG-TX2-R (KOMPALIC-CRISTO et al., 2007).

Após análise do alinhamento, dentre os hits que retornaram com 100% de identidade com a sequência do produto da PCR, foi escolhida uma sequência de 466 pb (Quadro 3), a qual foi comercialmente sintetizada pela Integrated DNA Technologies (IDT, Iowa, EUA) sob a forma de gBlocks Gene Fragments® e denominada B1 Partial.

Quadro 3 – Especificação técnica da sequência sintética de 466 pb utilizado na curva padrão de qPCR para quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais

Tamanho (pb)	Número de acesso no GenBank
466	DQ789361.1

Para a geração do alinhamento do fragmento gênico escolhido para a construção da curva padrão de DNA com o produto de PCR gerado pelos iniciadores utilizados neste estudo foi utilizado o programa BioEdit (HALL, 1999). O respectivo alinhamento está apresentado na Figura 14.

Figura 14 – Alinhamento do fragmento gênico selecionado para utilização como curva padrão de DNA com o produto de PCR gerado pelos iniciadores utilizados nesse estudo

```

gi|110671371|gb|DQ789361.1| 1 CGCCTCCTTCGTCCGTCGTAATATCAGGCCCTCTGTTCTGTTCCGTGTCT 50
GENE_B1 partial sequence 1 ----- 1

gi|110671371|gb|DQ789361.1| 51 GTCTAGGGCACCCCTTACTGCAAGAGAAGTATTTGAGGTCATATCGTCCCA 100
GENE_B1 partial sequence 1 ----- 1

gi|110671371|gb|DQ789361.1| 101 TGAAGTCGACCACCTGTTTCCTCTCTTCACTGTCACGTACGACATCGCAT 150
GENE_B1 partial sequence 1 ----- 1

gi|110671371|gb|DQ789361.1| 151 TCAAGGGAAGAGATCCAGCAGATCTCGTTCGTGATTCCGAGACAAGAGAG 200
GENE_B1 partial sequence 1 ----- 1

gi|110671371|gb|DQ789361.1| 201 GTCCGCCCCACCAAGACGGCTGAAGAATGCAACATTCTTGTGCTGCCTCC 250
GENE_B1 partial sequence 1 ----- 1

gi|110671371|gb|DQ789361.1| 251 TCTCATGGCAAATGCCAGAAGAAGGGTACGTGTTGCATCATAACAAGAGC 300
GENE_B1 partial sequence 1 ----- 1

gi|110671371|gb|DQ789361.1| 301 TGTATTTCCCGCTGGCAAATACAGGTGAAATGTACCTCCAGAAAAGCCAC 350
GENE_B1 partial sequence 1 ----- 1
      GENE_B1_TG-TX2F
gi|110671371|gb|DQ789361.1| 351 CTAGTATCGTGC GGCAATGTGCCACCTCGCCTCTTGGGAGAAAAAGAGGA 400
GENE_B1 partial sequence 1 CTAGTATCGTGC GGCAATGTGCCACCTCGCCTCTTGGGAGAAAAAGAGGA 50

gi|110671371|gb|DQ789361.1| 401 AGAGACGCTGCCGCTGTTTTGCAAATGAAAAGGATTCAATTTTCGCAGTAC 450
GENE_B1 partial sequence 51 AGAGACGCTGCC ----- 62
      GENE_B1_TG-TX2R
gi|110671371|gb|DQ789361.1| 451 ACCAGGAGTTGGATTT 466
GENE_B1 partial sequence 62 ----- 62

```

A sequência de 466 pb sintética foi disponibilizada liofilizada e quantificada (200 ng), sendo ressuspensa em 100 µL de tampão TE, alcançando uma concentração de 2 ng de DNA/µL, conforme as recomendações do fabricante.

O número de moléculas de DNA por microlitro do fragmento sintético de 466 pb na forma liofilizada foi calculado de acordo com o cálculo do número de Avogadro e o valor obtido foi multiplicado pelo volume total de 5 µL de DNA utilizado na reação de qPCR, conforme descrito na Equação 1.

Equação 1:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de moléculas} = \frac{\text{Xg}/\mu\text{L DNA} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{tamanho do clone em pb} \times 660 \text{ g/mol}}$$

↙
ou gBlock

Onde:

660 g/mol = peso molecular médio de 1pb de DNA

$6,022 \times 10^{23}$ = número de moléculas em 1 mol (n^o de Avogrado)

Diluições seriadas na ordem de 10 vezes do fragmento sintético de 466 pb foram utilizadas para gerar a curva padrão de concentrações expressas em unidades logarítmicas (\log_{10}) versus os valores obtidos em ciclos de amplificação (*cycle threshold* - Ct values). As unidades utilizadas para curva padrão com as concentrações avaliadas foram os valores de $1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^1$ cópias.

Após amplificação, os resultados positivos para *Toxoplasma gondii* obtidos nas amostras de águas superficiais foram convertidos em número de oocistos, considerando o número de cópias já determinado do gene B1 por genoma do protozoário. Para cada oocisto de *Toxoplasma gondii* considerou-se 280 cópias do gene B1, considerando que foram empregados oocistos esporulados e que cada oocisto apresenta 8 esporozoítos (DUBEY et al., 1970; Dubey et al., 1998), com 35 cópias gênicas por genoma (Burg et al., 1989).

A curva padrão foi avaliada mediante a porcentagem de eficiência da reação obtida pela equação da reta: $Y = aX + b$.

Onde:

$Y = \text{Cts}$ (ciclos no qual a fluorescência gerada dentro da reação cruza o limiar);

$a = \text{slope}$ (inclinação da reta);

$b = \text{intersecção do eixo Y}$, observados em gráfico de regressão linear

A partir da equação da reta aplicada no cálculo da curva padrão foi possível estimar a quantidade de DNA de *Toxoplasma gondii* extraído dos concentrados de águas superficiais. Ao aplicar-se o valor de Ct de cada amostra, encontra-se o valor de X, que é o logaritmo da quantidade (ng) de DNA.

4.4.3 Condições de amplificação da qPCR

Para amplificação do fragmento-alvo foram utilizadas reações com volume final contendo 25 µL, sendo: 9,5 µL de água ultrapura MilliQ®, 5,0 µL de TaqMan®Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystem®), 3,5 µL de solução iniciadores/sonda (Applied Biosystem®) (0,9 µM de cada iniciador e 0,25 µM de sonda TaqMan-MGB), 2,0 µL de MgCl₂ (5mM) e 5,0 µL de DNA extraído da amostra. As amostras foram amplificadas em duplicata e as condições de amplificação do fragmento pela qPCR estão descritas no Quadro 4.

Quadro 4 - Condições de amplificação do DNA de *Toxoplasma gondii* pela qPCR

Parâmetros de Ciclagem		Tempo
Pré PCR		50°C por 2 minutos
Desnaturação inicial para ativação da enzima AmpliTaqGold®		95°C por 10 minutos
40 ciclos	Desnaturação	95°C por 15 segundos
	Anelamento e extensão	60°C por 1 minuto

Fonte: KOMPALIC-CRISTO et al., 2007

Os dados de amplificação foram obtidos por meio do equipamento StepOnePlus™ - Real Time PCR System (Applied Biosystem®) do Laboratório de Biologia Molecular da Divisão de Microbiologia e Parasitologia da CETESB. Todas as reações de qPCR incluíram controles positivos (oocistos de *Toxoplasma gondii*) e controles negativos (*Non Template Controls* - NTC) com adição de água livre de DNases e RNases para o controle das reações. As amostras e os controles positivos e negativos foram testados em duplicata em cada reação, sendo realizado o mesmo procedimento para avaliar a eficiência da curva padrão.

Os oocistos de *Toxoplasma gondii* genótipo BrIII utilizados neste estudo foram cedidos pelo Laboratório do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os cistos de *Giardia* spp. e

oocistos de *Cryptosporidium* spp. utilizados nos testes de especificidade da reação de qPCR são provenientes do controle positivo do kit de coloração de imufluorescência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (Waterborne Inc, New Orleans, LA).

A capacidade de detecção dos iniciadores em diferentes concentrações de DNA (sensibilidade) foi avaliada por meio da diluição seriada de $1,0 \times 10^7$ cópias/ μL a 1 cópia/ μL do fragmento sintético contendo 466 pb utilizado para a construção da curva padrão. A especificidade dos iniciadores e da sonda em amplificar apenas DNA de *Toxoplasma gondii* foi realizada utilizando DNA de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp..

A reprodutibilidade da curva padrão foi realizada pelo cálculo da média dos valores de Cts, dos Desvios Padrão dos seis pontos exponenciais pré-determinados e análise do coeficiente de variação obtidos em 3 curvas realizadas em dias alternados.

Após os resultados obtidos na reação de qPCR para as amostras de águas superficiais, os valores de cópias por microlitros foram convertidos em oocistos por litro por meio das Equações 2, 3 e 4.

- Equação 2

$$\text{N}^\circ \text{ de cópias DNA total} = \frac{\text{N}^\circ \text{ cópias DNA na qPCR} \times \text{Volume total extração}}{\text{Volume amostra extraído usado na qPCR}}$$

- Equação 3

$$\text{N}^\circ \text{ de cópias DNA/L} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de cópias DNA total}}{\text{Volume amostra analisada}}$$

- Equação 4

$$\text{N}^\circ \text{ oocistos de } \textit{Toxoplasma gondii} \text{ estimados/L} = \frac{\text{N}^\circ \text{ cópias DNA/L}}{280 \text{ cópias}}$$

4.5 Avaliação do desempenho do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais

As avaliações de recuperação inicial e de recuperação em amostras de campo do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais foram realizadas por meio de semeadura experimental com quantidades conhecidas de oocistos do

respectivo protozoário. Foram determinadas a recuperação inicial e a interferência que as características físico-químicas e microbiológicas da matriz ocasionaram na eficiência de recuperação do método avaliado neste estudo.

