Universidade de São Paulo

Faculdade de Saúde Pública

Toxoplasma gondii em amostras de água de reuso: proposta de método de detecção e quantificação por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

Veridiana Karmann Bastos

Tese apresentada para ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título Doutora em Ciências.

Área de Concentração: SaúdePública

Orientadora: Profª Drª Maria Tereza Pepe Razzolini

São Paulo

2020

Toxoplasma gondii em amostras de água de reuso: proposta de método de detecção e quantificação por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

Veridiana Karmann Bastos

Tese apresentada para ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título Doutora em Ciências.

Área de Concentração: SaúdePública

Orientadora: Profª Drª Maria Tereza Pepe Razzolini

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dedicatória

À minha família.

Rosilda e Eni.

Agradecimentos

À Profª Drª Maria Tereza Pepe Razzolini pela orientação e dedicação em meu aprimoramento profissional e pessoal. Seu apoio e encorajamento para finalizar esta etapa foram essenciais.

À Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), nas pessoas de Mikaela Renata Funada Barbosa e Ana Tereza Galvani por todo suporte e acolhimento na hora de dúvidas. A disponibilidade e apoio de vocês contribuíram imensamente com esta tese.

À Drª Milena Dropa por sua dedicação, suporte e profissionalismo que contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho.

À bióloga Francisca Alzira do Santos Peternella por estar presente em todas as etapas desenvolvidas do projeto, contribuindo com seu conhecimento e experiência. Aprendi e continuo aprendendo muito com você, dentro e fora do laboratório.

Ao Prof. Dr Aurélien Dumètre, do *IHU - Méditerranée Infection* e Faculdade de Farmácia de *Aix-Marseille*, por me receber em seu laboratório, compartilhando seu conhecimento e protocolos. Agradeço ainda toda equipe do *IHU*, onde pude desenvolver meu Doutorado Sanduíche (Processo: Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior -88881.187552/2018-01). O acolhimento e a vivência neste Instituto contribuíram sobremaneira com meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Professor João Luís Garcia, da Universidade Estadual de Londrina, por nos ceder suspensão de oocistos de *Toxoplasma gondii*, utilizada nos protocolos de padronização e por sempre estar disposto a cooperar.

À Drª Luciana Regina Meirelles Jaguaribe Ekman, do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical, por auxiliar na identificação, cessão de oocistos e protocolo. Obrigada por nos receber em seu laboratório.

À Drª Gilda Maria Barbaro Del Negro, do Laboratório de Micologia Médica (LIM-53) por nos receber em seu laboratório e nos permitir utilizar o homogeneizador de alta velocidade. Sua contribuição com seus conhecimentos sobre fungos e enzimas foram de grande valia para o desenvolvimento desse trabalho.

Á mestranda Giovanna Silva Santiago, que participou das primeiras etapas da pesquisa em seu estágio de aprimoramento. Tenho certeza de que seu comprometimento e dedicação serão fundamentais para o desenvolvimento científico.

À mestre e amiga Geyse Aparecida Cardoso dos Santos, por ouvir minhas dúvidas e contribuir com ideias e soluções. Seu entusiasmo, determinação e comprometimento com a saúde humana e ambiental são contagiantes. Continue conquistando o mundo!

Às D^{ras} Solange Martone Rocha e Miriam Lopes da Silva e à Maria do Carmo de Oliveira Dória por sempre estarem dispostas a cooperar com suas experiências e pela amizade.

Ao Núcleo de Avaliação em Riscos Ambientais (NARA). A diversidade de conhecimentos, questionamentos e perspectivas enriqueceram e ampliaram minha percepção das múltiplas possibilidades da interação entre humanos e ambiente.

À amiga Luciana Haipek Mosolino Lerche, quem me abriu as portas da Faculdade de Saúde Pública.

Às amizades forjadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Resistência a Antimicrobianos (MicroRes): Bruna, Bruno, Giovanna, Lucas, Aline, Giovanni, Marcos, Felipe, Giovanna, Thais, Helder, Heloisa. Todos são e foram importantes em cada etapa que vivi nesse Laboratório.

Para quem lê estes agradecimentos, são apenas nomes. Para mim são pessoas comprometidas com o desenvolvimento científico. Todos equilibrando a vida acadêmica com as dificuldades da pesquisa e recursos escassos. A cooperação, dentro e fora do laboratório, foi imprescindível para manter o ânimo. Os cafés, acompanhados de bom-humor e reflexões, foram fundamentais para manter a sanidade mental.

Ao querido Andrew McQueen. Obrigada por sempre me incentivar e me acolher em momentos de incertezas. Acho que agora posso dizer: “Acordei! Alguém me tira daqui!”.

Essa tese foi construída baseada em cooperação, mãos e ideias. Ao desenvolver esse trabalho tive certeza que caminhando lado a lado, chegamos mais longe. Obrigada a todos que participaram dessa jornada. Cada um de vocês está representado nessas letras.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001.

Bastos VK. *Toxoplasma gondii* em amostras de água de reuso: proposta de método de detecção e quantificação por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2020.

Resumo - O reuso de água contribui nos âmbitos ambientais, sociais e econômicos. Entretanto a presença de parasitos em amostras hídricas tem sido evidenciada por diferentes estudos, entre eles *Toxoplasma gondii*. A ausência de uma metodologia padronizada para detecção de oocistos em amostras hídricas, dificulta a caracterização das mesmas, comprometendo a elaboração de uma legislação. Tendo em vista a importância do reuso da água na mitigação da escassez, do stress hídrico e diante dos desafios expostos é que o presente trabalho se insere. **Objetivos -** Propor técnica de concentração e recuperação de oocistos em água de reuso; propor método de extração de DNA; detectar e quantificar oocistos por qPCR. **Método -** Utilizando o método *1693/2014 USEPA*, foram concentrados 30 L de água de reuso de 20 amostras provenientes de duas ETE's da cidade de São Paulo, Brasil. Os 15 mL resultantes desse processo foram concentrados em membrana 0,45µm. O material filtrado na membrana foi recuperado por raspagem com alça bacteriológica de 10 µL. Para extração de DNA foram empregadas duas técnicas: o kit comercial *DNeasy PowerSoil Kit*® otimizado com a enzima *Zymolyase*® e choque térmico. A quantificação de DNA foi realizada com a sequência alvo B1. **Resultados** - Na extração por choque-térmico não foi detectado DNA nas vintes amostras realizadas. Das 16 amostras submetidas à extração enzimática, quatro foram consideradas positivas. **Discussão -** A extração de DNA consistiu na etapa essencial para detecção e quantificação de oocisto, dado a natureza resistente das paredes. **Conclusão -** O reuso de água pode ser comprometido na ausência de um protocolo padronizado de detecção e quantificação de oocisto de *T. gondii*, que possibilite a determinação de parâmetros parasitológicos para elaboração de uma legislação.

Palavras-chave: *Toxaplasma gondii*, qPCR, amostra ambiental.

Bastos VK. [*Toxoplasma gondii* in water samples for reuse: proposal for a method of detection and quantification by quantitative real-time PCR (qPCR)] [thesis]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2020. Portuguese.

Abstract - The wastewater reuse contributes in the environmental, social and economic spheres. However, the presence of parasites in water samples has been evidenced by different studies, including *Toxoplasma gondii*. The absence of a standardized methodology for detecting oocysts in water samples makes it difficult to characterize them, compromising the drafting of legislation. In view of the importance of wastewater reuse in mitigating water scarcity and stress and in view of the challenges presented, this work is inserted. **Objectives** - To propose oocyst concentration and recovery techniques in wastewater reuse; propose DNA extraction method; detect and quantify oocysts by qPCR. **Method -** Using method 1693/2014 USEPA, 30 L of wastewater reuse from 20 samples from two WWTPs in the city of São Paulo, Brazil, were concentrated. The 15 mL resulting from this process were concentrated in a 0.45 µm membrane. The material filtered on the membrane was recovered by scraping with a 10 µL bacteriological loop. For DNA extraction, two techniques were used: the commercial kit DNeasy PowerSoil Kit® optimized with the enzyme Zymolyase® and freeze - thaw. DNA quantification was performed with the target sequence B1. **Results** - In freeze - thaw extraction, no DNA was detected in the 20 samples performed. Of the 16 samples submitted to enzymatic extraction, four were considered positive. **Discussion** - DNA extraction was the essential step for oocyst detection and quantification, given the resistant nature of the walls. **Conclusion** - Wastewater reuse can be compromised in the absence of a standardized protocol for the detection and quantification of *T. gondii* oocysts, that allows the determination of parasitological parameters for the elaboration of legislation.

Key words: *Toxaplasma gondii*, qPCR, environmental sample.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. *TOXOPLASMA GONDII*: AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO DE VIDA	15
2.2. GENÓTIPOS	21
2.3. EPIDEMIOLOGIA E SURTOS	25
2.3.1. Soroprevalência de toxoplasmose em humanos	25
2.3.2. Surtos de veiculação hídrica	27
2.4. DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII* EM ESGOTO	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MÉTODO	32
4.1. LOCAL DA AMOSTRAGEM	32
4.2 AMOSTRA E AMOSTRAGEM	36
4.3 COLETA, PRESERVAÇÃO E TRANSPORTE	36
4.4 CONCENTRAÇÃO DE OOCISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII*	36
4.4.1. Método *USEPA 1693/2014*	36
4.4.2. Concentração por membrana e raspagem	38
4.5 DETECÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII* POR QPCR	39
4.5.1. Extração de DNA	39
4.5.1.1. *DNeasy PowerSoil Kit*® otimizado com a enzima *Zymolyase*®	39
4.5.1.2. Choque térmico	40
4.5.2. Ensaio de PCR em Tempo Real (qPCR)	41
4.5.3 Curva padrão	42
4.5.4. Condições de amplificação da q PCR	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

A introdução de água encanada e tratamento de esgoto às habitações foi considerada a maior "revolução sanitária" do século 19 (FEINMANN, 2020).

Entretanto a urbanização altera a sustentabilidade do ciclo da água, afetando a disponibilidade para a população (SORUP *et al*., 2020). Quando a demanda de água excede o volume de água disponível, ocorre a escassez de água. Atrelada à escassez, advém o stress hídrico, que indica a relação entre quantidade de água liberada e os recursos renováveis de água. Intervenções que visam re-equilibar o balanço hídrico são essenciais. Portanto, o reuso de água traz benefícios sociais, ambientais e econômicos (TORRETA *et al*., 2020).

Tendo em vista a necessidade de proteger os corpos hídricos e assegurar o acesso à água potável a todos, é publicado o documento "Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável". O Objetivo do Desenvolvimento Sustentável (ODS) 6 aborda a segurança de água limpa e saneamento, mais especificamente: "Assegurar a disponibilidade e gestão sustentável da água e saneamento para todas e todos". A agenda ainda destaca a contribuição do ODS 6 no progresso de outros ODS (UN, 2015). ZHANG *et al.* (2016), demonstraram através do "*system thinking*" que a melhoria no acesso a água e saneamento impacta em uma vida mais saudável (ODS 3), promove a igualdade de gênero e o empoderamento feminino (ODS 5) através da redução das doenças de veiculação hídrica.

O reuso da água desempenha papel fundamental na redução da pressão dos recursos hídricos. Embora essa prática seja comum em alguns âmbitos (indústrias e agricultura), outros usos devem ser considerados, como em áreas urbanas, para lavagens de ruas, irrigação de parques, dentre outros. O reuso urbano é uma tendência global sustentável que preserva os mananciais para usos nobres como o abastecimento público (UNEP, 2005; KELLIS *et al*., 2013). Diante da importância que o reuso da água desempenha na sustentabilidade, em 2017, foi publicado o relatório "*Wastewater: The Untapped Resource*", destacando que a gestão desse uso é imprescindível para o futuro (WWAP, 2017). Em trabalho realizado por MIZYED e MAYS (2020), onde inovações técnicas e a legitimação do reuso da água foram avaliados, os autores selecionaram a base de dados AQUASTAT, da UNFAO, como a mais completa. De acordo com AQUASTAT, dos 92 países avaliados, são produzidos mais de 283 $x10^9$ m^3 de esgoto. Apenas 60% é tratado, 40% utilizado no reuso indireto e 5% no reuso direto. No Brasil, em 2017, apenas 45,1% do esgoto era tratado e foram registradas 258.826 internações causadas

por doenças de veiculação hídrica (ITB, 2019). O lançamento dessas águas no ambiente é fonte de contaminação microbiológica e parasitológica tanto de mananciais como solos e fontes de água subterrâneas, causando preocupações em saúde pública devido a presença de patógenos (WWAP, 2017).

Um protozoário que vem assumindo relevância no cenário de doenças transmitidas pela água é *Toxoplasma gondii*, cuja estimativa é que a infecção mundial seja entre 30-50%. A prevalência pode variar de 10 a 80%, podendo ocorrer diferenças dentro de um mesmo país, devido aos hábitos alimentares, situação socioeconômica, qualidade da água e condições sanitárias (FLEGR *et al.*, 2014; ROBERT-GANGNEUX, 2014). Hábitos culturais, religiosos e presença de felinos também são fatores que contribuem com o aumento da soroprevalência de *T. gondii*. No Brasil, em algumas regiões a taxa pode ultrapassar 70% (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O parasito que tem o gato como hospedeiro definitivo, pode infectar humanos através da contaminação de alimentos como carne, vegetais e frutas. O solo e água também têm desempenhado papel importante na dispersão do *T. gondii* (DUMÈTRE e DARDÉ, 2003; AUBERT e VILLENA, 2009; JONES e DUBEY, 2010; KARANIS *et al.*, 2013, FLEGR *et al.*, 2014), uma vez que os oocistos são resistentes à temperatura de até 60º C, a tratamento químico com hipoclorito de sódio, ozônio e inativação ultravioleta. Podem sobreviver até 4,5 anos na água (DUMÈTRE *et al.*, 2003; VANWORMER *et al.*, 2013). Apresentam duas camadas similares a moléculas poliméricas o que lhes confere resistência física. A camada externa é mais fina que a interna, e estas não estão aderidas. Quando expostos ao hipoclorito de sódio, a camada externa pode ser removida; mantendo-se a camada interna intacta (DUMÈTRE *et al.*, 2013).

Embora a maioria das infecções em indivíduos imunocompetentes seja assintomática ou com sintomas subclínicos, manifestações clínicas podem ocorrer entre 10-20% dos infectados (CAMILO *et al.*, 2017). Em indivíduos imunodeprimidos e gestantes a toxoplasmose assume importância devido a infecções mais severas que podem causar retinocoroidite toxoplásmica, encefalite, esplenomegalia, pneumonia e cegueira, abortos e comprometimento do desenvolvimento mental do feto. (FLEGR *et al.*, 2014; INAGAKI *et al.*, 2014; HOSSEINI *et al.*, 2019).

Considerando o aumento da prevalência da toxoplasmose, acredita-se que o ambiente desempenhe papel importante na disseminação dos oocistos, principalmente a água. No Brasil, estima-se que entre 50 a 80% dos adultos estejam infectados por *T. gondii*. Foram descritos surtos em todo território, sendo que a maior quantidade de indivíduos foi afetada quando o solo ou água estavam contaminados por fezes de gatos. Notou-se ainda a identificação de novos casos ao longo do tempo quando a infecção ocorria por veiculação hídrica, pois a resistência a adversidades ambientais pelo oocisto prolonga a exposição e, portanto, a ocorrência de novos casos. (MEIRELLES *et al.*, 2015).

Surtos causados por protozoários via veiculação hídrica ocorrem mundialmente e têm impactos não somente na saúde, como também na economia. Em 100 anos, foram registrados 325 casos de surtos, dentre os quais três foram atribuídos a *Toxoplasma gondii* (KARANIS *et al.*, 2007). Ao fazer uma revisão de surtos ocorridos no período de 2004-2010, BALDURSSON e KARANIS (2011) relataram que dos 199 casos registrados, quatro eram de toxoplasmose. Esses mesmos autores chamam a atenção para o fato que melhorias no sistema de vigilância epidemiológica nos registros de toxoplasmose, em geral, aumentam os casos, incluindo os casos de veiculação hídrica como no Brasil e Guiana Francesa. A toxoplasmose hídrica tem se mostrado uma ameaça considerável e é alvo de esforços para compreender sua distribuição bem como desenvolver metodologia de detecção em amostras ambientais (KARANIS *et al.*, 2013).

No Brasil, os surtos com maior número de atingidos ocorreram no sul do país, nos anos de 2001/2002 e no ano de 2018. Entre novembro de 2001 e janeiro de 2002, em Santa Isabel do Ivaí (Paraná) foram registrados 426 indivíduos com sorologia compatível com toxoplasmose aguda. Após mapear os reservatórios de água da cidade, comprovou-se que um deles estava contaminado com *T. gondii*. O foco principal que levou à contaminação da fonte de água foi a conservação precária do reservatório e a presença de uma gata com filhotes que residiam no local (DE MOURA *et al.*, 2006). O segundo e mais contundente surto por veiculação hídrica ocorreu em abril de 2018, em Santa Maria (Rio Grande do Sul) (MINUZZI *et al*., 2020b). O último relatório fornecido pela prefeitura em de 19 de outubro de 2018, confirmava 809 casos, sendo que 114 eram grávidas. Foram relatados três óbitos fetais, 10 abortos e 22 toxoplasmoses congênitas (RIO GRANDE DO SUL, 2018).

Com o intuito de compreender qual o impacto da água na disseminação de oocistos, diversos pesquisadores têm se empenhado em padronizar uma técnica de concentração e quantificação

do oocisto de *T. gondii* (ISAAC-RENTON *et al.*, 1998; DUMÈTRE e DARDÉ, 2003; KOURENTI *et al.*, 2003; VILLENA *et al.*, 2004; KOURENTI e KARANIS, 2004; DUMÈTRE e DARDÉ, 2005; KOURENTI e KARANIS, 2006; DUMÈTRE e DARDÉ, 2007; SOTIRIADOU e KARANIS, 2008; AUBERT, 2009; BORCHARDT *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009; SHAPIRO *et al.*, 2010; JONES e DUBEY, 2010; GALLAS-LINDEMANN *et al.*, 2013; KARANIS *et al.*, 2013; SHAPIRO *et al.*, 2014; WELLS *et al.*, 2015; HARITO *et al.*, 2017; GALVANI *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2020). São escassas pesquisas realizadas em esgoto bruto e tratado (MOULIN *et al.*, 2010; GALLAS-LINDEMANN *et al.*, 2013; MARANGI *et al.*, 2015; AJONINA *et al.*, 2018). Até a última revisão bibliográfica realizada para esta tese, não havia publicações referentes à detecção de oocisto em água de reuso. Segundo SHAPIRO *et al.* (2019), os desafios da padronização de uma metodologia residem em múltiplos fatores: pouco conhecimento sobre o oocisto, a baixa concentração no ambiente, sedimentos nas amostras, e a semelhança morfológica com outros protozoários dificultando a identificação sob microscopia.

Uma das técnicas que tem se mostrado promissora é o PCR quantitativo em tempo real, uma vez que é sensível, específica e com boa reprodutibilidade. O método tem sido proposto em diversas pesquisas (JONES *et al.*, 2000; KOURENTI e KARANIS, 2004; VILLENA *et al.*, 2004; SCHWAB e MCDEVITT, 2003; KOURENTI e KARANIS, 2006; WELLS *et al.*, 2015; MARANGI *et al.*, 2015; GALVANI *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de uma metodologia padronizada que possibilite a detecção de oocisto em amostras ambientais e nesse caso em amostras de água de reuso é imprescindível, uma vez que estes são resistentes no ambiente, ocorrem em baixas concentrações e têm baixa dose de infecção.

No Brasil, o cenário se agrava pois não há legislação federal que regulamente a utilização da água de reuso. No município de São Paulo foi promulgada, em 22 de abril de 2015, a Lei Nº 16.174 que estabelece regras e medidas para fomento do reuso. No entanto, não são estabelecidos padrões parasitológicos para controle de qualidade (CIDADE DE SÃO PAULO, 2015). Dois anos depois, em 28 de junho de 2017, o Estado de São Paulo publicou a Resolução Conjunta SES/SMA/SSRH Nº 01, onde o reuso direto não potável de água é determinado para fins urbanos. Na Resolução, são definidos os usos, padrões de qualidade, monitoramento e cuidados de manuseio da água de reuso. Antes do início da operação de uma planta, é recomendado que seja realizada uma caracterização microbiológica completa

(bactéria, vírus e protozoários). Após o funcionamento da estação, o produtor deve monitorar a água de reuso de acordo com as frequências estabelecidas. Para protozoários (*Cryptosporidium* e *Giardia*) o monitoramento deve ser mensal. Ainda nas Disposições Finais da Resolução, o Artigo 14 estabelece que os critérios técnicos adotados poderão ser reformulados e complementados diante do desenvolvimento científico e tecnológico, bem como a necessidade de preservação ambiental, proteção da saúde pública e manejo sustentável da água (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2017).

Tendo em vista o aumento da prevalência da toxoplasmose, relatos de surtos de veiculação hídrica, necessidade do estabelecimento de uma técnica padronizada para amostras ambientais, aumento da utilização da água de reuso e a falta de legislação federal que a regulamente, é que o presente trabalho se insere. A pesquisa tem como objetivo propor uma técnica de detecção e quantificação de oocistos de *T. gondii* em amostras de água de reuso. Os dados produzidos visam contribuir com o desenvolvimento de uma metodologia padronizada, bem como com informações e subsídios na elaboração de políticas de utilização de águas residuárias e estabelecimento de padrões de qualidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *TOXOPLASMA GONDII*: AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO DE VIDA

A toxoplasmose é causada pelo coccídeo *T. gondii*. Esse tem a família Felidae como hospedeiro definitivo e os demais animais de sangue-quente como hospedeiros intermediários (TENTER *et al.*, 2000; DUBEY, 2010).

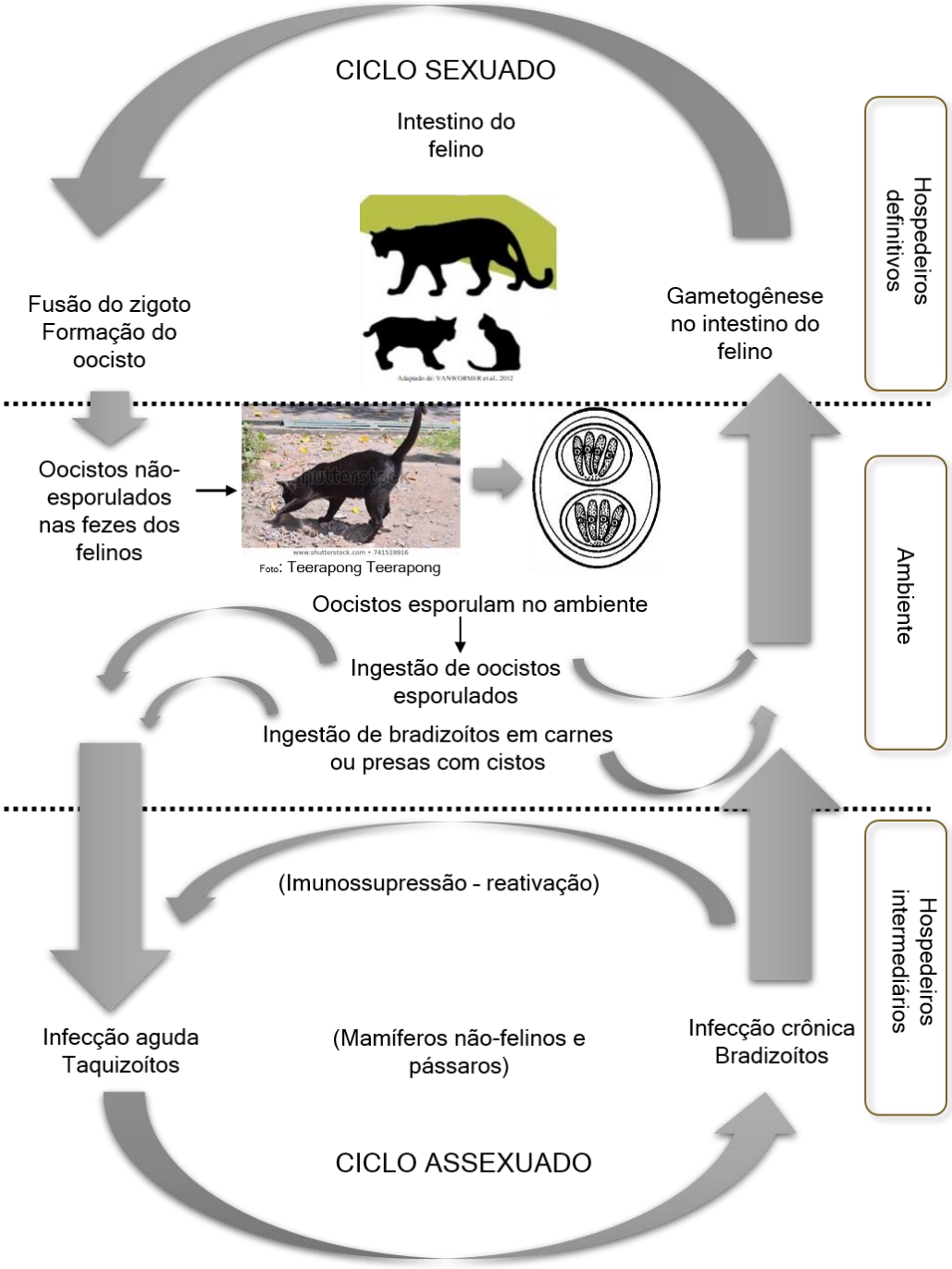
Toxoplasma gondii foi descrito inicialmente em dois trabalhos publicados em 1908 por SPLENDORE (1908, traduzido para o inglês em 2009) e por NICOLLE e MANCEAUX (1908, traduzido para o inglês em 2009). Alfonso Splendore caracterizou o parasito em coelhos, no Brasil, enquanto Charles Nicolle e Louis Herbert Manceaux identificaram-no em roedores denominados gundi (*Ctenodactylus gundi*), na Tunísia (MORRISSETE e AJIOKA, 2009). Em ambos os relatos, os pesquisadores pontuaram as semelhanças do parasito à *Leishmania*. SPLENDORE (2009) não chegou a classificá-lo, mas NICOLLE e MANCEAUX (2009) classificaram provisoriamente como *Leishmania gondii*. No entanto

perceberam se tratar de um novo organismo, nomeando-o baseado em sua morfologia (do Latim moderno *Toxo* = arco; *plasma* = vida) e no hospedeiro gundi (DUBEY, 2014).

O ciclo de vida completo do parasito foi elucidado somente em 1970, com a descoberta do oocisto (fase ambientalmente resistente) e da fase sexuada no intestino delgado do gato (TENTER *et al.*, 2000; DUBEY, 2009).

A complexidade do ciclo biológico (figura 1) heteroxeno facultativo do *T. gondii* está conectada por três estágios infectantes: taquizoíto, bradizoíto e oocisto/esporozoítos (FRENKEL *et al.*, 1970; TENTER *et al.*, 2000; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Figura 1:Diagrama do ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.



Adaptado de Bahia-Oliveira et al., 2015.

O taquizoíto tem como característica a replicação rápida (do Grego *tachos* = rápido), tem formato crescente e mede aproximadamente 2 x 6 µm. Esse se multiplica assexuadamente nas células do hospedeiro por endodiogenia (DUBEY, 2010). Nos felinos o ciclo assexuado ocorre nas células epiteliais não-intestinais, enquanto nos hospedeiros intermediários pode ocorrer em qualquer célula. Após invadir a célula do hospedeiro, o taquizoíto se torna ovóide

e é rodeado pelo vacúolo parasitófaro, onde irão ocorrer as multiplicações (FRENKEL, 1973; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2017). Depois de seguidas replicações, a célula se rompe e os taquizoítos são disseminados pela corrente sanguínea, infectando diversos tecidos, como Sistema Nervoso Central (SNC), placenta, olhos, músculos esquelético e cardíaco. O estágio do taquizoíto causa uma forte resposta inflamatória, destruição tecidual, causando manifestações clínicas da doença. (MONTOYA e LIESENFIELD, 2004).

Em resposta ao sistema imunológico, são formados os cistos contendo os bradizoítos que são resistentes a tratamentos existentes (KIM, 2015; TU *et al.*, 2018). Os bradizoítos são estruturalmente similares aos taquizoítos, porém metabolicamente diferenciados já que são latentes e adaptados para longa sobrevivência na célula hospedeira (BAHIA-OLIVEIRA *et al*., 2017). Sua replicação é lenta (do Grego *bradi* = lento) (FRENKEL, 1973) e permanecem encistados geralmente nos olhos e no cérebro, podendo ser encontrados nas vísceras, músculos esquelético e cardíaco. Esta forma evolutiva mede aproximadamente entre 7x1,5 µm (CASTRO e DUBEY, 2019).