As concentrações de oocistos de *Toxoplasma gondii* das suspensões utilizadas na avaliação de desempenho do método foram quantificadas por meio de contagens realizadas por microscopia óptica comum, sendo realizadas 3 contagens microscópicas, avaliadas por dois técnicos.

4.5.1 Recuperação inicial

A avaliação da recuperação inicial do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais foi realizada por meio de análise de 4 amostras de água de osmose reversa, provenientes do Laboratório da Divisão de Microbiologia e Parasitologia da CETESB, contaminadas com oocistos de *Toxoplasma gondii* ($6,68 \times 10^4$ oocistos inoculados em 20 litros de amostra de água de osmose reversa).

4.5.2 Recuperação em matrizes

A avaliação da recuperação em matrizes do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* foi realizada em águas superficiais provenientes dos 10 pontos de coleta selecionados neste estudo. Nessa etapa as amostras foram processadas em duas alíquotas de 20L: uma contaminada com a suspensão de oocistos de *Toxoplasma gondii* contendo $6,68 \times 10^4$ oocistos (semeadura experimental) e outra sem a respectiva contaminação (branco), para avaliar o efeito da matriz da água superficial analisada na recuperação do método.

A porcentagem de recuperação do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais foi calculada conforme a equação 5.

- Equação 5
$$\% \text{ Recuperação} = \frac{(C1 - C2)}{C3} \times 100$$

Onde:

C1 = N^o de cópias DNA (qPCR) de *Toxoplasma gondii* na amostra contaminada (semeadura experimental)

C2 = N^o de cópias DNA (qPCR) de *Toxoplasma gondii* na amostra não contaminada (branco)

C3 = N^o de cópias DNA (qPCR) de *Toxoplasma gondii* na suspensão adicionada a amostra contaminada ($6,68 \times 10^4$)

4.6 Avaliação de possíveis interferentes presentes nas amostras de águas superficiais na reação de qPCR

Para avaliação de possíveis resultados falso-negativos decorrentes da presença de inibidores nas amostras de águas superficiais analisadas, foram realizadas diluições seriadas dos DNAs extraídos das amostras de águas superficiais contaminadas artificialmente (semeadura experimental) na ordem de 10 vezes (DNA puro, 1:10 e 1:100) e estes foram submetidos a qPCR nas mesmas condições de amplificação acima citadas.

4.7 Análises estatísticas

Nesse estudo foi realizada a estatística descritiva com a representação dos dados em gráficos, tabelas e quadros. Para análise dos dados quantitativos foram empregados os cálculos de Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação por meio de planilhas eletrônicas no Microsoft Excell®.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de validação da qPCR

5.1.1 Análise de sensibilidade dos iniciadores e sonda

Os iniciadores e sonda (KOMPALIC-CRISTO et al., 2007) utilizados nesse estudo para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais foram submetidos a testes de amplificação utilizando o fragmento sintético de 466 pb (B1 Partial) em diluição seriada na razão 1:10 com concentração inicial de $1,0 \times 10^7$ a 1 cópia/ μL . Após o ensaio de qPCR, as reações de amplificação com os melhores resultados nos ensaios de validação com respectivos iniciadores e sonda foram entre os logaritmos de $1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^1$ cópias/ μL . Após a avaliação dos testes de amplificação, a curva de regressão linear apresentou os seguintes resultados de precisão analítica: Eficiência = 95%, $R^2 = 0,998$ e *Slope* = -3,42.

O resultado da amplificação com a média dos valores dos Cts de acordo com o número de cópias para reação com 5 μL de DNA utilizados na validação do ensaio estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores com as médias de Cts por número de cópias obtidas na reação de qPCR no ensaio de validação

Nº cópias de DNA/5 μL	Médias Cts
$5,0 \times 10^6$	16,83
$5,0 \times 10^5$	20,28
$5,0 \times 10^4$	23,89
$5,0 \times 10^3$	27,27
$5,0 \times 10^2$	31,21
$5,0 \times 10^1$	34,36

Nas Figuras 15 e 16 podem ser observadas a representação da curva padrão de amplificação em escala logarítmica e a análise de regressão linear com os resultados obtidos a partir da curva padrão utilizando seis logaritmos ($5,0 \times 10^6$ a 5×10^1 cópias/5 μL).

Figura 15 – Representação das curvas de amplificação da curva padrão. O eixo X está representado pela quantidade de ciclos na reação e o eixo Y pelos valores de magnitude do sinal gerado (ΔRn) nas condições da qPCR

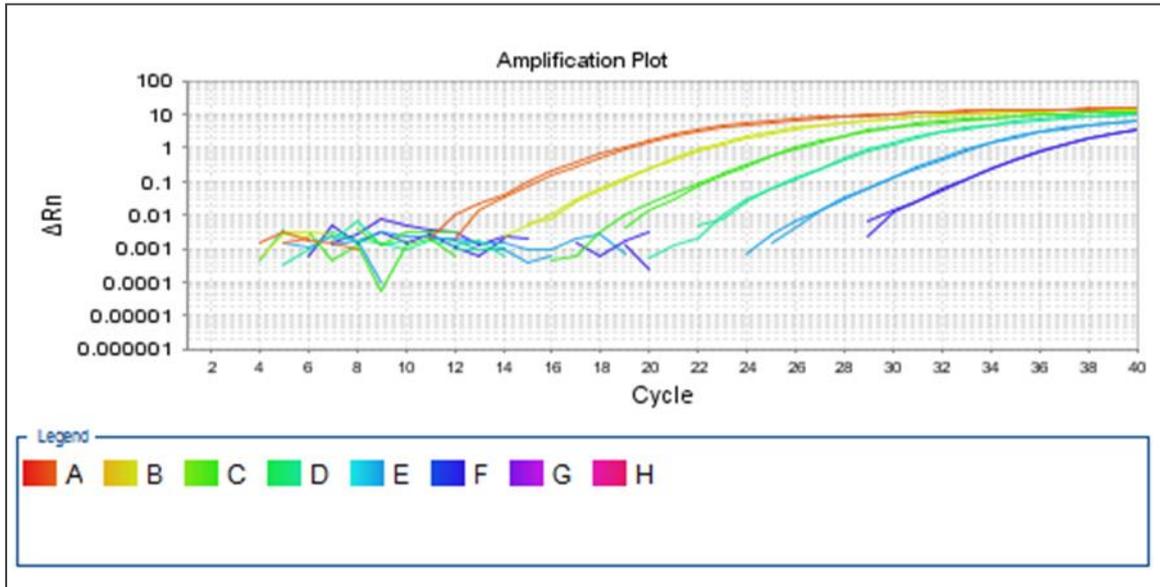
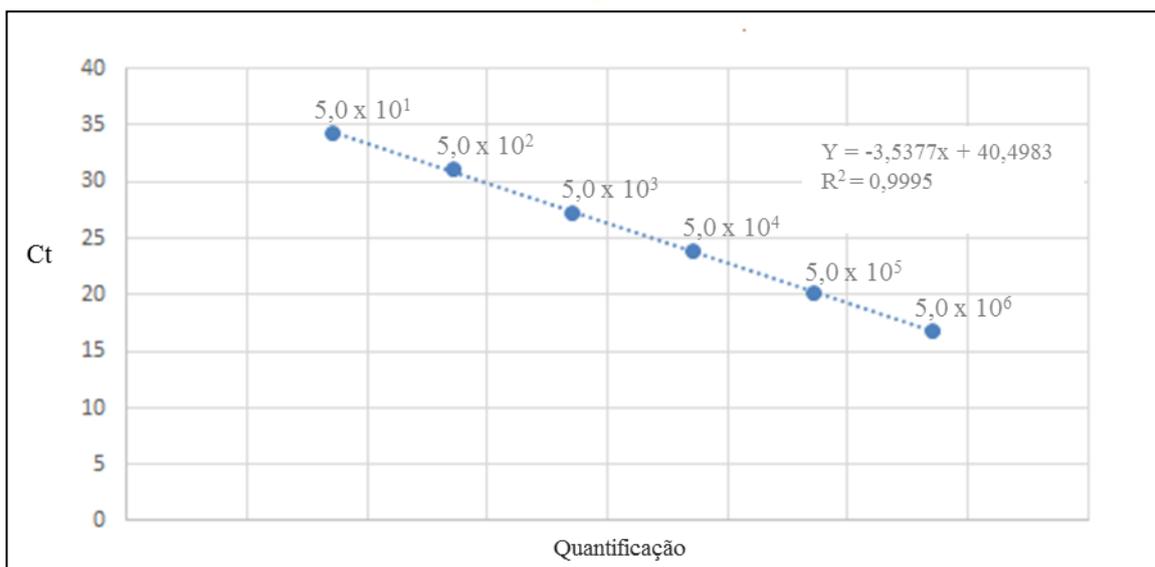


Figura 16 – Curva padrão (B1 Partial) representando a curva de regressão linear utilizada na reação de qPCR. No eixo X são apresentados os 6 pontos da curva ($5,0 \times 10^6$ a 5×10^1 cópias/ $5\mu\text{L}$) e no eixo Y os valores de Ct



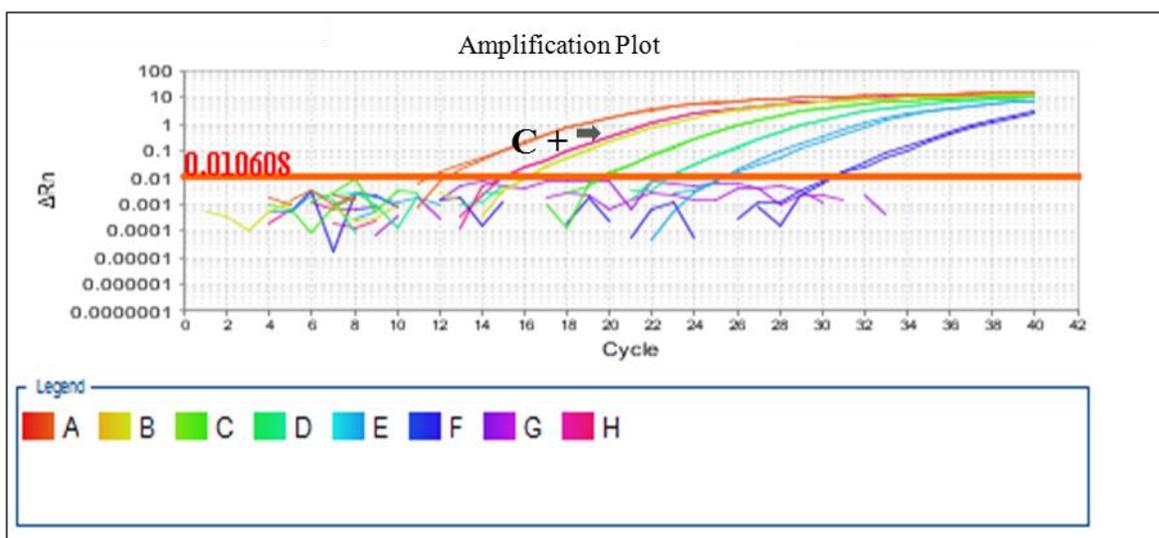
5.1.2 Análise de especificidade dos iniciadores e sonda

A especificidade dos iniciadores e da sonda foi avaliada utilizando DNA extraído da suspensão contendo oocistos de *Toxoplasma gondii* e também DNA extraído da suspensão contendo cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp..