A forma de resistência do *T. gondii* no meio ambiente é o oocisto, e esse tem sido responsável pelo aumento de infecções no mundo. Ele é resistente a estresses físicos/químicos, desinfetantes como ozônio, UV e produtos à base de cloro (DUMÈTRE *et al.*, 2013). O oocisto é carregado negativamente e tende a não se agregar com outras partículas em água doce, o que já pode ocorrer em águas salobra e marinha. A densidade específica varia entre 1,050 e 1,100 (DUMÈTRE *et al.*, 2012). Na tabela 1 são apresentadas as características gerais do oocisto de *T. gondii*.

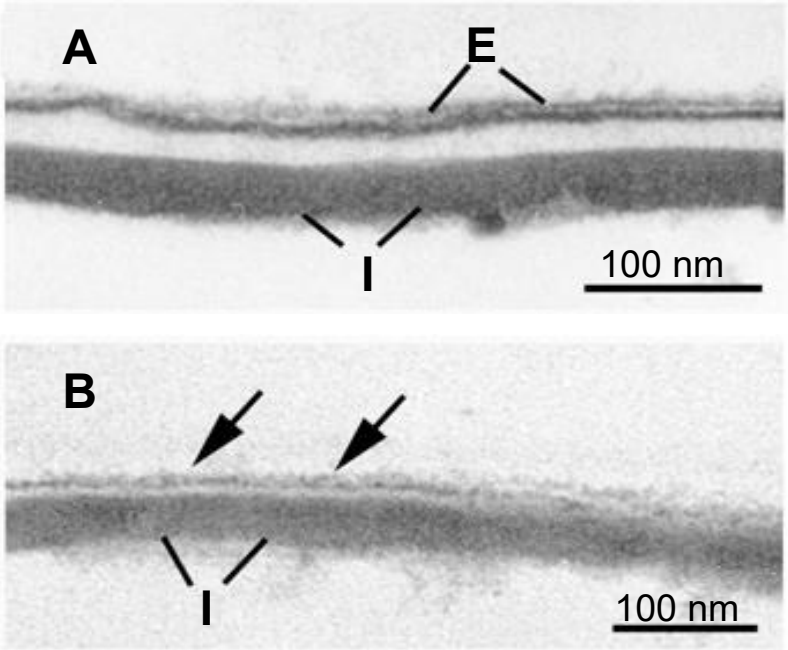
Tabela 1: Características gerais do oocisto de *Toxoplasma gondii*.

	Característca	Oocisto
	Tamanho (µm)	10 x 12
Parede	Espessura (nm)	~100
	Número de camadas	2
	Espessura camada externa (nm)	30
	Bioquímica da superfície	Proteínas cisteína e tirosina (entrelaçada)

Fonte: Adaptado de DUMÈTRE *et al.*, 2012.

O oocisto é constituído por duas camadas, sendo a externa mais fina que a interna (figura 2). As camadas não estão intrinsecamente ligadas uma vez que é possível remover a camada externa com hipoclorito de sódio (DUMÈTRE *et al*., 2013).

Figura 2: Parede externa do oocisto de *T.gondii*.



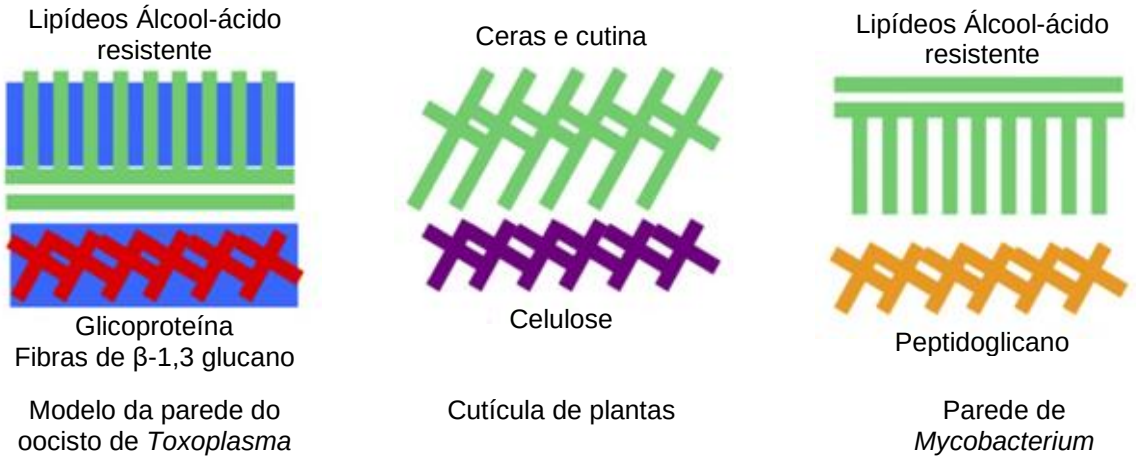
Adaptado de DUMÈTRE *et al.*, 2013

A: Detalhe da parede do oocisto, com a parede externa (E) mais fina e a interna mais grossa (I). B: Detalhe da parede do oocisto após tratamento com hipoclorito de sódio, a parede interna (I) se mantém intacta e há alguns resquícios da parede externa (setas).

A camada externa do oocisto contém mais de 90% de proteínas com variadas estruturas de cisteína e tirosina. Estudos mostram que a tirosina entrelaçada contribui para o formato e fortalecimento da parede do oocisto. Essa disposição da tirosina também confere ao oocisto a

autofluorescência azul característica. A complexa organização polimérica confere robustez ao oocisto em termos mecânicos (DUMÈTRE *et al.*, 2013). BUSHKIN *et al.* (2013) sugerem que a camada externa é semelhante às micobactérias, tendo lipídeos álcool-ácido resistente, rica em triglicérides, e análoga à cutícula das plantas (celulose e cera/cutina). Os autores acreditam que, embora sejam organismos divergentes, o uso de lipídeos como proteção a estresses ambientais seja resultado de uma evolução convergente (figura 3).

Figura 3**:** Representação das paredes do oocisto *Toxoplasma gondii*, plantas e micobactérias.

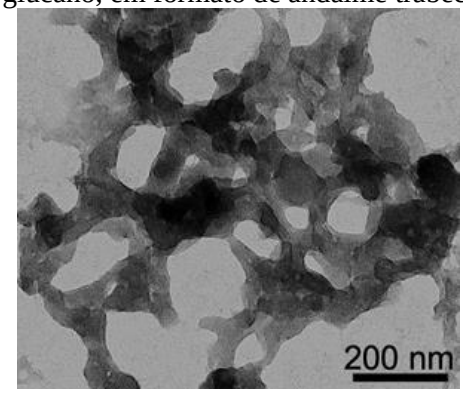


Lipídeos álcool-ácidos resistentes estão presentes em ambas as camadas do oocisto de *T.gondii*. Fibras de β-1,3 glucano estão presentes na camada interna. Essas estruturas se assemelham às micobactérias e plantas, o que confere resistência ao estresse ambiental.

Fonte: Adaptado de BUSHKIN *et al.*, 2013.

A camada interna do oocisto é mais grossa e confere resistência à degradação química. Esta é rica em β-1,3 glucan, disposto em forma de andaime trabecular (figura 4), dando sustentação para camada externa (BUSHKIN *et al.*, 2012).

Figura 4: Camada interna de oocisto de *Eimeria* (modelo para *Toxoplasma gondii*), constituída por β-1,3 glucano, em formato de andaime trabecular.

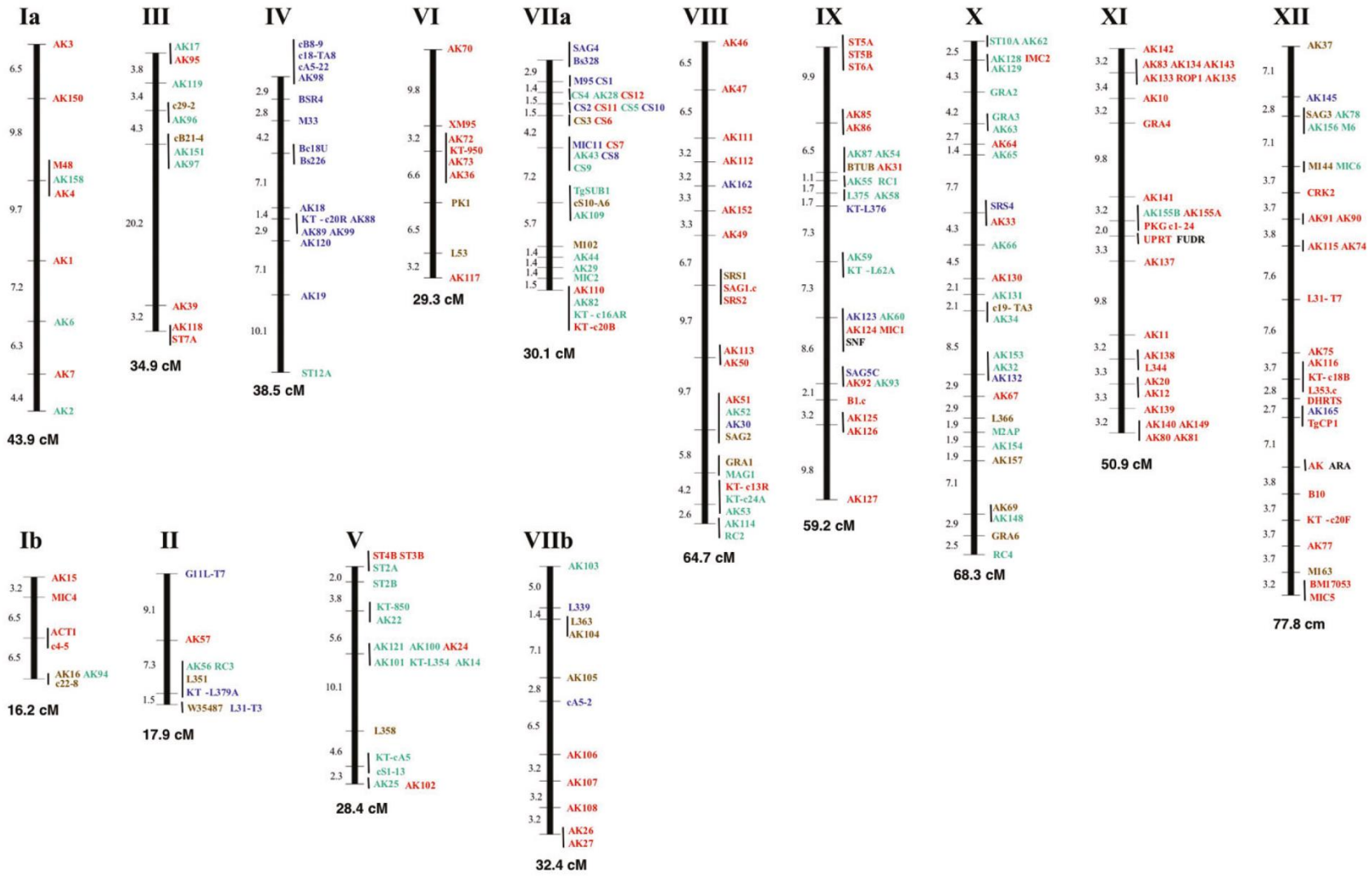


Fonte: Adaptado de BUSHKIN *et al.*, 2012.

2.2. GENÓTIPOS

O DNA do *T. gondii* é formado por 14 cromossomos, com marcadores espaçados em intervalos de 300 kb (kilobase). O tamanho genético total é de 592 cM (centiMorgan) distribuídos em 104 kb/cM de unidade de mapa, como ilustrado na figura 5 (KHAN *et al.*, 2005). É haploide e possui 7.793 genes (KHAN *et al.*, 2007).

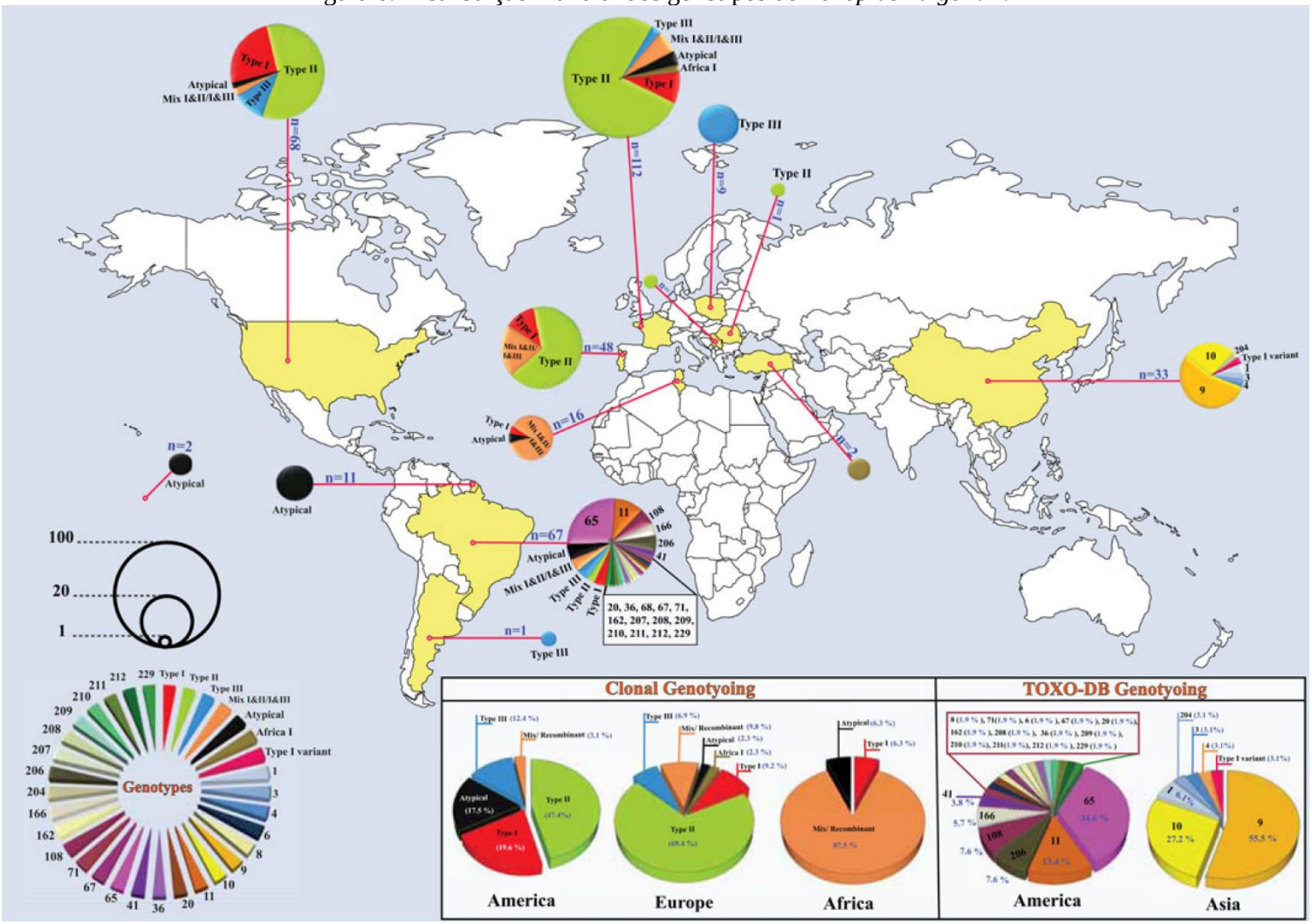
Figura 5: Mapa genético do *Toxoplasma gondii*, descrito por KHAN *et al*. (2005).



O desenvolvimento de diferentes métodos de marcadores genéticos permitiu a elucidação do genoma do *T. gondii*. No entanto, essas diferentes técnicas possuem diversas classificações, o que pode acarretar confusão (DARDÉ *et al.*, 2014). Quando HOWE e SIBLEY (1995) descreveram o genoma do *T. gondii*, eles identificaram três genótipos clonais nomeados como tipos I, II e III. Esses genótipos foram isolados de mais de 100 amostras de animais e humanos, provenientes da América do Norte e Europa. Amostras de outras regiões geográficas revelaram uma alta frequência de genótipos não-arquétipos, demonstrando uma diversidade maior (SU *et al.*, 2006). Esses genótipos são denominados como "genótipo único" ou "atípico", e são mais encontrados na América do Sul (GALAL *et al.*, 2019).

HOSSEINI *et al.* (2019) fizeram um levantamento bibliográfico entre 1995 e agosto de 2017 de genótipos em humanos de *T. gondii*. Foram selecionados 26 artigos após cuidadosa triagem. A caracterização genética de isolados de *T. gondii* mostrou que o tipo II foi o genótipo predominante em humanos, com prevalência entre 64,3%, 62,1% e 41,7% em pacientes com AIDS, toxoplasmose congênita e ocular, respectivamente. Na genotipagem do ToxoDB, a maioria dos indivíduos (21,2%) foi infectada pelos genótipos nº 9 e nº 65. Com base nesses resultados, o perfil genotípico dos isolados de *T. gondii* é diferente em todo o mundo. As cepas nos países asiáticos e africanos são caracterizadas por baixa diversidade genética, enquanto a América do Norte e do Sul apresentam maior diversidade. Em países onde não foram encontrados dados, como África Ocidental e Austral, Austrália e Ásia Ocidental, podem ser descobertas maior diversidade genética (figura 6).

Figura 6: Distribuição mundial dos genótipos do *Toxoplasma gondii*.



Fonte: HOUSSEINI *et al.*, 2019.

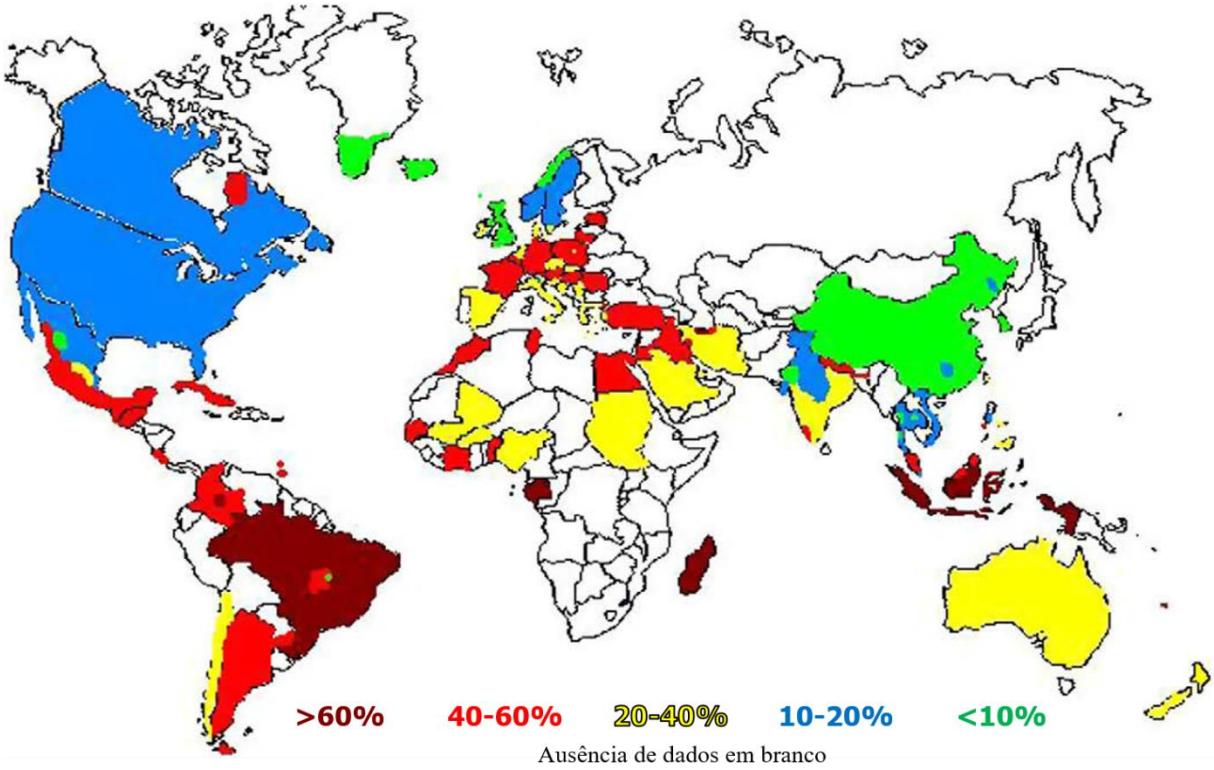
2.3. EPIDEMIOLOGIA E SURTOS

2.3.1. Soroprevalência de toxoplasmose em humanos

Mundialmente a soroprevalência de toxoplasmose é estimada principalmente por pesquisas de infecção congênita e por alimentos. Cerca de 30% da população está contaminada, podendo a exposição ao parasito variar de 0% a 100% (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2017). Como já citado, a prevalência varia entre os países e as subpopulações devido a hábitos alimentares, situação socioeconômica, qualidade da água, condições sanitárias (FLEGR *et al.*, 2014; ROBERT-GANGNEUX, 2014). São importantes também hábitos culturais, religiosos, presença de felinos e fatores ambientais (DABRITZ e CONRAD, 2010).

Pesquisadores têm relatado a soroprevalência de toxoplasmose revelando a importância de sua vigilância. PAPAS *et al.* (2009), fizeram um levantamento bibliográfico onde analisaram a soroprevalência do *T. gondii* e suas correlações com fatores de risco, ambientais e socioeconômicos. A partir dos dados analisados confeccionaram um mapa mundial de soroprevalência (figura 7).

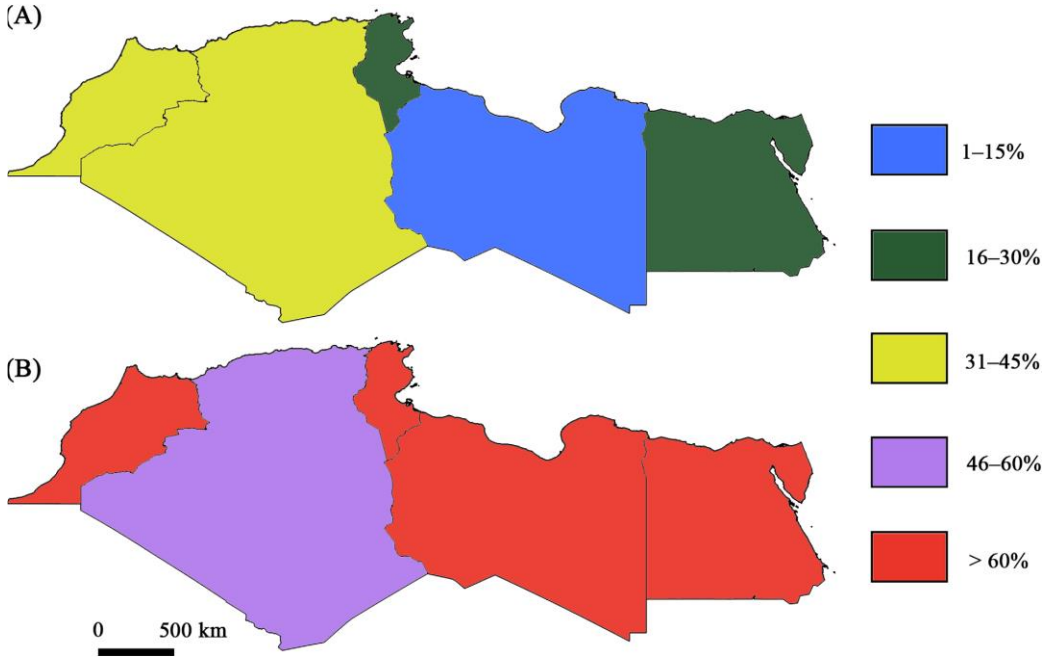
Figura 7: Mapa mundial de soroprevalência de *Toxoplasma gondii*, segundo PAPAS *et al*., 2009.



Fonte: Adaptado de PAPAS *et al*., 2009.

Em trabalho realizado por LITO *et al.* (2013), foram relatadas prevalências entre 11% e 40% em adultos dos EUA e do Reino Unido. No entanto, em outros países os índices variaram entre 11% e 28% na Escandinávia e 25,7% em Portugal. Segundo PAPAS *et al.* (2009) prevalências acima de 60% podem ser observadas no Brasil. Em extensivo trabalho realizado por ROUATBI *et al.* (2019), foram coletados dados de publicações que se referiam à presença de *T. gondii* no Norte da África (Marrocos, Algéria, Tunísia, Líbia e Egito). Os dados relacionados a prevalência humana estão ilustrados na figura 8. Nota-se que que as infeções variaram entre 1% e mais de 60%. Os autores destacam que, entre 1960 e 1970, não foram registradas pesquisas sobre toxoplasmose. Entretanto, devido ao reconhecimento da doença como problema de saúde pública, entre os anos de 2000 e 2018 ocorreu um aumento de publicações. Outros fatores apontados pela revisão foram a diversidade das amostras realizadas em humanos e a presença dos genótipos II e III. Os países Marrocos, Tunísia e Argélia planejam estabelecer um programa nacional contra a toxoplasmose, baseados na experiência francesa. A França relatou uma diminuição na prevalência e gravidade da toxoplasmose após a implementação de triagem gestacional obrigatória, com triagem padronizada e protocolos de tratamento, além da conscientização pública.

Figura 8: Panorama da soroprevelência de *Toxoplasma gondii* em humanos em países no Norte da África, compilado por ROUATBI *et al*., 2019.



A: Taxas mínimas de infecção
B: Taxas máximas de infecção

Fonte: Adaptado de ROUATBI *et al*., 2019.

Na Malásia, entre 2008-2018, foram relatadas prevalências de 59,7% na população da Ilha de Pangkor, 57,4% entre os trabalhadores migrantes e 42,5% em gestantes (WANA *et al*., 2020).

Na Europa e nos EUA as melhorias higiênicas na pecuária podem ter contribuído com a diminuição nos índices de soroprevalência (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2017).

2.3.2. Surtos de veiculação hídrica

Com a elucidação do ciclo biológico, foi possível relacionar alguns surtos de toxoplasmose à veiculação hídrica.

O primeiro relato publicado por BENENSON *et al.* (1982) ocorreu no Panamá, em 1979. Foram infectados 39 soldados do Exército dos Estados Unidos que consumiram água de três nascentes contaminadas.

Em 1995, ocorreu em Greater Victoria (British Columbia), Canadá, um surto que atingiu 100 pessoas. As idades dos infectados variava entre 6 e 83 anos; os sintomas relatados, como retinite e linfoadenopatia, eram condizentes com sintomas de toxoplasmose. Após investigação realizada pelos pesquisadores, constatou-se que o reservatório municipal estava contaminado. Evidenciou-se que a presença de felinos domésticos e selvagens, aplicação de produtos químicos ineficientes para desinfecção primária e condições precárias no sistema de filtração contribuíram para disseminação do *T. gondii* (BOWIE *et al.*, 1997).

No Brasil, o primeiro surto relatado de toxoplasmose ocorreu em 1965 em um seminário em Bragança Paulista, São Paulo (SP). Na época, 30 pessoas foram infectadas, não apresentando sintomas da doença e nove apresentaram os sintomas (MAGALDI *et al.*, 1967). No ano seguinte, foram relatados 99 casos em uma universidade em São José dos Campos (SP), entre estudantes e funcionários (MAGALDI *et al.*, 1969). Em ambos os casos não foi possível determinar a fonte de contaminação pois o ciclo de vida do *T. gondii* ainda não havia sido elucidado.

GATTÁS *et al.* (2000) investigaram um surto ocorrido em 1999 em uma universidade de São Paulo, onde 113 pessoas foram acometidas. Foram observados mais de 200 gatos vagando pela universidade, sendo a contaminação associada a água e alimento. Notou-se ainda que após o tratamento da água por filtros de 2µm e controle da população de gatos, não foram relatados novos casos (apud DUBEY *et al.*, 2012).