A reação de qPCR revelou resultados de amplificação positivo apenas para as amostras contendo DNA de *Toxoplasma gondii*, atestando a especificidade da sonda. O DNA de *Toxoplasma gondii* foi posteriormente utilizado como controle positivo interno nas reações de qPCR.

Na Figura 17 pode ser observada a representação das curvas de amplificação do controle positivo (DNA de *Toxoplasma gondii*) e de DNA extraído da suspensão contendo cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.. O eixo X está representado pela quantidade de ciclos na reação e o eixo Y pelos valores de magnitude do sinal gerado (ΔRn) nas condições da qPCR.

Figura 17 – Representação das curvas de amplificação do controle positivo (DNA extraído da suspensão contendo oocistos de *Toxoplasma gondii*) e de DNA extraído da suspensão contendo cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.. De acordo com a legenda as amostras referentes às linhas A, B, C, D, E e F estão relacionadas com a curva padrão, a linha H com resultado positivo de amplificação referente ao DNA de *Toxoplasma gondii* e linha G com resultado negativo de amplificação referente ao DNA de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.



5.1.3 Avaliação da reprodutibilidade da curva padrão

Os ensaios de reprodutibilidade foram realizados por comparação das curvas padrões amplificadas em dias alternados para validação. Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação foram calculados para cada ensaio para a validação da curva intra-ensaios (FONTAINE e GUILLOT, 2003; PFAFFL, 2004). Com base nos valores das médias dos Cts e do desvio padrão produzidos a cada ponto, o coeficiente de variação foi calculado para os pontos de $5,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^1$ cópias/5 μ L. Os valores obtidos estão representados exponencialmente por número de cópias em cada curva e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Avaliação da reprodutibilidade da curva padrão utilizada nas amostras de águas superficiais para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* pela qPCR, apresentando os valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação

Nº cópias	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média Cts	Desvio Padrão	Cv
5×10^6	16,74	16,83	15,86	16,48	0,5359	3,25
5×10^5	20,20	20,28	19,16	19,88	0,6274	3,15
5×10^4	23,65	23,89	23,11	23,55	0,3995	1,70
5×10^3	27,36	27,27	26,06	26,89	0,7228	2,68
5×10^2	31,42	31,21	30,79	31,14	0,3208	1,03
5×10^1	34,36	34,36	34,16	34,28	0,1386	0,40

A curva padrão construída manteve-se linear e os resultados foram avaliados por meio de amplificação em duplicata a cada ponto com seis logaritmos de concentração de DNA padrão (fragmento sintético de 466 pb - B1 Partial). A metodologia utilizada foi capaz de quantificar o mínimo de $5,0 \times 10^1$ cópias/5 μ L correspondente a 50 cópias do gene B1 de *Toxoplasma gondii* determinado nos experimentos do qPCR por meio das curvas de quantificação.

5.2 Avaliação da pureza do DNA extraído das amostras de águas superficiais

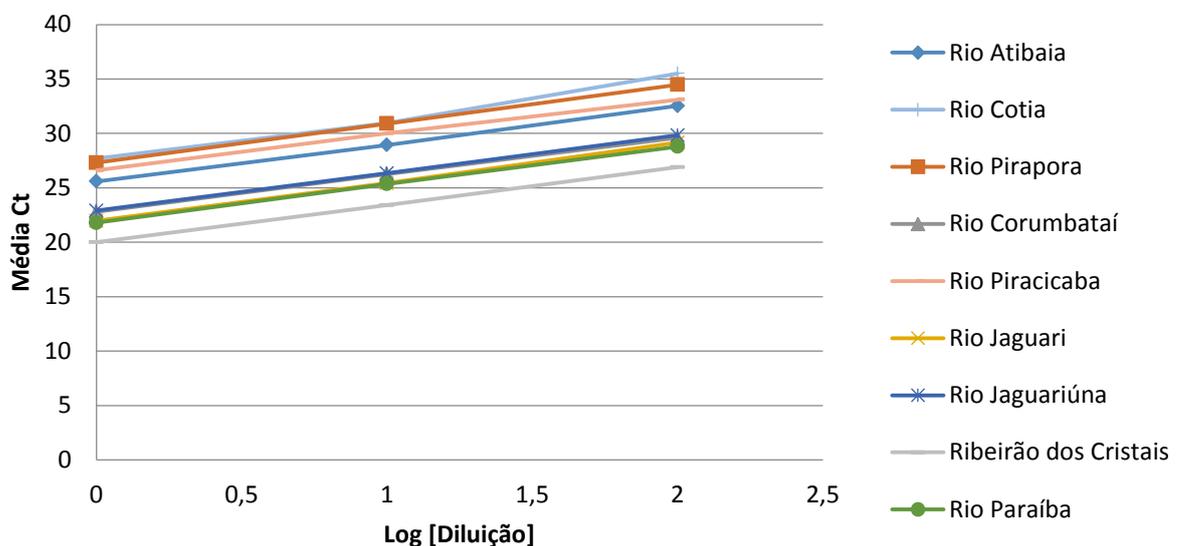
A pureza do DNA extraído das amostras das águas superficiais analisadas nesse estudo para quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* por meio da reação de qPCR foi verificada por espectrofotometria, utilizando o equipamento Biodrop (Denville Scientific Inc), sendo

realizada a leitura de absorvância a 260nm e a 280 nm (A260/A280). O DNA obtido das respectivas amostras apresentaram elevado grau de pureza.

5.3 Avaliação de possíveis interferentes das amostras de águas superficiais na reação de qPCR

Para avaliação de possíveis resultados falso-negativos decorrentes da presença de inibidores nas amostras de águas superficiais analisadas, foram realizadas diluições seriadas dos DNAs extraídos das amostras de águas superficiais contaminadas artificialmente (semeadura experimental) na ordem de 10 vezes (DNA puro, 1:10 e 1:100) e estes foram submetidos às reações de qPCR, nas mesmas condições anteriormente citadas. Não foi observada nenhuma alteração significativa durante a amplificação dos mesmos para caracterizar possíveis inibidores da reação de qPCR. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 18.

Figura 18 – Resultados da reação de qPCR das diluições seriadas dos DNAs extraídos das amostras de águas superficiais contaminadas artificialmente (semeadura experimental) na ordem de 10 vezes (DNA puro, 1:10 e 1:100)



5.4 Avaliação do desempenho do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais: recuperação inicial e recuperação em matrizes

Inicialmente foram realizadas análises de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em quatro amostras inertes (água de osmose reversa) contendo quantidade conhecida de oocistos do protozoário ($6,68 \times 10^4$), determinando à chamada recuperação inicial do método.

A etapa seguinte foi à demonstração do desempenho em amostras de águas superficiais (recuperação em matrizes), sendo realizada em 9 dos 10 pontos de coleta selecionados nesse estudo (uma amostra foi cancelada devido a problemas ocorridos durante a análise). As amostras foram processadas em duas alíquotas de 20L: uma contaminada com a suspensão de oocistos de *Toxoplasma gondii* (semeadura experimental) contendo quantidade conhecida de oocistos do protozoário ($6,68 \times 10^4$) e a outra sem a respectiva contaminação (branco).

Os resultados obtidos nas análises de avaliação da recuperação inicial, da recuperação em matrizes e o número de cópias de DNA obtido na reação de qPCR da suspensão de oocistos de *Toxoplasma gondii* utilizada para a contaminação das amostras nos testes de avaliação do desempenho do método podem ser observados nas Figuras 19 e 20.