O primeiro surto de destaque de toxoplasmose ocorreu entre o final de 2001 e o começo de 2002 em Santa Isabel do Ivaí, Paraná (PR). Após alguns casos sintomáticos, foram realizadas buscas ativas, campanhas na mídia e relatos de médicos onde 2884 pessoas se voluntariaram para serem testadas. Dessas, 426 apresentaram IgM positivo e anticorpos IgG para *T. gondii*. Testes oftalmológicos foram realizados em 408 pacientes e 10% apresentaram lesões oculares, enquanto 4,4% tiveram necrose na retina. Um inquérito ambiental foi realizado com intuito de determinar a fonte de contaminação. Depois de mapear o sistema de abastecimento de água da cidade, verificou-se que um dos dois reservatórios estava ligado ao surto. Os pesquisadores conseguiram identificar quatro escolas que tinham água distribuída pelo reservatório suspeito durante o pico do surto. *T. gondii* foi isolado em três amostras, e após *nested*-PCR foi identificado como SAG-2, genótipo I. Concluiu-se que a manutenção precária do reservatório levou à contaminação da água. Atrelado a esse fato foi constatado que uma gata com filhotes residia no topo do tanque. Embora não tenha sido possível testar, o sorvete feito com água do reservatório contaminado também foi associado ao surto (DE MOURA *et al.*, 2006)

Casos de contaminação de açaí foram relatados em 2011 por DUTRA *et al.* (2012) nos municípios de Ji-Paraná, Ouro Preto do Oeste e Jaru, Rondônia (RO). Amostras de água utilizada para o preparo da polpa da fruta foram positivos para *T. gondii*, em 2013, em Pontas das Pedras (PA), MORAIS *et al.* (2016) constataram 73 casos de toxoplasmose. Segundo os autores, o açaí foi fonte de contaminação. A fruta pode ter sido contaminada por oocistos durante a coleta, transporte ou preparo do suco.

Em Montes Claros de Goiás (GO), em junho de 2016, foram registrados os primeiros casos de surto. Dos 251 casos suspeitos, apenas 114 concordaram em participar da pesquisa. Após a realização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para IgG, IgM e teste de avidez, 71% (81/114) apresentaram anticorpos para *T. gondii*, enquanto 59,6% (68/114) apresentaram um perfil para infecção aguda. Os alimentos mais consumidos entre os doentes eram queijo caseiro, salame, salsicha, carne e leite cru. Com base nestes resultados foram testadas amostras de carne, queijo, água pública, água de irrigação de legumes, fertilizante e solo. Duas amostras de queijo e uma amostra de água de irrigação estavam contaminadas. Segundo os autores, esses achados sugerem que o alimento e o alimento irrigado com água contaminada foram a principal via de infecção (DA COSTA *et al*, 2018).

MINUZZI *et al*. (2020b) demonstraram que água contaminada foi a fonte do maior surto relatado em Santa Maria (RS), com 2010 notificações, em abril de 2018. O último relatório apresentado pela prefeitura de 19 de outubro de 2018, mostrou que 809 casos foram confirmados, entre estes 114 estavam grávidas. Três mortes fetais, 10 abortos e 22 casos de toxoplasmose congênita foram registrados (RIO GRANDE DO SUL, 2018). A análise da placenta de duas grávidas que receberam tratamento contra toxoplasmose durante o surto, revelou a presença de um genótipo atípico, ainda não descrito na base de dados ToxoDB (MINUZZI *et al*., 2020a).

Em relatório divulgado em 15 de maio de 2019, pela Prefeitura de Campinas, foram confirmados 25 casos de toxoplasmose em um colégio. Foi realizado um inquérito epidemiológico (caso-controle) com intuito de determinar a fonte de contaminação. Foram avaliadas as seguintes vias de exposição: ingestão de água da rede da escola; sentar/deitar em gramado e/ou areia no colégio; ter contato com gatos na escola nos últimos 60 dias; fazer refeições nos restaurantes e/ou cantina da escola (desde o início do ano letivo e em qual restaurante); ingestão e carne crua e mal passada; ingestão de verduras, legumes e frutas crus minimamente processados. Após avaliação das informações obtidas, determinou-se que a infecção ocorreu devido à ingestão de alimentos contaminados por oocistos. Amostras de água foram coletadas em quatro pontos: ponto de captação, reservatório principal, bebedouro do refeitório e bebedouro do ginásio. Foram realizadas análises de cloração e potabilidade cujos resultados estavam dentro dos parâmetros previstos e exigidos pela Portaria de Consolidação nº 05/2017. O poço utilizado pelo colégio também estava com documentação e análises de qualidade de água conforme. Devido aos resultados do inquérito epidemiológico, que indicaram uma contaminação por alimentos, não foram realizadas análises de presença e ausência de oocistos e *T. gondii* nas amostras de água. No relatório é destacado as limitações das análises laboratoriais disponíveis, bem como sua baixa sensibilidade para detecção de oocisto (PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPINAS, 2019).

2.4. Detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em esgoto

Como citado anteriormente, não existem pesquisas de detecção de oocistos em água de reuso.

Algumas raras publicações abordam detecção em esgoto bruto e tratado.

Em 2010, MOULIN *et al.*, investigaram a contribuição do esgoto tratado na qualidade microbiológica do Rio Sena, França. Entre outros parâmetros, verificaram a presença de oocistos de *T. gondii* nos esgotos bruto e tratado. O sobrenadante restante da purificação de *Cryptosporidium* e *Giarda* foi analisado em microscopia de fluorescência e PCR. Para detecção molecular foi utilizado o segmento bp 529 (banco de genes AF146527). Não foram detectados oocistos nas amostras. Segundo os autores, os oocistos são liberados exclusivamente por felinos e dependem do comportamento de defecação destes. Deve ser levada em consideração a distribuição heterogênea dos oocistos em amostras ambientais. \Sendo assim, a concentração de oocistos no esgoto e no rio Sena foram muito baixas. Atrelado a esses fatos, é destacado que, embora tenha ocorrido melhorias, as técnicas de detecção de oocistos em amostras de água ainda é um desafio.

Na Alemanha, GALLAS-LINDERMANN *et al.* (2013), coletaram amostras de esgoto efluente e afluente, água superficial, água subterrânea e água de torneira para verificar a ocorrência de oocistos de *T. gondii*. A metodologia utilizada para identificação dos oocistos foi *Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)*, tendo o gene B1 como alvo. Das 95 amostras, oito amostras foram positivas (quatro do esgoto efluente e quatro afluente). Os autores destacam que, embora a água seja considerada um dos principais veículos de disseminação de oocistos, não há uma técnica eficiente de detecção e são poucos os relatos descrevendo essa via de transmissão.

MARANGI *et al.* (2015) utilizaram a técnica multiplex e *High Resolution Melting* (HRM) para detecção de (oo)cistos de *Crysptosporidium*, *Giardia* e *Toxoplasma gondii* em 119 amostras derivadas de quatro ETE's com diferentes tratamentos. Analisaram também 113 amostras de mexilhões provenientes da Turquia e Itália. O gene alvo selecionado foi o B1. Embora todas as amostras de esgoto tenham dado negativo, sete amostras de mexilhão foram positivas. A técnica multiplex e HRM pode ser empregada na investigação epidemiológica, no monitoramento e rastreamento de doenças causadas por alimentos e água. Mostrou-se também uma técnica mais acessível quando comparada com outras metodologias moleculares.

Em Hamburgo, Alemanha, AJONINA *et al.* (2018), verificaram a ocorrência de *Entamoeba histolytica* e *Toxoplasma gondii* em 16 amostras de esgoto bruto e nove de esgoto tratado. Para detecção de *T. gondii* foi utilizado o *nested*-PCR, tendo o gene B1 como alvo. Os resultados foram negativos para todas as amostras. Os autores discutem que por ter como hospedeiro definitivo os felinos, humanos e outros animais não liberam oocistos. Consideram ainda que quando a caixa de areia é limpa, os dejetos são descartados no lixo e não no esgoto.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar uma técnica de detecção e quantificação de oocisto de *Toxoplasma gondii* em amostras de água de reuso, da região metropolitana de São Paulo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar técnica de concentração e recuperação de oocistos em água de reuso;
- Avaliar técnica enzimática de extração de DNA em amostras de água de reuso;
- Aplicar técnica de choque térmico para extração de DNA em amostras de água de reuso;
- Padronizar técnica molecular de quantificação de *Toxoplasma gondii* em amostras de água de reuso utilizando método de qPCR.

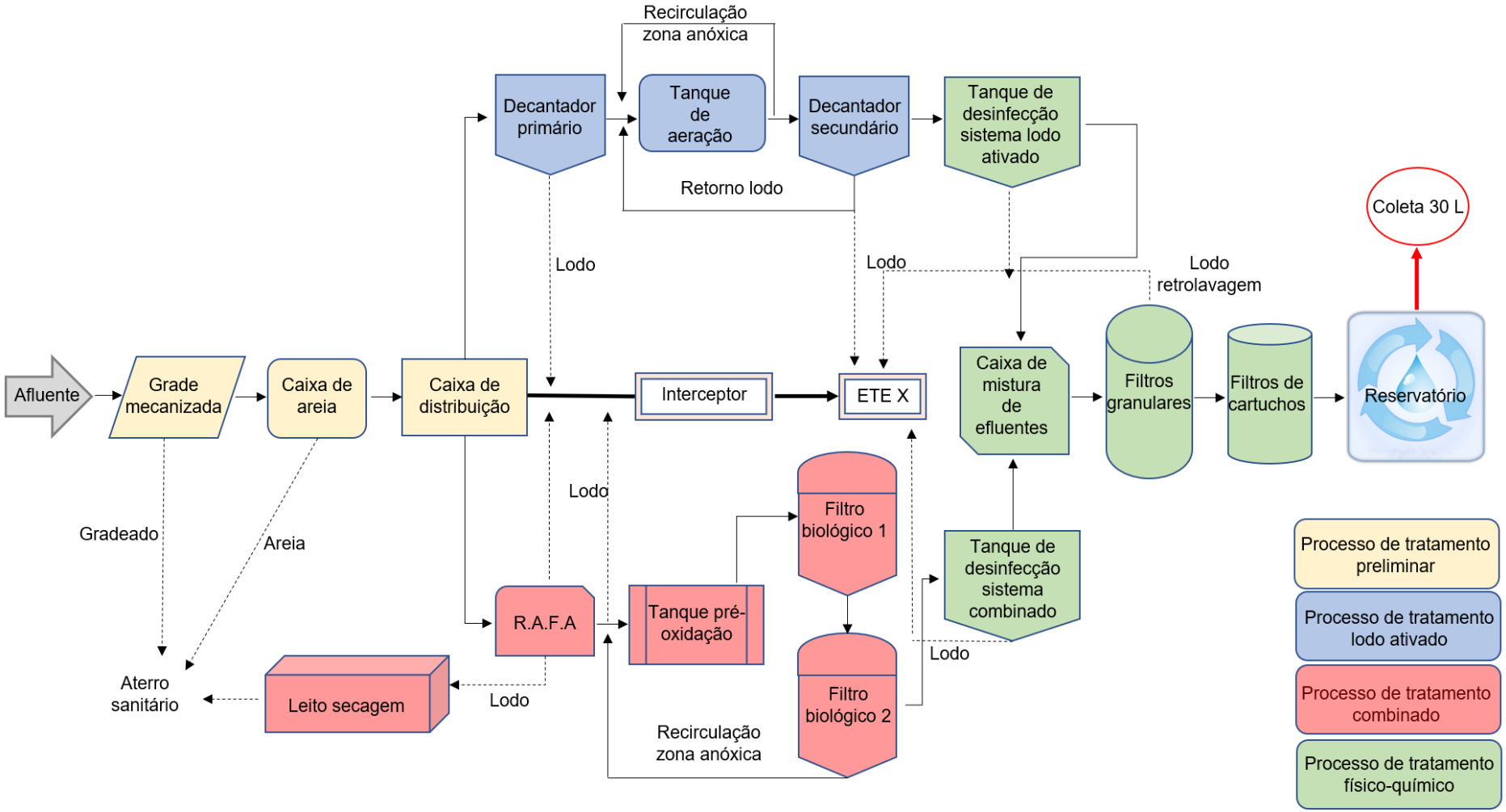
4. MÉTODO

4.1. LOCAL DA AMOSTRAGEM

As coletas foram realizadas em duas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE's A e B), na região metropolitana de São Paulo, que produzem água de reuso.

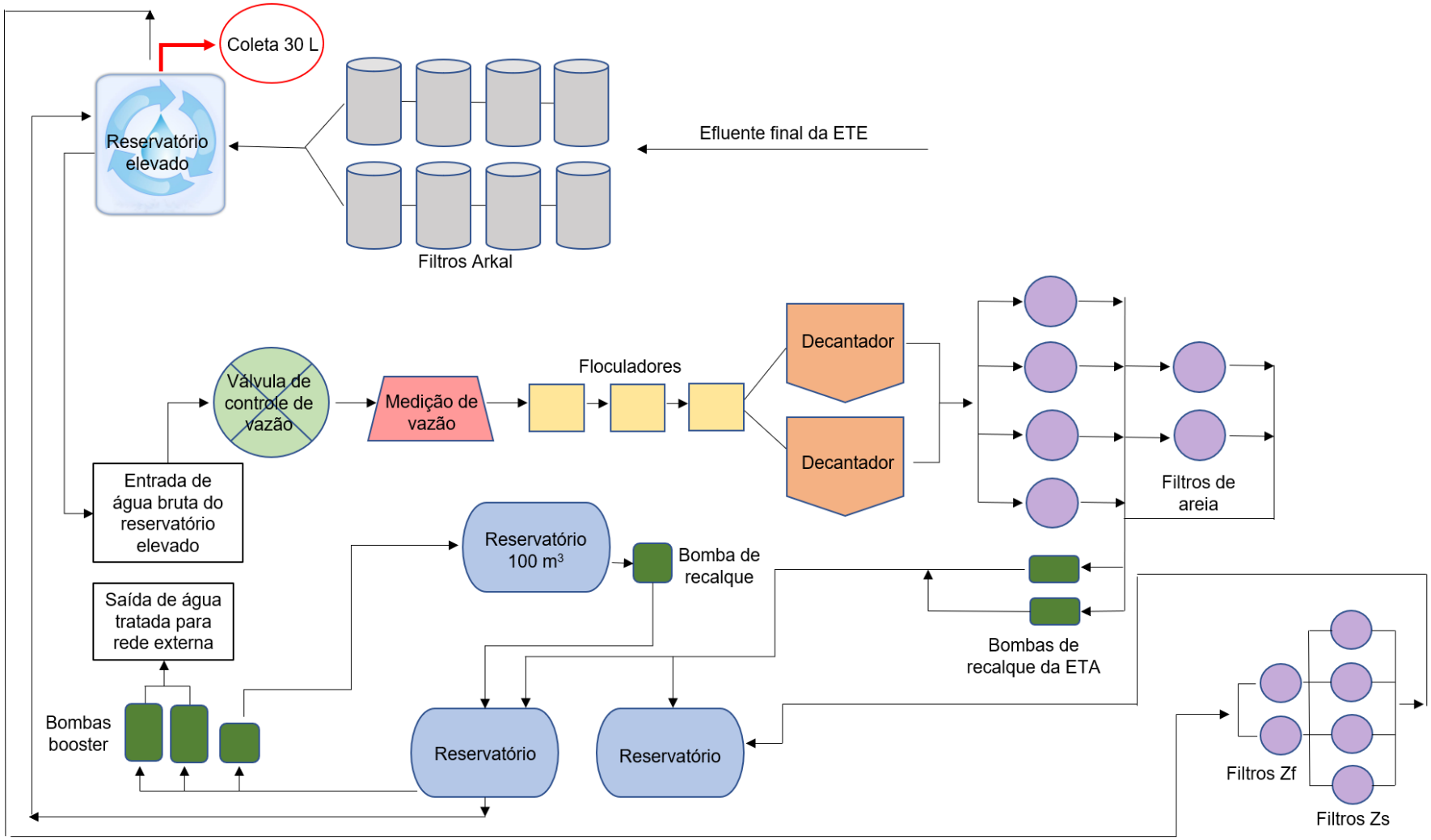
A ETE A, produz 45 L/s de água de reuso e o processo de produção está descrito na figura 9. O tratamento desta ETE consiste em processo de lodos ativados e de RAFA (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente). Os esgotos tratados por ambos os processos são submetidos à desinfecção por cloro e transferidos para uma caixa de mistura de efluentes. Essa mistura passa por dois processos de filtração – granular e por cartuchos. Em seguida, a água já tratada e desinfectada é então armazenada em reservatório para utilização. O ponto de coleta para a análise de quantificação de oocistos de *T. gondii* ocorreu na saída do reservatório.

Figura 9: Processo de tratamento de esgotos e produção de água de reuso da ETE A e ponto de coleta.



A ETE B produz 37 L/s de água de reuso. O processo de tratamento de esgotos é realizada pelo processo de lodos ativados e o volume médio diário de esgoto tratado é de 2,5 m^3/s. Consiste de tratamento secundário e tratamento terciário com coagulação utilizando policloreto de alumínio seguido de floculação e sedimentação, filtração em areia-antracito e zeólita (20µm) e desinfecção com hipoclorito de sódio (30 minutos, com 2 a 10 ppm de cloro residual total). O esgoto tratado passa, então, por sistemas de filtros de discos – Filtro Arkal - para a remoção de partículas em suspensão da água na faixa usual entre 20 a 400 µm. A água já tratada e pronta para reuso é armazenada em reservatório. O ponto de coleta para a análise de quantificação de oocistos de *T.gondii* foi na saída do reservatório. O processo de sua produção e o ponto de coleta estão detalhados na figura 10.

Figura 10: Processo de tratamento de esgotos e produção de água de reuso da ETE B e ponto de coleta.



4.2. AMOSTRA E AMOSTRAGEM

As amostras foram coletadas, quinzenalmente, de maio de 2016 a setembro de 2016, totalizando 20 amostras.

4.3. COLETA, PRESERVAÇÃO E TRANSPORTE

As coletas foram realizadas segundo o método analítico da *Environmental Protection Agency* (EPA – Método 1693/2014).

Foram coletados 30L de amostra em três frascos de polipropileno com capacidade de 10L, limpos e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121º C. As amostras foram identificadas por número, local, data e hora da coleta.

Os frascos contendo as amostras foram transportados para o Laboratório de Microbiologia Ambiental e Resistência a Antimicrobianos (MicroRes) da Faculdade de Saúde Pública/USP sob-refrigeração (4º C a 8º C) e foram analisadas dentro de um período máximo de 24 horas.

4.4. CONCENTRAÇÃO DE OOCISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII*

4.4.1. Método *USEPA 1693/2014*

Para a recuperação de oocistos de *T. gondii* foi empregado o Método 1693/EPA 2014 – *Method 1693: Cryptosporidium and Giardia in disinfected wastewater by concentration/IMS/IFA*. Assim como descrito por MOULIN *et al*. (2010) e MARQUES *et al.* (2020), o sobrenadante resultante da separação imunomagnética (tanto do tubo de *Leighton* quanto dos microtubos) foi utilizado para recuperação de oocistos de *T. gondii*.

A filtração e concentração foram realizadas em cápsulas *Envirocheck®HV*, em fluxo de dois litros por minuto. Com intuito de diminuir o impacto da turbidez da amostra e melhorar a recuperação de oocistos, foram adicionados 150 mL de solução dispersante de hexametafosfato de sódio (NaHMP). A amostra foi submetida à agitação de 900 rpm por cinco minutos. O NaHMP foi descartado e o filtro lavado com 150 mL de água destilada.

Para etapa de eluição, foram adicionados 150 mL de solução PBSTa (*Phosphate Buffered Saline with Tween – antifoam*), agitando o filtro a 900 rpm por cinco minutos. A amostra foi

recolhida em tubo cônico de 250 mL. Uma segunda eluição com 150 mL de PBSTa foi realizada, submetendo o filtro a duas agitações de maneira que a solução de eluição entrasse em contato com toda a superfície da membrana. A amostra foi recolhida em tubo cônico de 250 mL.

Os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado com pipeta, tomando cuidado para não comprometer o sedimento. O sedimento foi posteriormente ressuspendido em homogeneizador e transferido para um tubo cônico de 50 mL. Este foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente com pipeta. O sedimento foi homogeneizado e transferido para um tubo de *Leighton*.

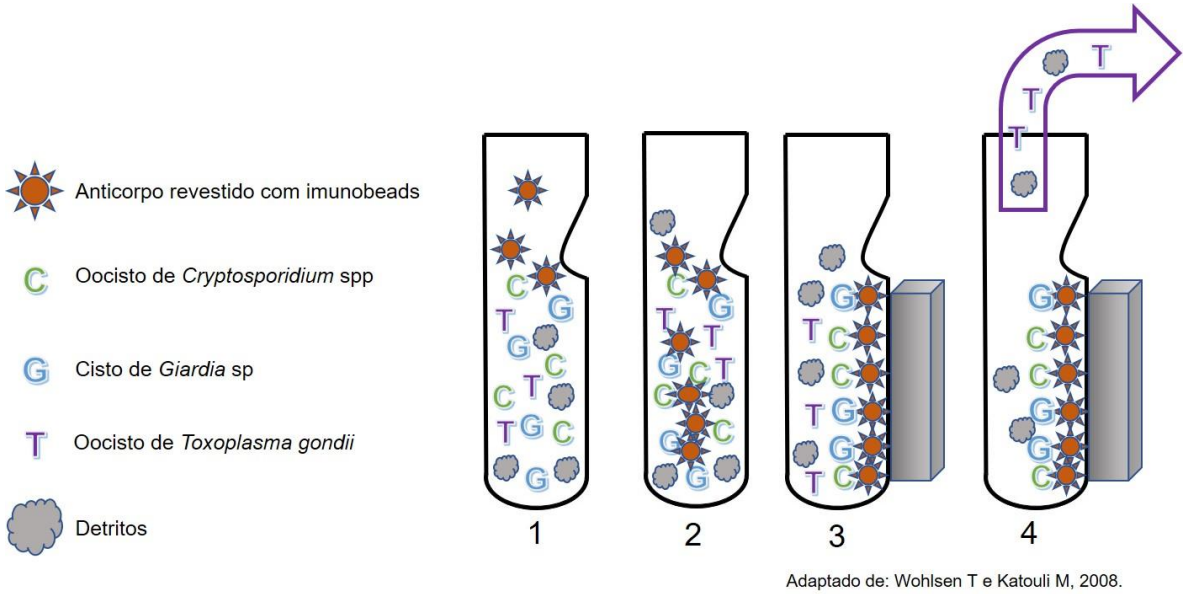
A amostra foi submetida à separação imunomagnética de (oo)cistos de *Cryotosporidium* e *Giardia*, contribuindo com a recuperação de possíveis oocistos.

Para isso, o tubo de *Leighton* foi transferido para o MPC-1, com o lado plano voltado para faixa magnética. Após homogeneizar suavemente por dois minutos, em uma inclinação de 90º o sobrenadante foi recolhido em um tubo cônico de 50 mL.

Essa etapa permite que os (oo)cistos de *Cryotosporidium* e *Giardia*, bem como inibidores sejam removidos do sobrenadante, restando os possíveis oocistos de *T. gondii*.

As etapas da separação imunomagnética estão representadas na figura 11.

Figura 11: Representação da separação imunomagnética de (oo)cistos de *Cryotosporidium* e *Giardia* e coleta do sobrenadante.



Separação imunomagnética: 1- Adição dos *imunobeads*; 2- Captura de (oo)cistos; 3- Separação magnética; 4- Coleta do sobrenadante.

O sedimento foi ressuspendido com mililitro de solução tampão SL-A 1X e transferido para um microtubo. Este foi acoplado ao MPC-M, com a faixa magnética e agitado a 180 º por um minuto. O sobrenadante foi recolhido com pipeta e transferido para o tubo cônico de 50 mL que já continha amostra, resultando em amostras de 15 mL.

Essas amostras foram armazenadas a -20º C para detecção e quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii*.

4.4.2. Concentração por membrana e raspagem

Os 15 mL obtidos do processo anterior de filtração foram concentrados em uma membrana de 0,45 µm. A membrana foi transferida para uma placa de Petri.

Para auxiliar na remoção da amostra, foram utilizados dois mililitros de PSBTa aquecido a 37°C. Foram efetuadas duas lavagens com um mililitro cada. O material contido na membrana foi raspado em movimentos lineares com uma alça bacteriológica de 10 µL. Com a ajuda de uma ponteira, a amostra foi recolhida e transferida para um tubo de dois mililitros.

A amostra foi submetida a centrifugação a 14.000 rpm por cinco minutos. Foram descartados 1.900 µL do sobrenadante, restando 100 µL da amostra.

Esta foi dividida em duas alíquotas de 50 µL para a extração de DNA para comparação de duas metodologias: enzimática e por choque térmico.

4.5. DETECÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII* POR qPCR

4.5.1. Extração de DNA

São propostas duas técnicas de extração de DNA do oocisto: kit comercial *DNeasy PowerSoil Kit*® otimizado com a enzima *Zymolyase*® e choque térmico.

4.5.1.1. *DNeasy PowerSoil Kit*® otimizado com a enzima *Zymolyase*®

O kit comercial *DNeasy PowerSoil Kit*® (MoBio, atualmente Qiagen) foi utilizado segundo recomendações do fabricante) e otimizado com a enzima *Zymolyase*® (2000 unidades – E1005). Foi empregado uma alíquota de 50 µL da amostra à qual foram adicionados 75 µL (375U) de enzima. Após homogeneizar o tubo rapidamente, a amostra foi incubada 24 horas em banho-maria a 37ºC.

No dia seguinte, a amostra foi transferida para o tubo *PowerBeads*®, que acompanha o kit. O tubo foi agitado no homogeneizador e 60µL da solução C1 foram adicionados. Durante 20 segundos o tubo foi homogeneizado por inversão. Este foi aquecido em banho-maria a 70°C por dez minutos.

Após esse período a amostra foi acoplada na plataforma horizontal do homogeneizador e agitada por dez minutos na velocidade máxima permitida para essa plataforma. Posteriormente a amostra foi centrifugada por 30 segundos a 10.000 g (RT).

O sobrenadante (500 µL) foi transferido para um novo tubo de coleta de dois mililitros. Foram adicionados 250 µL da solução C2 e, após agitar no homogeneizador por cinco segundos, a amostra foi incubada por 5 minutos a 4ºC. A amostra foi centrifugada por um minuto a 10.000 g.

Foram transferidos cerca de 600 µL para um novo tubo de dois mililitros. Foram adicionados 200 µL da solução C3. Após agitar no homogeneizador por cinco segundos a amostra foi incubada a 4ºC por 5 minutos. A amostra foi submetida a centrifugação por um minuto a 10.000 g.

Cerca de 750 µL do sobrenadante foram cuidadosamente transferidos para um novo tubo de dois mililitros. Foram adicionados 1200 µL de solução C4 e a amostra foi agitada no homogeneizador por cinco segundos.

As colunas de purificação foram montadas e 675 µL da amostra foram adicionados à coluna, sendo centrifugado por um minuto a 10.000 g. Após descartar o filtrado do tubo o procedimento foi repetido até que toda amostra tivesse sido purificada.

Em seguida, 500 µL de solução C5 foram acrescentados à coluna de purificação. A amostra foi centrifugada por 30 segundos a 10.000 g. O filtrado foi descartado e a centrifugação repetida para que todo etanol (C5) fosse removido.

A coluna de purificação foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de dois mililitros e 100 µL de solução C6 foi despejada no centro da coluna. Após centrifugar a 10.000g (RT) por 60 segundos, a coluna de purificação foi descartada. O DNA obtido foi armazenado a -20ºC.

4.5.1.2. Choque térmico

Uma alíquota de 50 µL foi submetida a seis ciclos de congelamento (-80° C) e aquecimento (90 °C) de cinco minutos cada. Após a etapa de choque térmico, a amostra foi transferida para um tubo *PowerBeads*®. O tubo foi agitado no homogeneizador e 60µL da solução C1 foram adicionados, sendo homogeneizado durante 20 segundos por inversão. Este foi aquecido em banho-maria a 70°C por dez minutos.

Em seguida, a amostra foi acoplada na plataforma horizontal do homogeneizador e agitada por dez minutos na velocidade máxima permitida para essa plataforma. Posteriormente a amostra foi centrifugada por 30 segundos a 10.000g (RT).

O sobrenadante (500 µL) foi transferido para um novo microtubo de dois mililitros. Foram adicionados 250 µL da solução C2 e, após agitar no homogeneizador por cinco segundos, a amostra foi incubada por 5 minutos a 4ºC. A amostra foi centrifugada por um minuto a 10.000 g.

Cerca de 600 µL do sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo de dois mililitros. Foram adicionados 200 µL da solução C3 e após agitar no homogeneizador por

cinco segundos a amostra foi incubada a 4ºC por 5 minutos. Esta foi submetida a centrifugação por um minuto a 10.000 g.

Cerca de 750 µL do sobrenadante foram cuidadosamente transferidos para um novo tubo de dois mililitros. Foram adicionados 1200 µL de solução C4 e a amostra foi homogeneizada por cinco segundos.

Com as colunas de purificação montadas, 675 µL da amostra foram adicionados à coluna, sendo centrifugado por um minuto a 10.000 g. Após descartar o filtrado do tubo o procedimento foi repetido até que toda amostra tivesse sido purificada.