Figura 19 – Resultados obtidos nas análises de avaliação da recuperação inicial do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* (Nº de cópias de DNA de *Toxoplasma gondii* e % de recuperação)

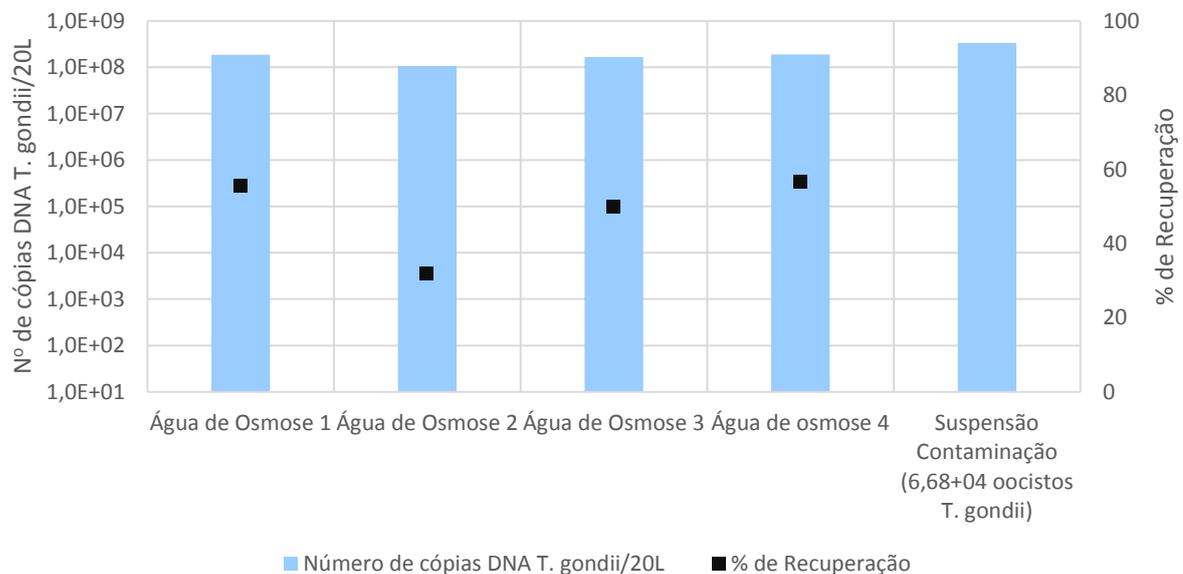
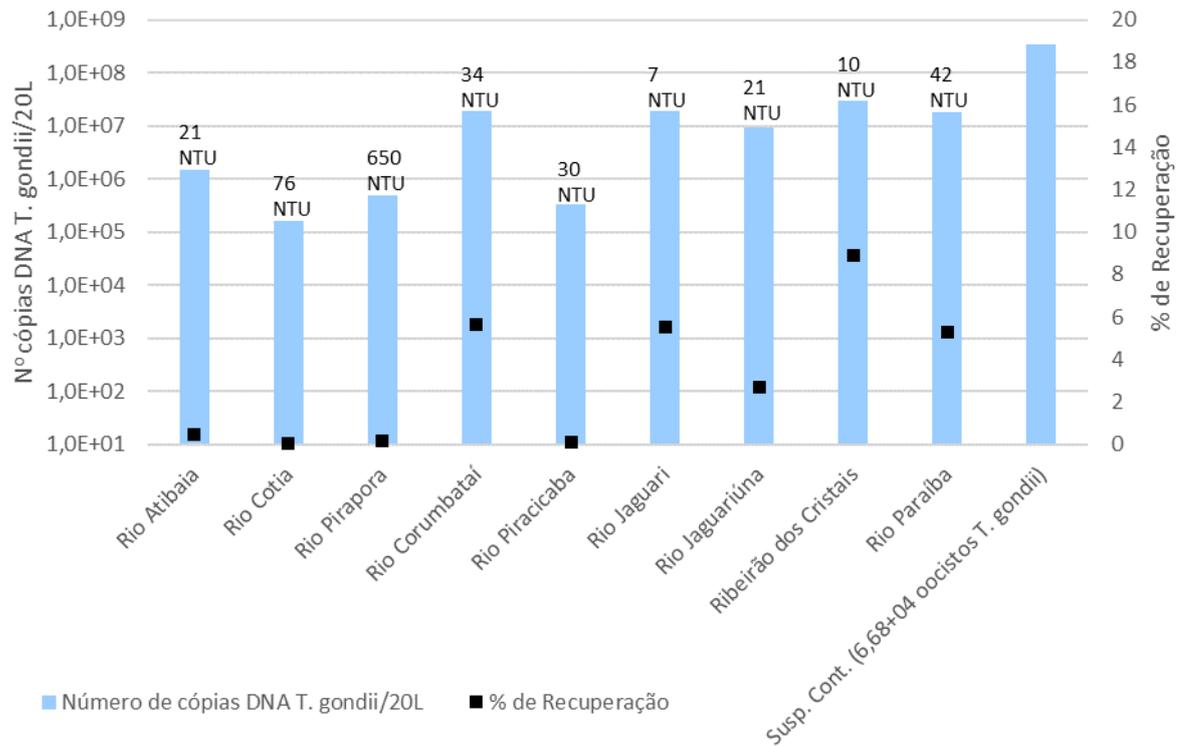


Figura 20 – Resultados obtidos nas análises de avaliação da recuperação em matrizes do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* (Nº de cópias de DNA de *Toxoplasma gondii* e % de recuperação) e turbidez das respectivas amostras de águas superficiais (NTU)



5.5 Resultados das análises de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais amplificadas pela reação de qPCR

Das 40 amostras de águas superficiais coletadas nesse estudo, uma foi cancelada devido a problemas ocorridos durante a análise. Do total de 39 amostras de águas superficiais analisadas, 7,7% (n = 3) foram positivas para *Toxoplasma gondii*. Considerando os 10 mananciais estudados, detectou-se a ocorrência de *Toxoplasma gondii* em 30% (n = 3), nos meses de novembro e dezembro (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados de detecção de *Toxoplasma gondii* pela qPCR em amostras de águas superficiais avaliadas nesse estudo

Corpo Hídrico	Meses de coleta							
	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Rio Atibaia – Valinhos	I	-	I	-	I	-	C	-
Rio Atibaia – Campinas	I	-	I	-	I	-	I	-
Rio Jaguari – Pedreira	I	-	I	-	I	-	D	-
Rio Jaguari – Jaguariúna	I	-	I	-	I	-	I	-
Rio Corumbataí – Piracicaba	I	-	I	-	I	-	D	-
Rio Piracicaba – Piracicaba	I	-	I	-	I	-	I	-
Rio Pirapora - Salto de Pirapora	I	-	I	-	I	-	I	-
Rio Paraíba – Aparecida	-	I	-	I	-	I	-	D
Rio Cotia – Cotia	I	-	I	-	I	-	I	-
Ribeirão dos Cristais – Cajamar	I	-	I	-	I	-	I	-

I = Ct indetectável (qPCR) D = Ct detectável(qPCR) - = sem coleta C = Amostra cancelada

Dentre os mananciais avaliados, o mais crítico foi o Rio Jaguari, no município de Pedreira, com densidade de 63,93 oocistos de *Toxoplasma gondii*/L de amostra. O Rio Corumbataí, no município de Piracicaba e o Rio Paraíba, no município de Aparecida apresentaram densidades de 1, 12 e 0,45 oocistos de *Toxoplasma gondii*/L, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados das amostras de águas superficiais positivas para *Toxoplasma gondii* pela qPCR e número de ciclos necessários para atingir o *threshold* durante a amplificação

Corpo Hídrico (Município)	Cts	Nº cópias/L	Nº oocistos/L
Rio Jaguari (Pedreira)	25,35	$1,79 \times 10^4$	63,93
Rio Corumbataí (Piracicaba)	32,40	$3,15 \times 10^2$	1,12
Rio Paraíba (Aparecida)	32,71	$1,28 \times 10^2$	0,46

6 DISCUSSÃO

A contaminação de águas superficiais destinadas ao abastecimento público por patógenos representa risco à saúde humana. A crescente demanda e uso inadequado de recursos hídricos, falta de planejamento nos centros urbanos e também o lançamento de esgoto industrial e doméstico em corpos hídricos contribuem para o panorama de degradação dos mananciais (SOUZA et al., 2010; LEONETI et al., 2011).

A água tem sido considerada um importante veículo para a disseminação de surtos de toxoplasmose em vários países. É considerada uma séria ameaça à saúde humana, devido ao grande número de indivíduos que podem ser infectados por meio de uma única fonte de contaminação. No entanto, observa-se uma ausência de dados sobre a prevalência de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas brutas e tratadas (KARANIS et al., 2013).

É importante ressaltar que os oocistos de *Toxoplasma gondii* podem persistir no ambiente durante um longo período de tempo (DUBEY, 1998) e são altamente resistentes aos vários processos químicos de inativação, inclusive aos processos convencionais de desinfecção utilizados pelos sistemas produtores de água (DUBEY et al. 1970; 1998).

Um estudo de revisão global de surtos de toxoplasmose humana e suas respectivas fontes de infecção foi realizado por MEIRELES et al. (2015), sendo constatado que a água contaminada com oocistos foi a fonte responsável pela infecção em 21% dos surtos avaliados. Este estudo evidencia a necessidade de maior ênfase em medidas de controle da qualidade de águas tratadas e brutas.

O aumento da conscientização sobre o risco de surtos de toxoplasmose veiculados pela água vêm desafiando pesquisadores a desenvolverem métodos para a detecção e quantificação desse protozoário, objetivando detectar o mesmo de forma eficiente e rápida nestas amostras (ISAAC-RENTON et al., 1998, DUMÈTRE e DARDÉ, 2003; KOURENTI e KARANIS, 2004; SOTIRIADOU e KARANIS, 2008; YANG et al., 2009; KARANIS et al., 2013; LORA-SUAREZ et al, 2016; TRIVIÑO-VALENCIA et al., 2016). Entretanto, a maioria dos métodos desenvolvidos para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas demonstraram uma grande variabilidade nos resultados obtidos em relação a recuperação.

Não existe nenhum método universalmente padronizado para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais, visto que os mesmos apresentam várias limitações (JONES e DUBEY, 2010). Alguns fatores podem ser limitantes para o sucesso no desenvolvimento de métodos sensíveis para a recuperação do protozoário nestas amostras, dentre eles podemos citar a baixa densidade de oocistos de *Toxoplasma gondii* presentes em matrizes ambientais e conseqüentemente a necessidade de se concentrar grandes volumes de águas. A presença de inibidores da reação de PCR nessas amostras também dificulta a detecção do protozoário (KARANIS et al., 2013).

A necessidade de desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis, de fácil utilização e interpretação para detecção específica de oocistos de *Toxoplasma gondii* envolvendo matrizes complexas tais como águas superficiais é essencial para o controle de surtos e também para o estudo epidemiológico da toxoplasmose.

Diante desse contexto, a proposta desse estudo foi implantar um método para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais, baseado em técnicas moleculares (qPCR) e desta maneira, realizar a caracterização de mananciais no Estado de São Paulo em relação a possível contaminação por este protozoário.