Em seguida, 500 µL de solução C5 foram acrescentados à coluna de purificação. A amostra foi centrifugada por 30 segundos a 10.000 g. O filtrado foi descartado e a centrifugação repetida para que todo etanol (C5) fosse removido.

A coluna de purificação foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de dois mililitros e 100 µL de solução C6 foi despejada no centro da coluna. Após centrifugação a 10.000g (RT) por 60 segundos, a coluna de purificação foi descartada. O DNA obtido foi armazenado a -20ºC.

4.5.2. Ensaio de PCR em Tempo Real (qPCR)

Para quantificação de oocistos de *T. gondii* por qPCR, foi selecionada uma sequência alvo descrita por Kompalic-Cristo *et al.* (2007). Essa sequência consiste em um fragmento de 65 pares de base do gene B1, repetido em 35 cópias do genoma do parasito. No quadro 1 estão descritos os iniciadores e respectivas sondas utilizadas.

Quadro 1: Iniciadores e sonda (qPCR)

Iniciadores e sonda	**Sequência**	**Localização no gene pb**
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

4.5.3. Curva Padrão

Para quantificação de oocistos de *T. gondii*, foi feita uma curva padrão utilizando um fragmento de 466 pb, sintetizado pela *Integrated DNA Technologies* (IDT, Lowa EUA) sob a forma de *gBlocks Gene Fragments*®, denominado B1 Partial (GALVANI *et al*., 2019).

O fragmento foi selecionado após ser realizado um alinhamento tipo BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) 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). A sequência de 466pb foi selecionada dentre os *hits* testados pois resultou em 100% de identidade com a sequência do produto da PCR esperado.

A sequência de 466 pb comercializada liofilizada, foi ressuspendida em tampão TE até concentração de 5ng/µL.

4.5.4. Condições de Amplificação da qPCR

Para amplificação do fragmento-alvo, reações de 20 µL foram utilizadas, sendo: 7,3 µL de água ultrapura MilliQ®; 10 µL de *TaqMan*®*Environmental Master Mix* 2.0 (*Applied Biosystem*®); 0,7 µL de solução iniciadores/sonda (*Applied Biosystem*®) (0,2 µM de cada iniciador e 0,3 µM de sonda TaqMan-MGB) e 2,0 µL de DNA extraído da amostra. As

amostras foram amplificadas em triplicata. As condições da amplificação do fragmento pela qPCR estão descritas no quadro a seguir.

Quadro 2 - Condições de amplificação do DNA de *Toxoplasma gondii* pela qPCR

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

Fonte: KOMPALIC-CRISTO *et al.*, 2007

Para obtenção dos dados de amplificação foi utilizado o equipamento *StepOnePlus™ - Real Time PCR System* (*Applied Biosystem®*). Controles negativos (*Non Template Controls* – NTC) e positivos (oocistos de *T. gondii*) foram incluídos em todas as reações, 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 triplicata em cada reação, sendo realizado o mesmo procedimento para avaliar a eficiência da curva padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante do cenário de escassez hídrica atrelada ao estresse hídrico, a utilização da água de reuso é imprescindível. Entretanto, a ausência de um protocolo padronizado para detecção e quantificação de oocistos de *Toxoplasma gondii* compromete a proposta de uma legislação que contemple parâmetros parasitológicos. Sendo assim, o emprego da água de reuso pode ser comprometido diante de possíveis danos à saúde humana.

Embora não haja uma legislação federal sobre o assunto, alguns governos estaduais e municipais, entre estes o Governo do Estado de São Paulo e o município de São Paulo, desenvolveram resoluções e leis com o intuito de suprir essa demanda. Enquanto a lei do município de São Paulo estabelece regras e medidas para o fomento do reuso, a resolução do Estado de São Paulo é mais abrangente, incluindo padrões de qualidade e monitoramento.

Ainda que ação do Estado de São Paulo seja um avanço para estimular o reuso de água de maneira segura, a resolução estabelece o monitoramento apenas dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*. Essa mesma resolução destaca que diante de desenvolvimento científico e tecnológico, os critérios técnicos poderão ser reformulados.

Ao analisar o panorama mundial, é possível verificar que a infecção por *Toxoplasma gondii* via veiculação hídrica tem se destacado. Entretanto, ainda não foi possível implementar um protocolo padronizado para detecção de oocisto de *T. gondii* em amostras ambientais. As principais barreiras enfrentadas pelas equipes de pesquisadores que se dedicam ao desenvolvimento do protocolo são: pouco conhecimento sobre o oocisto, a baixa concentração no ambiente, sedimentos nas amostras e a semelhança morfológica com outros protozoários dificultando a identificação sob microscopia.

A presente pesquisa teve por objetivo contribuir com a evolução de um protocolo padronizado propondo técnicas de concentração, recuperação, detecção e quantificação de oocisto de *Toxoplasma gondii* em amostras de água de reuso.

Até o último levantamento bibliográfico realizado em julho de 2020, não foram encontradas pesquisas em água de reuso. Portanto, foram utilizados como referência artigos onde as amostras eram provenientes de água superficial, água tratada (ISAAC-RENTON *et al.*, 1998; DUMÈTRE e DARDÉ, 2003; KOURENTI *et al.*, 2003; VILLENA *et al.*, 2004; KOURENTI e KARANIS, 2004; DUMÈTRE e DARDÉ, 2005; KOURENTI e KARANIS, 2006; DUMÈTRE e DARDÉ, 2007; SOTIRIADOU e KARANIS, 2008; AUBERT, 2009; BORCHARDT *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009; SHAPIRO *et al.*, 2010; JONES e DUBEY, 2010; GALLAS-LINDEMANN *et al.*, 2013; KARANIS *et al.*, 2013; SHAPIRO *et al.*, 2014; WELLS *et al.*, 2015; HARITO *et al.*, 2017; GALVANI *et al.*, 2019), esgoto bruto e esgoto tratado (MOULIN *et al*., 2010; GALLAS-LINDERMANN *et al*., 2013; MARANGI *et al*., 2015; AJONINA *et al*., 2018). Trabalhos que descrevem as características do oocisto foram essenciais para a proposta da técnica de lise para extração do DNA (DUMÈTRE *et al*., 2012; DUMÈTRE *et al*., 2013; BUSHKIN *et al*., 2012; BUSHKIN *et al*., 2013). O conhecimento gerado por essas pesquisas foi essencial para o desenvolvimento de propostas de técnicas que visam acelerar a consolidação de um protocolo padronizado.

O primeiro desafio enfrentado foi o volume de amostra a ser coletado, bem como a concentração dessa amostra. A escolha do volume a ser coletado foi baseada na provável dispersão dos oocistos na água e em pesquisas que visam a recuperação de (oo)cistos de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp. em amostras hídricas (*USEPA*, 2014). Considerando que concentração de um volume maior de amostra aumenta a probabilidade de recuperação de oocisto, GALVANI *et al.* (2019) coletaram 20 L de amostra de água superficial. Como as

amostras analisadas nesta pesquisa eram provenientes do tratamento terciário de esgoto, foi proposta a coleta de 30 L de água de reuso.

Trabalhos que têm como objetivo a recuperação e concentração de oocisto de *T. gondii* em amostras ambientais vêm sendo desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa (ISAAC-RENTON *et al.*, 1998; DUMÈTRE e DARDÉ, 2003; KOURENTI *et al.*, 2003; VILLENA *et al.*, 2004; KOURENTI e KARANIS, 2004; DUMÈTRE e DARDÉ, 2005; KOURENTI e KARANIS, 2006; DUMÈTRE e DARDÉ, 2007; SOTIRIADOU e KARANIS, 2008; AUBERT, 2009; BORCHARDT *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009; SHAPIRO *et al.*, 2010; JONES e DUBEY, 2010; GALLAS-LINDEMANN *et al.*, 2013; KARANIS *et al.*, 2013; SHAPIRO *et al.*, 2014; WELLS *et al.*, 2015; HARITO *et al.*, 2017; GALVANI *et al.*, 2019). Tendo em vista o sucesso da recuperação de (oo)cisto de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em amostras hídricas por meio de filtração (*USEPA*, 2014) esse método foi considerado para a recuperação de oocistos de *T. gondii* a partir das amostras de água de reuso. Até o momento, não há um método padronizado de recuperação desses oocistos a partir do eluato resultante do filtro. A recuperação de oocisto de *T.gondii*, a partir do sobrenadante resultante da separação imunomagnética (IMS) de (oo)cistos de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp foi proposta por MOULIN *et al*. (2010). O emprego desse procedimento pode contribuir com a diminuição de inibidores da amostra. MARQUES *et al.* (2020) utilizaram também filtração e recuperação de oocistos no sobrenadante proveniente da etapa IMS de (o)ocistos de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Considerando que esse mesmo procedimento foi utilizado nesta pesquisa, esta proposta de recuperação de oocisto de *T. gondii* pode constituir-se em uma opção para futuros trabalhos. É importante destacar que procedimentos que visam a recuperação de oocisto por IMS estão sendo desenvolvidas. DUMÉTRE e DARDÉ (2005) propuseram o uso de dois anticorpos monoclonais (mAbs 3G4 e 4B6), testando captura direta e indireta. Após verificarem, por imunofluorescência, que o anticorpo mAb 3G4 reagiu com a parede externa tanto do oocisto esporulado e não-esporulado, este foi selecionado para a etapa de IMS. O mAb 4B6 foi dispensado pois reagiu apenas com a parede interna do oocisto esporulado, indicando que só reagiu ao oocisto com lacunas na parede. O método indireto apresentou melhor recuperação (69,4%) que o indireto (25,2%). Para a captura direta, *beads* foram revestidos com mAb 3G4, e incubados com amostras contendo oocisto de *T. gondii*. Na captura indireta o anticorpo foi incubado com o oocisto e a partículas magnéticas foram adicionadas para recuperação do complexo oocisto-3G4. A hipótese é que anticorpos livres, na captura indireta, se associaram facilmente ao oocisto, enquanto aqueles associados aos

beads tiveram maior dificuldade. Os pesquisadores ressaltam que essa metodologia é uma opção válida para recuperação de oocisto em amostras de água. No entanto, testes devem ser realizados a fim de validar a metodologia. HARITO *et al.* (2017) propuseram a recuperação e quantificação de oocisto através da separação por lecitina-magnética e qPCR. Embora a técnica tenha apresentado boa recuperação, ainda é um procedimento caro, não sendo aplicável para análises de monitoramento ambiental. Embora sua especificidade ainda esteja sendo estudada, a proteína rTgOWP1-f foi sugerida como opção de biomarcador para análise imunofluorescente por SOUSA *et al*. (2020), por serem encontradas nas paredes externas de oocisto esporulado ou não.

O volume do sobrenadante (15 mL) obtido foi reduzido para a extração de DNA. Considerando que tanto na centrifugação quanto na flotação podem ocorrer perdas de oocisto, foi proposta a concentração em membrana de 0,45µm.

Para qPCR foi selecionado como alvo o gene B1. Como no Brasil são descritos variados genótipos de *T. gondii* e o B1 é um gene conservado, a possibilidade de detecção de DNA nas amostras é ampliada. Além desse fator, estudos mostraram que esse gene apresenta boa sensibilidades na técnica aplicada.

No decorrer da pesquisa, ficou evidente que o maior desafio enfrentado para a detecção de oocisto era a extração de DNA. Como demonstrado por DUMÈTRE *et al*. (2012), DUMÈTRE *et al*. (2013), BUSHKIN *et al*. (2012) e BUSHKIN *et al*. (2013), a composição e estrutura das camadas que formam o oocisto são complexas, conferindo robustez ao oocisto. GALVANI *et al*. (2019) destacaram também que a extração é uma etapa essencial para detecção de oocisto em amostras hídricas, uma vez que somente a utilização do kit comercial *DNeasy PowerSoil Kit*® não se mostrou eficiente. Diante desse desafio e considerando a composição das camadas do oocisto de *T. gondii*, a presente pesquisa propôs dois protocolos de extração. O DNA extraído foi detectado e quantificado com a técnica de qPCR. Um dos métodos selecionado foi a técnica de choque-térmico (FAYER *et al*., 2002; FAYER *et al*., 2003; VILLENA *et al*., 2004; MILLER *et al*., 2005a; MILLER *et al*., 2005b; GIANGASPERO *et al*., 2005; MOLINI *et al*., 2007; ADELL *et al*., 2014; GIANGASPERO *et al*., 2014; WELLS *et al*., 2015; STAGGES *et al*., 2015; BIGO-CLIVOT *et al*., 2016) associado ao kit comercial *DNeasy PowerSoil Kit*®. Para extração enzimática, a *Zymolyase*® foi selecionada considerando a composição da parede interna, rica em β-glucano, associada ao

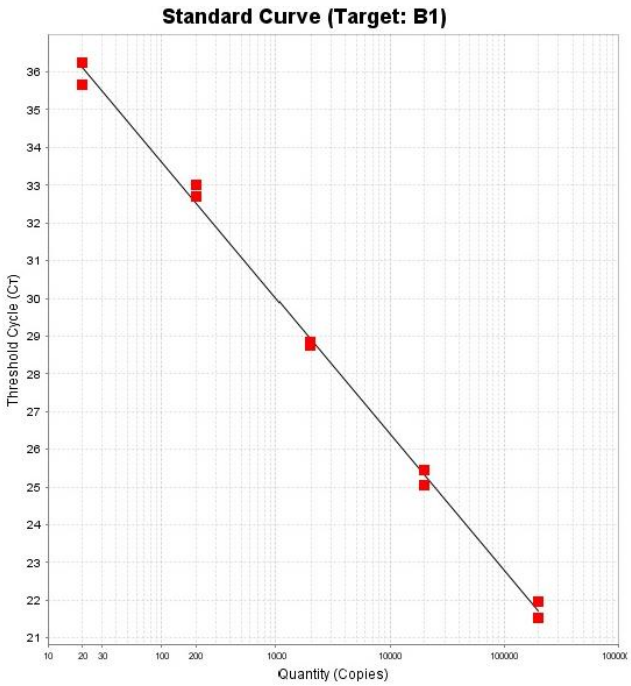
DNeasy PowerSoil Kit®. Para a técnica de choque-térmico foram avaliadas 20 amostras. Para o protocolo com enzima, foram analisadas 16 amostras, devido à disponibilidade da enzima.

O DNA purificado de ambas as técnicas não foi quantificado por fluorimetria pois, em testes realizados previamente, foi verificado que eram necessários volumes elevados para obter resultado. Assim, optou-se pela preservação da amostra para a realização do qPCR.