Nesse estudo foi utilizada a técnica de concentração de grandes volumes de amostras de águas superficiais por meio de filtração utilizando cápsulas Envirocheck® HV (YANG et al., 2009). O sedimento obtido após a centrifugação foi submetido à extração de DNA, sendo utilizado o kit de extração PowerSoil DNA isolation®. A sequência alvo selecionada para a reação de qPCR (fragmento de 62 pares de bases do gene B1) e o conjunto de iniciadores e sonda utilizados foram os mesmos propostos por KOMPALIC-CRISTO et al. (2007).

A concentração da amostra é uma das etapas críticas dos métodos de detecção e quantificação de protozoários em amostras de águas, pois podem ocorrer perdas dos organismos alvos quando grandes volumes de água são concentrados (KERAMBRUN et al., 2016), sendo que os mesmos podem ficar retidos nos filtros devido à aderência a partículas maiores presentes nas amostras, dificultando a sua remoção durante a etapa de eluição do filtro. No entanto, a técnica de concentração por meio da filtração de grandes volumes tem se mostrado mais eficiente para a recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas em

relação às técnicas de concentração por meio de floculação e centrifugação (YANG et al., 2009), pois nessa técnica há um tratamento da cápsula com solução de hexametáfosfato de sódio para diminuir o impacto da turbidez na recuperação de organismos alvos. É padronizada e universalmente utilizada para a detecção e quantificação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em vários tipos de matrizes de águas, apresentando uma porcentagem de recuperação satisfatória para esses protozoários (USEPA, 2012), sendo utilizada nesse estudo para concentração das amostras. Alguns pesquisadores vêm utilizando essa cápsula filtrante associada a técnicas moleculares para detectar e quantificar oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas (VILLENA et al., 2004; YANG et al., 2009; AUBERT e VILLENA, 2009).

A extração de DNA também é considerada uma etapa crítica nos métodos de detecção e quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais ou outras amostras ambientais devido a presença de inibidores da reação de PCR esperadas nestas amostras. A redução ou eliminação de inibidores da reação de PCR é um passo importante na detecção molecular de patógenos em águas ou outras amostras ambientais (WILSON, 1997).

Há que se considerar também as características do protozoário, pois a extração de DNA dos oocistos de *Toxoplasma gondii* esporulados exige rompimento efetivo das paredes dos oocistos e dos esporocistos e das membranas dos esporozoítos, para acesso ao material genético (HOHWEYER et al., 2016). Considerando que a composição de cada camada das paredes dos oocistos e esporocistos do *Toxoplasma gondii* são diferentes (BUSHKIM et al., 2013; DUMETRE et al., 2013; SAMUELSON et al., 2013), lise e outros tratamentos devem ser adaptados para melhorar as possíveis perdas ocorridas durante o processo de extração de DNA em amostras ambientais.

O método fenol-clorofórmio, assim como o QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) são utilizados na extração de oocistos de *Toxoplasma gondii* após uma etapa de purificação dos concentrados obtidos de amostras de águas (KOURENTI e KARANIS, 2004; 2006; VILLENA et al., 2004; DUMETRE e DARDÉ, 2007). Entretanto, quando os oocistos de *Toxoplasma gondii* são recuperados diretamente desses concentrados sem passar por um processo de purificação, nenhuma destas duas técnicas de extração de DNA são eficazes na remoção dos inibidores da reação de PCR (JIANG et al., 2005).

Vale ressaltar que a aplicação de uma etapa de purificação por gradiente de separação em concentrados de amostras de águas com alta turbidez tem sido também questionada, devido a

possibilidade de perdas e redução na recuperação de oocistos de protozoários (LECHEVALLIER et al., 1995), evidenciando que quanto menor o número de etapas na análise, menor será a probabilidade de perdas (NIEMINSKI et al., 1995).

O kit PowerSoil[®] DNA foi o utilizado para a extração de DNA dos concentrados de amostras de águas superficiais analisadas neste estudo. Este kit pode ser utilizado para isolar DNA de amostras de solos ou outras amostras ambientais e também amostras fecais. Utiliza um procedimento patenteado de retirada de substâncias húmicas e pigmentos, eliminando inibidores de PCR mesmo das amostras mais complexas. O DNA extraído apresenta alta qualidade de pureza, permitindo maior êxito na reação de qPCR. Pode ser utilizado para uma grande variedade de micro-organismos, sendo que a lise celular ocorre por processos mecânicos e químicos.

Na literatura encontramos pesquisadores utilizando este kit para extração e caracterização molecular de parasitas e vírus em amostra de águas marinhas (BONILLA et al., 2015), de parasitas intestinais em amostras fecais (LLEWELLYN et al., 2016), de *Giardia intestinalis* em vertebrados marinhos, entre outros. MAHMOUDI et al. (2011) compararam a eficácia de 4 kits para a extração de DNA de bactérias e eucariotos em solos contaminados (FastDNA[®] SPIN Soil, UltraClean[™] Soil DNA, PowerMax[®] Soil DNA e PowerSoilDNA[®]), sendo que o PowerSoil[®] DNA foi o que apresentou melhor qualidade em relação ao DNA extraído.

A reação quantitativa de PCR em tempo real apresenta melhor sensibilidade analítica e desempenho quando comparada com a PCR convencional, sendo alternativa promissora na detecção e quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais. A sonda TaqMan[®] MGB utilizada como sistema de detecção apresenta alta especificidade e sensibilidade pela reação de qPCR (APPLIED BIOSYSTEMS, 2014).

A maior parte das reações de qPCR em tempo real foram desenvolvidas para a detecção e quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras clínicas (SWITAJ et al., 2005), possivelmente devido a altas concentrações de inibidores de PCR e baixa densidade de oocistos de *Toxoplasma gondii* esperadas em amostras ambientais (VILLENNA et al., 2004).

Diversos pares de iniciadores utilizados na reação de qPCR para a detecção de *Toxoplasma gondii*, tendo como alvo o gene B1 ou a sequência de 529 pb, encontram-se descritos na literatura. Estes estudos utilizaram as técnicas de qPCR com SYBR[®] GREEN ou com sondas de hidrólise em sistema TaqMan[®] ou ainda Fluorecent Ressonance Energy Transfer (FRET)

(REISCHL et al., 2003; CALDERARO et al., 2006). Existem divergências entre qual a melhor sequência alvo para o diagnóstico da toxoplasmose. Alguns autores preferem utilizar marcadores provenientes do gene B1, pois além deste ser repetido 35 vezes no genoma do protozoário (BURG et al., 1989), tem se mostrado bastante sensível e conservado dentre as diferentes cepas de *Toxoplasma gondii* (CONTINI et al., 2005). No entanto, com a descrição da sequência de 529 pares de bases (HOMAN et al., 2000), repetida de 200 a 300 vezes no genoma do respectivo protozoário, surgiram vários estudos com o intuito de comparar marcadores provenientes desta nova sequência com o gene B1.

A sequência de 529 pb vem sendo descrita como muito mais sensível do que a sequência do gene B1 para a detecção molecular de *Toxoplasma gondii* (BELAZ et al., 2015). EDVINSON et al. (2006) sugerem que estudos devem ser realizados para verificar se a sequência de 529 pb é realmente complementar e conservada dentre as diferentes cepas do protozoário. Ferreira et al., (2008) observaram que as cepas de *Toxoplasma gondii* prevalentes no Brasil são altamente polimórficas.

Segundo OKAY et al (2009), o gene B1 apresentou uma maior porcentagem de resultados positivos (87,3%) em relação ao elemento repetitivo 529 pb (36,5%) no diagnóstico de toxoplasmose congênita em um estudo comparativo realizado em amostras de líquido amniótico em São Paulo. BELAZ et al. (2015) também sugerem que novos estudos com outras amostras clínicas provenientes da América do Sul sejam realizadas para verificar se linhagens atípicas presentes nesta região, não possuem ou sofreram mutações no número de repetições, levando a uma diminuição da sensibilidade no diagnóstico molecular de *Toxoplasma gondii* quando utilizado como alvo a sequência de 529 pb.

Diante do exposto, foi utilizado nesse estudo para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais a reação de qPCR em tempo real (tendo o gene B1 como alvo) e o conjunto de iniciadores e sonda propostos por KOMPALIC-CRISTO et al. (2007).

Ademais, também foram utilizados em nosso estudo, oligonucleotídeos de DNA sintético para a obtenção da curva padrão devido à simplicidade na obtenção dos fragmentos de DNA sintetizados, purificados e prontos para uso; redução de custos em comparação aos vetores construídos para clonagem e principalmente devido a dificuldade de obtenção de oocistos de *Toxoplasma gondii* encontrada durante o início da realização desse estudo.

Trabalhos recentes vêm demonstrando as vantagens na utilização de oligonucleotídeos sintéticos para a construção de curva padrão na quantificação absoluta de vírus através de PCR em tempo real (TOURINHO et al., 2015). FUMIAN et al. (2016) padronizaram uma curva padrão para a detecção simultânea de norovírus e rotavírus através de multiplex RT-qPCR utilizando gBlock® gene fragments, obtendo resultados satisfatórios.

Ainda não existem dados publicados sobre a utilização de oligonucleotídeos de DNA sintéticos para construção de curva padrão utilizada nas análises de PCR em tempo real para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii*. Entretanto é possível afirmar que em nosso estudo, a amplificação foi linear em todas as diluições seriadas de gBlock® DNA e a eficiência da curva padrão calculada em 95%, com $R^2 = 0,998$ e $Slope = -3,42$. O alcance de quantificação da curva padrão para oocistos de *Toxoplasma gondii* foi de $5,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^1$ cópias/5 μ L. Sabe-se que a curva padrão com pelo menos 90 a 110% de eficiência é o esperado para os ensaios de quantificação absoluta e desta maneira, a curva padrão utilizada neste estudo atendeu aos critérios de validação.

A ausência de um método padronizado e utilizado universalmente para a detecção e quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais faz com que os testes de avaliação da recuperação inicial e de recuperação em matrizes do método utilizado em nosso estudo não possa ser comparado com métodos clássicos.

Uma vez que não há padronização das técnicas de reações de qPCR para métodos de detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras clínicas, os desempenhos entre os laboratórios variam de acordo com as condições de análise dos mesmos (KOMPALIC-CRISTO et al., 2007), sendo esta ausência de padronização também observada em amostras ambientais. Condições experimentais, tais como turbidez das amostras analisadas, densidade de oocistos na suspensão de contaminação utilizada nos testes de recuperação e o volume de amostra concentrado também diferem entre estudos.

Os resultados obtidos nos testes de avaliação da recuperação inicial do método de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais realizado nas quatro amostras de água de osmose reversa nesse estudo apresentaram valores de porcentagens de recuperação de 55,5%, 31,8%, 49,9% e 56,7%, respectivamente. Em relação aos testes de avaliação da recuperação do método em matrizes de águas superficiais, utilizadas em nosso estudo, o resultado máximo de recuperação obtido foi de 8,9%. Existem poucos estudos na literatura descrevendo a avaliação de desempenho de métodos utilizados

para a detecção e quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais. Como citado anteriormente, não existe um método padronizado que seja utilizado universalmente para a detecção e quantificação de oocistos do protozoário em amostras de águas superficiais. Ademais, as poucas metodologias desenvolvidas em outros países para essa finalidade apresentam diferentes condições experimentais, não sendo possível estabelecer uma correlação entre dados obtidos em nosso experimento e dados obtidos por outros pesquisadores.

A concentração de grandes volumes de amostras por meio de filtração e também o processo de extração de DNA dos oocistos de *Toxoplasma gondii*, como já discutido anteriormente, são as etapas mais críticas do método utilizado em nosso estudo para a quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais. Mesmo utilizando técnicas com eficiência comprovada na literatura para estas etapas, os resultados de recuperação de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais no presente estudo mostraram que as características dessas amostras interferem na eficiência de recuperação do método, já que os resultados de recuperação inicial em água de osmose reversa apresentaram porcentagens satisfatórias de recuperação do respectivo protozoário.

Outro importante fator a ser considerado na recuperação do método e que poderia estar interferindo na recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais analisadas em nosso estudo é a turbidez das amostras. Alguns autores sugerem que a eficiência de recuperação de cistos e oocistos de protozoários em amostras de águas turvas são baixas, independentemente do método utilizado (BORCHARDT et al., 2009; NIEMINSKI et al., 1995; DIGIORGIO et al., 2002).

Diante do exposto, para equacionar os questionamentos gerados em relação aos resultados de recuperação obtidos nas amostras de águas superficiais em nosso estudo, novas pesquisas deverão ser realizadas para verificar as respectivas porcentagens de perda em cada etapa do método. Por fim, otimizações deverão ser realizadas no método com o intuito de alcançar melhores recuperações em análises de amostras de águas superficiais.

Das 39 amostras de águas superficiais analisadas em nosso estudo, 7,7% foram positivas para *Toxoplasma gondii*. Considerando os 10 mananciais estudados, detectou-se a ocorrência de *Toxoplasma gondii* em 30% dos mananciais. As amostras de águas superficiais com resultados positivos para *Toxoplasma gondii* foram coletadas no período chuvoso, nos meses

de novembro e dezembro, indicando que houve uma maior introdução de contaminantes no manancial devido à lavagem das margens do rio pelas águas das chuvas. Os resultados positivos de *Toxoplasma gondii* obtidos em nosso estudo corroboram com os resultados obtidos por pesquisadores em outros países.

WELLS et al. (2015) detectaram a presença de oocistos de *Toxoplasma gondii* em 8,8% de 1411 amostras de águas analisadas, na Escócia. A maioria das amostras positivas nesse estudo foram detectadas no período do outono e os autores sugerem que este fato pode estar relacionado ao aumento da precipitação que ocorre no final do ano, contaminando desta maneira, os corpos hídricos pelo escoamento das águas de chuvas. SHAPIRO et al. (2014), em um estudo de monitoramento do *Toxoplasma gondii* em amostras de mexilhões na Califórnia, também evidenciaram um pico de amostras positivas para o protozoário, no período de alta pluviosidade. WILKES et al. (2013) e SWAFFER et al. (2014) evidenciaram que o aumento da precipitação também tem sido associado com um maior risco de contaminação da via aquática pelo protozoário *Cryptosporidium* spp.

Na França, em um estudo realizado com 125 amostras de águas de consumo humano, águas superficiais e subterrâneas, visando a detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii*, 8% foram positivas para oocistos do protozoário (VILLENA et al., 2004). AUBERT, VILLENA (2009), analisando 482 amostras de águas ambientais, provenientes da região de Champagne-Ardenne na França, detectaram *Toxoplasma gondii* em 7,7% das amostras, incluindo água de abastecimento público. GALLAS-LINDEMANN et al (2013) também detectaram o protozoário em 9,6% de um total de 83 amostras de águas ambientais, em estudo realizado na Alemanha. No Irã, MAHMOUDI et al. (2015) detectaram 5,8% de amostras positivas para *Toxoplasma gondii* em 34 amostras de águas superficiais analisadas.

Dentre os mananciais avaliados em nosso estudo, o mais crítico foi o Rio Jaguari, no município de Pedreira, com densidade de 63,93 oocistos de *Toxoplasma gondii*/L de amostra. O Rio Corumbataí, no município de Piracicaba e o Rio Paraíba, no município de Aparecida apresentaram densidades de 1,12 e 0,45 oocistos de *Toxoplasma gondii*/L, respectivamente.

Para evidenciar a magnitude da contaminação nas amostras de águas superficiais com resultado positivo para *Toxoplasma gondii* em nosso estudo, o número de cópias/L obtido foi convertido em número de oocistos/L, utilizando as equações citadas anteriormente. Para cada oocisto de *Toxoplasma gondii* foram contabilizadas 280 cópias do gene B1, considerando que

foram empregados oocistos esporulados e que cada oocisto apresenta 8 esporozoítos (DUBEY et al., 1970; Dubey et al., 1998), com 35 cópias gênicas por genoma (Burg et al., 1989). É importante ressaltar que esta correlação não está estabelecida na literatura, podendo gerar baixa acurácia ou resultados inconsistentes, devendo ser objeto de estudos futuros para determinar uma correlação com acurácia comprovada.

Este estudo pode ser considerado um dos pioneiros a caracterizar águas de mananciais no Estado de São Paulo, em relação a presença de oocistos de *Toxoplasma gondii*. Os dados obtidos no presente estudo evidenciaram que protozoário encontra-se circulando em alguns mananciais em nosso estado.

Considerando o importante papel do *Toxoplasma gondii* em vários surtos de veiculação hídrica, o fato do maior surto mundial de toxoplasmose disseminado pela água ter ocorrido em nosso país (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DE MOURA et al., 2006) e também que alta densidade de oocistos do protozoário foi evidenciado em um dos mananciais avaliados nesse estudo (63,93 oocistos/L no Rio Corumbataí), seria importante a realização de um monitoramento mais extenso de *Toxoplasma gondii* em águas superficiais, abrangendo outros mananciais do Estado de São Paulo.

Este foi o primeiro passo no desenvolvimento de uma abordagem sistemática para a detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais no Estado de São Paulo. Consideramos esse estudo como um passo crucial na otimização e ampla aplicação futura do método em amostras de águas superficiais, como valiosa ferramenta de diagnóstico ambiental, possibilitando desta maneira, contribuir na gestão de riscos de sistemas de abastecimento público de água.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo de quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais nos permitiu obter as seguintes conclusões:

- Os testes de avaliação da recuperação inicial do método obtiveram resultados satisfatórios, apresentando uma porcentagem média de recuperação de 48,5%. Os testes de avaliação de recuperação do método em águas superficiais obtiveram um valor máximo de porcentagem de

recuperação de 8,9%, demonstrando que às características dessas amostras interferem na eficiência de recuperação do método, já que os resultados de recuperação inicial em água de osmose reversa apresentaram resultados satisfatórios na recuperação do respectivo protozoário, devendo dessa maneira ser objeto de futuros estudos para utilização na avaliação de águas superficiais e outras matrizes ambientais.

- A concentração de grandes volumes de amostras por meio de filtração, o processo de extração de DNA dos oocistos de *Toxoplasma gondii* dos concentrados das amostras de águas superficiais e a turbidez das amostras analisadas podem ser considerados fatores críticos na recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais pelo respectivo método.
- As 3 amostras de águas superficiais com resultados positivos para *Toxoplasma gondii* foram coletadas no período chuvoso (novembro e dezembro), indicando que houve uma maior introdução de contaminantes no manancial devido à lavagem das margens do rio pelas águas das chuvas.
- Dentre os mananciais avaliados em nosso estudo, o mais crítico foi o Rio Jaguari, no município de Pedreira, com densidade de 63,93 oocistos de *Toxoplasma gondii*/L de amostra. O Rio Corumbataí, no município de Piracicaba e o Rio Paraíba, no município de Aparecida apresentaram densidades de 1,12 e 0,45 oocistos de *Toxoplasma gondii*/L, respectivamente.
- A correlação utilizada nesse estudo para converter o número de cópias/L de DNA para número de oocistos/L de *Toxoplasma gondii* nas amostras com resultados positivos na reação de qPCR, ainda não está estabelecida na literatura e deve ser objeto de estudos futuros para determinar uma correlação com uma acurácia comprovada.
- Os resultados obtidos ressaltam a necessidade da realização do monitoramento periódico de oocistos de *Toxoplasma gondii* nos corpos hídricos utilizados para o abastecimento público.
- Evidencia-se a necessidade de realização de um estudo semelhante em outras UGRHIs do Estado de São Paulo (especialmente as de vocação para o agronegócio) e também em outras regiões do nosso país para a obtenção de dados sobre a ocorrência do protozoário.

- O presente estudo foi um dos primeiros a demonstrar a presença de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais no Estado de São Paulo e abre perspectivas para outros estudos que poderão orientar futuras linhas de pesquisa e apoiar os formuladores de políticas públicas na orientação de novas regulações em relação a qualidade da água.

8 PERSPECTIVAS

Novas abordagens a serem consideradas, incluem a realização de novos estudos, visando:

- Uma maior porcentagem de recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais, abrangendo não só a verificação das possíveis porcentagens de perdas de oocistos do protozoário em todas as etapas do método, como também a inclusão das otimizações necessárias.
- Uma melhor correlação entre níveis de pluviosidade e a presença de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas de mananciais, uma vez que esses dados representam aspectos importantes para a epidemiologia do protozoário.
- Caracterizar o genótipo de *Toxoplasma gondii* obtido nas amostras de águas superficiais positivas nesse estudo, com o intuito de se obter informações epidemiológicas em relação ao tipo de genótipo do protozoário detectado nos diferentes mananciais do Estado de São Paulo.
- Uma melhor correlação entre o número de cópias de DNA obtido na reação de qPCR com número de oocistos de *Toxoplasma gondii* presentes nas amostras de águas superficiais contaminadas com o respectivo protozoário. Vale ressaltar a importância da inclusão nesses estudos de uma curva padrão com oocistos de *Toxoplasma gondii* para uma correlação com a curva padrão de gBlocks Gene Fragments® (B1 Partial) e também a utilização de citometria de fluxo para obtenção de uma melhor acurácia nesta correlação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJZENBERG, D. et al. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 27–38, 2002.
- Applied Biosystems. Real-Time PCR handbook, 3rd Edition, 2014. Disponível em: <http://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/real-time-pcr-handbook.html>. Acesso em: 22/02/2016.
- AUBERT, D.; VILLENA, I. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: Proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne region, France. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 290–295, 2009.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55–62, 2003.
- BELAZ, S. et al. A 10-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1294–1300, 2015.
- BENENSON M. W. et al. Oocyst-Transmitted Toxoplasmosis Associated with Ingestion of Contaminated Water. **J Med N Engl**, v. 307, p. 666–669, 1982.
- BOJAR, I.; SZYMAŃSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*-state of the art. **Ann Agric Environ Med**, v. 17, n. 2, p.209–214, 2010.
- BONILLA, J. A. et al. Quantification of protozoa and viruses from small water volumes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 7, p. 7118–7132, 2015.
- BOOTHROYD, J. et al. Antigen and tubulin genes of *Toxoplasma gondii*. **UCLA Symposium of Molecular Cell Biology**, v. 42, p. 237–250, 1987.
- BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: Do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438–442, 2002.
- BORCHARDT, M. A. et al. Concentrating *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* from surface water and drinking water by continuous separation channel centrifugation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1089–1097, 2009.
- BOWIE, W. R. et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **The Lancet**, v. 350, n. 9072, p. 173–177, jul. 1997.
- BRANDÃO, G. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, n. 2, p. 143-149, 2006.
- BURG, J. L. et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan , *Toxoplasma gondii*, **Polymerase Chain Reaction**. v. 27, n. 8, p. 1787–1792, 1989.
- BUSHKIN, G. G. et al. Evidence for a Structural Role for Acid-Fast Lipids in Oocyst Walls of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, and *Eimeria*. **mBio**, v. 4, n. 5, p. 387–13, 2013.
- CALDERARO, A. et al. Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. **Acta Biomed**, v. 77, n. 2, p. 75-80, 2006.

- CETESB. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; Organizadores: Carlos Jesus Brandão [et al.]. São Paulo: CETESB; Brasília; ANA, 2011.
- CETESB. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 2014.
- CONRAD, P. A. et al. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. **J. Parasitol.**, v. 35, p. 1155–1168, 2005.
- CONTINI, C. et al. Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 3, p. 275–283, 2005.
- DABRITZ, H. A.; CONRAD, P. A. Cats and *Toxoplasma*: Implications for Public Health. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. 34–52, 2010.
- DARDE M.L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **J. Parasitol.**, v. 78, p. 786–794, 1992.
- DE MOURA, L. et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 326–329, 2006.
- DIGIORGIO, C. L. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* Recoveries in Natural Waters by Using Environmental Protection Agency Method 1623. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5952–5955, 2002.
- DUBEY, J.P., MILLER, N.L., FRENKEL, J.K. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. **J. Am Vet Med Assoc.**, v. 157, p. 1767–1770, 1970.
- DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of Animals and man. **CRC Press, Boca Raton**, p. 1–40, 1998.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - A waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2 SPEC.ISS., p. 57–72, 2004.
- DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877–882, 2009.
- DUBEY, J. P. et al. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **The Journal of parasitology**, v. 96, n. 4, p. 709–712, 2010.
- DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, p. 1375–1424, 2012.
- DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257–1278, 2008.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.

- DUMÈTRE, A.; DARDÉ, M. L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? **FEMS Microbiol Ver**, v. 2, p. 651-661, 2003.
- DUMÈTRE, A. et al. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. **Proc Natl Acad Sci**, v. 110, n. 28, p. 11535–11540, 2013.
- DUMÈTRE, A.; DARDÉ, M. L. Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. **Parasitology Research**, v. 101, n. 4, p. 989–996, 2007.
- EDVINSSON, B. et al. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 2, p. 131–136, 2006.
- ESPY, M. J. et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 165–256, 2006.
- FERREIRA, A. M. et al. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 1, p. 22–31, 2006.
- FERREIRA, I. M. et al. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 221–227, 2008.
- FIALHO, C. G.; TEIXEIRA, M. C.; ; ARAUJO, F.A.P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, n. 1, p. 1–23, 2009.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P., MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, p. 893–896, 1970
- FONTAINE, M.; GUILLOT, E. An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, n. 1, p. 29–36, 2003.
- FRAZÃO-TEIXEIRA, E. et al. Multi-Locus DNA Sequencing of *Toxoplasma gondii* Isolated from Brazilian Pigs Identifies Genetically Divergent Strains. **Veterinary parasitology**, v. 175, p. 33–39, 2011.
- FUMIAN T. M. et al. Performance of a one-step quantitative duplex RT-PCR for detection of rotavirus A and noroviruses GII during two periods of high viral circulation. **J Virol Methods**, v. 228, p.123–129, 2016.
- GALLAS-LINDEMANN, C. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). **Acta Tropica**, v. 125, n. 2, p. 231–236, 2013.
- GARCIA BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55–62, 2003.
- GATTÁS et al. Acute toxoplasmose outbreak at campus of the University of São Paulo related to food or water oocyst contamination. **In: Annals of the International Conference on Emerging Infectious Diseases**, p. 135, 2000.
- GOMES, A. L. V., et al. Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 133-136, 2006.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

- HEID, C. . et al. Real Time Quantitative PCR. **Genome Research**, v. 986, p. 986–994, 1996.
- HIGUCHI, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 413–7, 1992.
- HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 01, p. 41–61, 2005.
- HOHWYER, J. et al. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. **Food Microbiology**, v. 57, p. 36–44, 2016.
- HOLLAND, G. N. Reconsidering the Pathogenesis of Ocular Toxoplasmosis. **American Journal of Ophthalmology**. v. 128, p. 502–505, 1999.
- HOMAN, W. L. et al. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 69–75, 2000.
- HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J. Infect. Dis**, v.172:1561–1566, 1995.
- INSTITUTO TRATA BRASIL. Esgotamento Sanitário Inadequado e Impactos na saúde da População (2008-2011), 2013. Disponível em: http://www.tratabrasil.org.br/novo_site/cms/templates/trata_brasil/files/esgotamento.pdf
Acesso em: 22/02/2016.
- ISAAC-RENTON, J. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2278–80, 1998.
- JIANG, S. F. et al. Development of Immunoblot kit for the detection of anti-*Toxoplasma* antibodies. **Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases**, v. 23, n. 6, p. 449–452, 2005.
- JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 10–25, 2010.
- KARANIS, P. et al. The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: An overview and update. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 1, p. 86–99, 2013.
- KERAMBRUN, E. et al. Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne *Toxoplasma gondii*. **J Appl Microbiol**, v. 120, p. 498–508, 2016.
- KHAN, A. et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 2980–2992, 2005.
- KHAN, A. et al. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 942–949, 2006.
- KHAN, A. et al. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 6, p. 645–655, 2011.
- KOMPALIC-CRISTO, A. et al. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 2, p. 92–95, 2004.

- KOMPALIC-CRISTO, A. et al. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. **Parasitology Research**, v. 101, n. 3, p. 619–625, 2007.
- KOURENTI, C. et al. Development and Application of Different Methods for the Detection of *Toxoplasma gondii* in Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.1 p. 102–106, 2003.
- KOURENTI, C.; KARANIS, P. Development of a sensitive polymerase chain reaction method for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. **Water Sci Technol**, v. 50, n. 1, p. 287-29, 2004.
- KOURENTI, C.; KARANIS, P. Evaluation and applicability of a purification method coupled with nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 475–481, 2006.
- LAGO, E. G. et al. *Toxoplasma gondii* antibody profile in HIV-infected pregnant women and the risk of congenital toxoplasmosis. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 345–51, 2009.
- LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W. D.; SIEGEL, J. E. et al. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 690–697, 1995.
- LEHMANN, T. et al. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 107–114, 2004.
- LEHMANN, T. et al. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 30, p. 11423–8, 2006.
- LEONETI, A. B; PRADO, E. L; OLIVEIRA, S. V. W. B. Saneamento básico no Brasil: considerações sobre investimentos e sustentabilidade para o século XXI. **Revista de Administração Pública, Rio de Janeiro**, v. 45, n. 2, p. 331-348, 2011.
- LEVINE, N. D. Taxonomy of *Toxoplasma gondii*. **J. Protozool.** v. 24, n. 1, p. 36–41, 1977.
- LINDQUIST, H. D. A. et al. Autofluorescence of *Toxoplasma gondii* and related coccidian oocysts. **The Journal of parasitology**, v. 89, n. 4, p. 865–7, 2003.
- LLEWELLYN, S. et al. Application of a Multiplex Quantitative PCR to Assess Prevalence and Intensity of Intestinal Parasite Infections in a Controlled Clinical Trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2016.
- LORA-SUAREZ, F. et al. Detection of protozoa in water samples by formalin/ether concentration method. **Water Research**, v. 100, p. 377–381, 2016.
- MAHMOUDI, N.; SLATER, G. F.; FULTHORPE, R. R. Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH-contaminated soils. **Canadian journal of microbiology**, v. 57, n. 8, p. 623–628, 2011.
- MDIVANI, N. et al. Monitoring Therapeutic Efficacy by Real-Time Detection of Mycobacterium tuberculosis mRNA in Sputum. **Clinical Chemistry**, v.55, n.9, p.1694–1700, 2009.

- MEIRELES L. R. et al. HUMAN TOXOPLASMOSIS OUTBREAKS AND THE AGENT INFECTING FORM. FINDINGS FROM A SYSTEMATIC REVIEW. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 369–376, 2015.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965–1976, 2004.
- MORGULIS, A. et al. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. **Bioinformatics**, v. 24, p.1757–1764, 2008.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.
- NICOLLE, C., MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **CR Acad Sci**, v. 147, n. 763, 1908.
- NIEMINSKI, E. C.; SCHAEFER, F. W. I. I. I.; ONGERTH, J. E. Comparison of two methods of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p.1714–1719, 1995.
- NING, J. et al. Different influences of DNA purity indices and quantity on PCR-based DGGE and functional gene microarray in soil microbial community study. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 983–993, 2009.
- OKAY, T. S. et al. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. **Clinics**, v. 64, n. 3, p. 171–176, 2009.
- PALOS LADEIRO, M. et al. Assessment of *Toxoplasma gondii* levels in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by real-time PCR: an organotropism study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 18, p. 13693–13701, 2015.
- PAIVA CAVALCANTI, M.; LORENA, V. M. B.; GOMES, Y. M. Avanços biotecnológicos para o Diagnóstico das Doenças Infecciosas e Parasitárias. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n.1, p. 1-14, 2008.
- PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1385–1394, 2009.
- PENA, H. F. J. et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561–569, 2008.
- PENA, H. F. J. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3–4, p. 377–381, 2011.
- PENA, H. F. J. et al. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 111–117, 2013.
- PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; VIDAL, J.E.; SU, C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. **Future Microbiol**, v. 4, p. 1363–79, 2009.
- PFAFFL, M.W. Quantification strategies in real-time PCR. In: **Bustin SA (ed), A–Z of Quantitative PCR**, v.3, p. 87–120, 2004.
- PFEFFERKORN, E. R. Cell biology of *Toxoplasma gondii*. In **Modern Parasite Biology. Cellular, Immunological and Molecular Aspects**. D. J. Wyler, editor. W. H. Freeman and Company, New York. p. 26–50, 1990.

- PINKERTON, H., WEINMAN, D. *Toxoplasma* infection in man. **Arch Pathol**, 30:374–392, 1940
- PINKERTON, H., HENDERSON, R.G. Adult Toxoplasmosis: a previously unrecognized disease entity simulating the Typhus-Spotted Fever Group. **JAMA**, 116:807–814, 1941.
- QUINTERO-BETANCOURT, W.; PEELE, E. R.; ROSE, J. B. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: A review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. **Journal of Microbiological Methods**, v. 49, n. 3, p. 209–224, 2002.
- RAMÍREZ-CASTILLO, F. et al. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. **Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 307–334, 2015.
- REISCHL, U. et al. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. **BMC infectious diseases**, v. 3, p. 7, 2003.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.
- SABIN, A.B.; FELDMAN, H.A. Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, p. 660–663, 1948.
- SAMUELSON, J. et al. Strategies to discover the structural components of cyst and oocyst walls. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 12, p. 1578–1587, 2013.
- SANTOS, L. U. 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, 2011.
- SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J.C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, n. 6390, p. 82–85, 1992.
- SIBLEY, L. D.; AJIOKA, J. W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annu Rev Microbiol**, v. 62, p. 329–351, 2008.
- SILVA, A. V. DA et al. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 115–119, 2003.
- SILVEIRA, C. et al. Infection in Southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 131, n. 3, p. 351–354, 2001.
- SHAPIRO, K. et al. Surveillance for *Toxoplasma gondii* in California mussels (*Mytilus californianus*) reveals transmission of atypical genotypes from land to sea. **Environ Microbiol**, v. 17, n. 11, p. 4177–4188, 2014.
- SHWAB, E. K. et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, 141:453–461, 2014.
- SOARES, R. M. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1-2, p. 29–34, 2011.
- SOBRAL, C. A. et al. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 37–41, 2005.
- SOTIRIADOU, I.; KARANIS, P. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, n. 4, p. 357–365, 2008.

- SOUZA, C. F.; BACICURINSKI, I.; SILVA, E. F. F. Avaliação da qualidade da água do Rio Paraíba do Sul no município de Taubaté-SP. **Rio Boc**, v. 16, n.1, p. 16–23, 2010
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. **Nota preliminare pel. Rev. Soc. Scient.** v. 3, p.109–112, 1908.
- SROKA, J.; DUTKIEWICZ, J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in Water. **Ann Agric Environ Med**, v. 13, p. 169–175, 2006.
- SU, C. et al. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1–11, 2010.
- SUNDAR, N. Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*. **Vet. Parasitol**, v. 151, p. 125–132, 2008.
- SWAFFER, B. A. et al. Investigating source water *Cryptosporidium* concentration, species and infectivity rates during rainfall-runoff in a multi-use catchment. **Water Research**, v. 67, p. 310–320, 2014.
- SWITAJ, K. et al. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 3, p. 170–176, 2005.
- TENTER, A M.; HECKEROTH, A R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217–1258, 2000.
- TORRES, C. M. Sur une nouvelle maladie de l'homme, caracterisee par la presence d'un parasite intracellulaire, tres proche du *Toxoplasma* et de l'Encephalitozoon, dans le tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelette, le tissu cellulaire souscutane et le tissu nerveux. **Comptes rendus des séances de la Société de Biologie**, 97, 1778–1781, 1927.
- TOURINHO, R. S. et al. Genetics and Genome Research Application of Synthetic Standard Curves for Absolute Quantification of Hepatitis A and E by Real-Time PCR. **J Genet Genome Res**, v. 2, n. 1, p. 23–25, 2015.
- TRIVIÑO-VALENCIA, J. et al. Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. **Parasitology Research**, v. 115, n. 5, p. 1789–1797, 2016.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Method 1623.1. Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA**. Office of water (MS-140). EPA 816-R-12-001. January, 2012.
- VANWORMER, E. et al. Molecules to modeling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human-animal-environment interface. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 3, p. 217–231, 2013.
- VILLENA, I. et al. Evaluation of a Strategy for *Toxoplasma gondii* Oocyst Detection in Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4035–4039, 2004.
- WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895–901, 2009.
- WELLS, B. et al. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in water samples from Scotland and a comparison between the 529bp real-time PCR and ITS1 nested PCR. **Water Research**, v. 87, p. 175–181, 2015.
- WHO. Progress on Sanitation and Drinking-Water 2010 Update. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/9789241563956/en. Acesso em 22/02/2016.

- WHO/UNICEF. 25 YEARS Progress on Sanitation and Drinking Water: 2015 Update and MDG Assessment. **New York, NY: UNICEF and World Health Organization**, p. 4, 2015.
- WILKES, G. et al. Spatiotemporal analysis of *Cryptosporidium* species/genotypes and relationships with other zoonotic pathogens in surface water from mixed-use watersheds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 434–448, 2013.
- WOLF, A., COWEN, D., PAIGE, B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. **Science**, 89, 226–227, 1939.
- WILSON, L.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.3741–3751, 1997.
- YANG, W. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water sample concentrates by real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 11, p. 3477–3483, 2009.
- ZARLENGA, D. S.; TROUT, J. M. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2 SPEC.ISS., p. 195–217, 2004.
- ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computation Biology**, v. 7, p. 203–214, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1

CURRÍCULO LATTES



Ana Tereza Galvani

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3089847809544797>

Última atualização do currículo em 20/06/2016

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pelo Centro Universitário Herminio Ometto de Araras (1989). Atua na Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) há 26 anos na área analítica com ênfase em Microbiologia, Parasitologia e Controle de Qualidade Analítica Laboratorial.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Ana Tereza Galvani

Nascimento 09/02/1965 - Birigui/SP - Brasil

CPF 075.648.018-32

Formação acadêmica/titulação

2014 Mestrado em andamento em Saúde Ambiental.
Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP - USP, Brasil
Título: Quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de águas superficiais no Estado de São Paulo

Orientador: Maria Tereza Pepe Razzolini 

1985 - 1989 Graduação em Farmácia.
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Araras, Brasil, Ano de obtenção: 1989



Maria Tereza Pepe Razzolini

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2 - CA CA - Ciências Ambientais

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8467049839493963>

Última atualização do currículo em 08/06/2016

Possui graduação em Biologia pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (1986), mestrado em Saneamento Ambiental pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (1998) e doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (2003). Atualmente é professora associada do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Atuando na área de Microbiologia Ambiental, especialmente na avaliação da qualidade microbiológica de águas e avaliação quantitativa de risco microbiológico. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome Maria Tereza Pepe Razzolini

Nome em citações bibliográficas RAZZOLINI, M. T. P.; Maria Tereza Pepe Razzolini; RAZZOLINI, MARIA TEREZA PEPE

Endereço

Endereço Profissional Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.
Avenida Dr Arnaldo 715 1o andar Departamento de Saúde Ambiental
Cerqueira César
01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617712
Ramal: 210
Fax: (11) 30617732
URL da Homepage: <http://www.fsp.usp.br>

Pós-doutorado e Livre-docência

- 2013** Livre-docência.
Faculdade de Saúde Pública/USP, FSP/USP, Brasil.
Título: Circulação de patógenos em águas de consumo e estimativa do risco de infecção na região Metropolitana de São Paulo. Ano de obtenção: 2013.
- 2010** Pós-Doutorado.
Michigan State University, MSU, Estados Unidos.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.