Para construção da curva-padrão do qPCR, seria utilizada uma suspensão de oocisto, submetida aos mesmos procedimentos de extração por choque-térmico e enzimático. Entretanto, a obtenção e padronização da suspensão de oocisto mostrou-se difícil e trabalhosa, além do perigo de exposição da equipe envolvida na pesquisa. SOKOL *et al*., (2020), destacam as dificuldades logísticas, custos e perigos de produzir e trabalhar com oocisto. Devido aos riscos inerentes à essa atividade, a instituição e equipe que desempenham essa atividade devem estar comprometidas com a biossegurança, saúde ocupacional, desenvolver os testes baseados em protocolos rigorosos, supervisão e documentação de todas as etapas, incluindo a segurança ambiental e bem-estar animal. Atrelada às dificuldades de obtenção de oocisto, os métodos usuais para o desenvolvimento da curva-padrão são demorados, dispendiosos, necessitam de habilidades específicas e pode ocorrer contaminação do laboratório (podendo acarretar mais despesas). Portanto, o uso de DNA sintético (*g-Block*) é uma opção segura, acessível, que fornece sensibilidade e confiabilidade. Outra vantagem é a exatidão do número de cópias obtidas nas diluições (CONTE *et al*., 2018). Tendo em vista esses desafios, GALVANI *et al*. (2019), utilizaram o DNA sintético para a construção da curva-padrão na detecção de oocisto de *T. gondii* em amostras de água superficial. O DNA sintético vem sendo empregado em pesquisas realizadas com vírus e tem sido considerado uma ferramenta útil para lidar com as limitações do modelo biológico (TOURINHO *et al*., 2015; LIMA *et al*., 2017; BANDEIRA *et al*., 2020). Tendo em vista os benefícios do emprego do DNA sintético, é importante que sejam realizados estudos para validação do mesmo para pesquisas com protozoários.

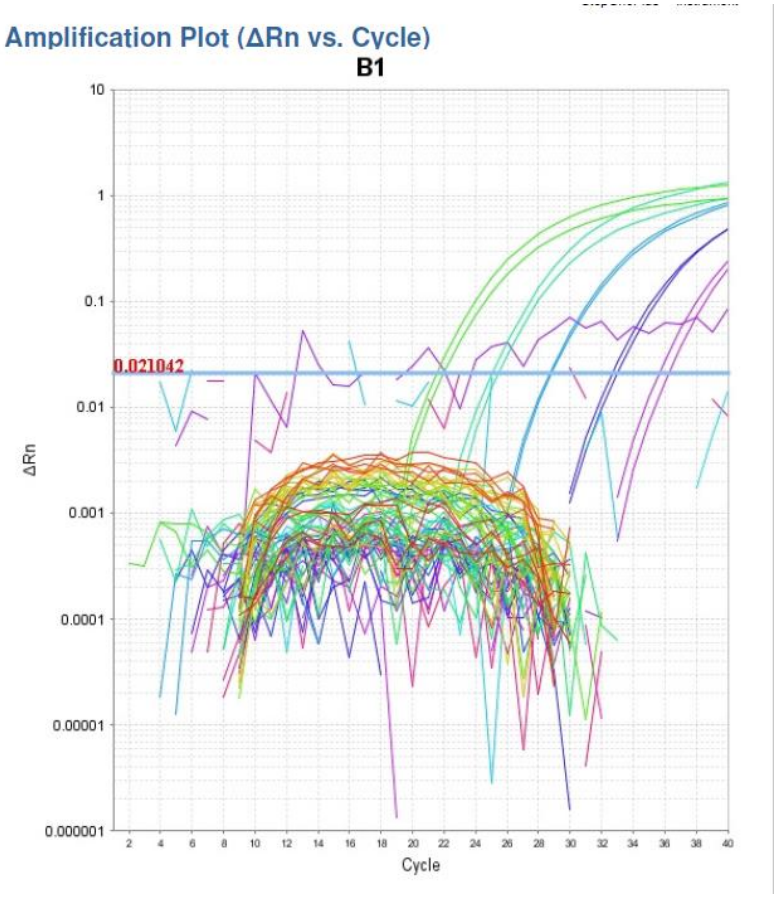
Nesta pesquisa, para o desenvolvimento da curva-padrão, foi realizada uma diluição seriada 1:10, onde foram selecionados nove pontos (10^7 a 10^1) para amplificação. Após a amplificação, cinco pontos formaram uma curva-padrão com eficiência 89,5%, R^2 = 0,997, Y = 40.794 e *Slope* -3,6 (figura12).

Figura 12: Curva-padrão desenvolvida a partir de diluição seriada de *g-Block*:



Ao analisar a amplificação das amostras de água de reuso submetidas a extração por choque-térmico não houve detecção de DNA de *T. gondii* (figura 13).

Figura 13: Representação da amplificação de amostras de água de reuso submetidas a extração por choque-térmico:



MANORE *et al*. (2019) compararam ciclos variados de choque-térmico para extração de DNA de oocistos de *Cryptosporidium parvum* e *Toxoplasma gondii* em amostras ambientais. Os autores demonstraram que ao submeter as amostras a diversos ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e aquecimento (água fervente) por cinco minutos, não melhorou a extração e detecção de DNA. Concluíram ainda que o aumento do número de ciclos pode ter resultado em diminuição da sensibilidade devido a degradação do DNA.

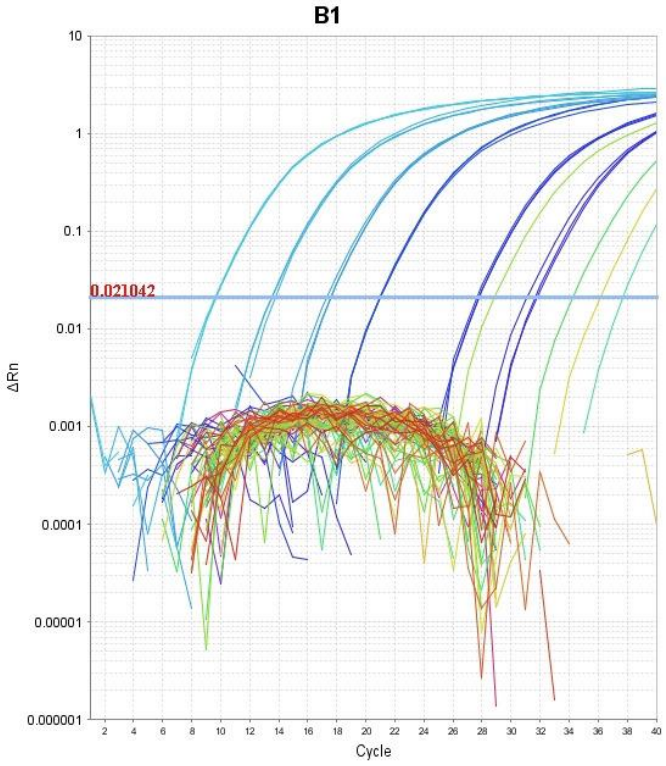
Das amostras provenientes da extração enzimática, quatro foram positivas, sendo uma acima do *threshold* de 0,021042. A tabela abaixo especifica as amostras positivas com respectivos Ct e número de cópias:

Tabela 2: Amostras de água de reuso positivas extraídas por enzima, Ct e número de cópias:

Amostra	Ct	Nº de cópias
37	36,21	10,59
54	28,90	1126,60
88	34,30	35,83
106	37,68	4.152

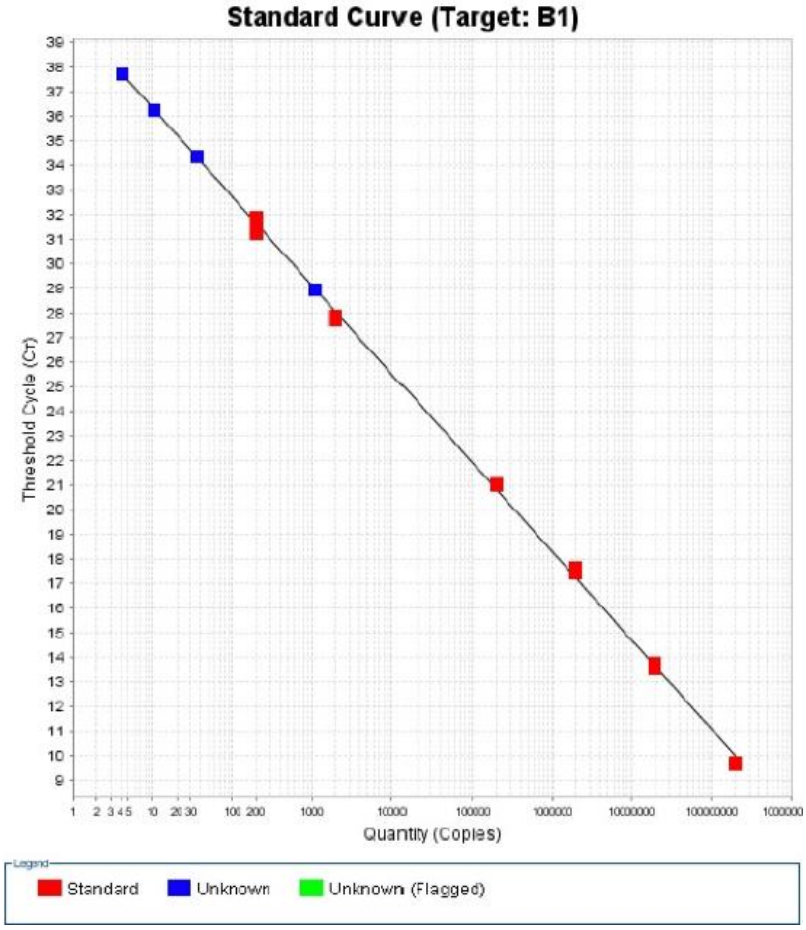
A figura 14 ilustra arepresentação gráfica da amplificação, com o *threshold* estabelecido.

Figura 14: Representação gráfica da amplificação de DNA de *Toxoplasma gondii*, provenientes de extração enzimática de amostras de água de reuso:



O número de cópias em relação ao Ct das amostras positivas de DNA de *T. gondii* estão representados pelos pontos azuis na curva-padrão abaixo (figura 15).

Figura 15: Amostras positivas representadas na curva-padrão para quantificação de DNA de *T. gondii* em amostras de água de reuso.



Ao analisar os resultados obtidos, foi verificado que a extração de DNA com enzima foi mais eficiente que o método de choque-térmico. Na extração com *DNeasy PowerSoil Kit*® otimizado com *Zymolyase*® foi detectado DNA em quatro amostras, sendo possível a quantificação em uma delas. Considerando a composição da parede interna do oocisto rica em β-glucan, é provável que a enzima (associada ao *kit* de extração) tenha lisado as paredes do oocisto. Entretanto, devido a composição das paredes dos esporozoítos ricas em tirosina (FREPPEL *et al*., 2019), a ação do *kit* de extração pode não ter sido suficiente para rompê-las.

A pesquisa desenvolvida visou contribuir com a proposta de um protocolo para detecção e quantificação de oocisto de *Toxoplasma gondii* em amostra de água de reuso. Ao progredir pelas etapas, da coleta até a quantificação, foi possível verificar que cada uma delas possui desafios inerentes às amostras ambientais, bem como a necessidade de compreensão da morfologia, comportamento e evolução do oocisto.

Embora a parte técnica seja uma ferramenta imprescindível para alcançar o objetivo de consolidar um protocolo, deve-se destacar que a perspectiva da saúde pública é fundamental para a prevenção da disseminação de oocisto de *T. gondii*, especialmente em amostras ambientais.

Como verificado pelo levantamento bibliográfico, a veiculação hídrica tem se mostrado relevante e de impacto significativo uma vez que infecções causadas por oocisto levam a respostas imunológicas mais severas (DUBEY, 2009), além da longa persistência e resistência desses no ambiente.

Entretanto, o cenário de escassez e estresse hídrico demandam ações importantes que preservem a água para uso nobre. O desenvolvimento sustentável da água como proposto na ODS 6, o guia de reuso da água desenvolvido pela ONU e o empenho de vários países para empregar a água de reuso de modo adequado demonstram o comprometimento da sociedade com a saúde humana e ambiental.

6. CONCLUSÃO

As conclusões provenientes da proposta de um protocolo para concentração, recuperação e quantificação de oocisto de *Toxoplasma gondii* em água de reuso foram:

- Este estudo é pioneiro na pesquisa de oocisto de *T. gondii* em água de reuso;
- Embora a filtração seja a melhor metodologia para concentração de oocisto em amostras hídricas, é preciso definir um volume apropriado para água de reuso;
- A recuperação de oocisto no sobrenadante proveniente da separação imunomagnética pode ser considerada uma opção satisfatória;
- A extração de DNA é o maior desafio para detecção e quantificação de oocisto;
- A extração enzimática foi mais eficiente quando comparada ao choque térmico;
- A quantificação de DNA de *T.gondii* em água de reuso pelo qPCR mostrou-se um método sensível, específico e rápido;
- O uso do g-Block pode ser uma alternativa segura e acessível para o ensaio do qPCR;
- Os dados gerados nesta pesquisa podem contribuir com futuras análises em água de reuso;
- O avanço do conhecimento científico relacionado ao oocisto de *T. gondii*, em água de reuso, fornece subsídios para os primeiros esboços de uma legislação visando a proteção da saúde humana e ambiental.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adell AD, Smith WA, Shapiro K, Melli A, Conrad PA. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in mussels (*Mytilus californianus*) and California Sea lions (*Zalophus californianus*) from Central California. Appl. Environ. Microbiol. 2014;80:7732–7740.
2. Ajonina C, Buzie C, Möller J, Otterpohl R. The detection of *Entamoeba histolytica* and *Toxoplasma gondii* in wastewater. Journal of Toxicology and Environmental Health. 2018; Part A, 81:1-3, 1-5.
3. Aubert D, Villena I. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne region, France. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009;104, 290-295.
4. Bahia-Oliveira, L., Gomez-Marin, J., and Shapiro, K. 2017. *Toxoplasma gondii*. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) Global Water Pathogens Project. http://www.waterpathogens.org (R. Fayer and W. Jakubowski, (eds) Part 3 Protists) http://www.waterpathogens.org/book/toxoplasma-gondii Michigan State University, E.Lansing, MI, UNESCO.
5. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. Water Res. 2011; 45(20):6603-14.
6. Bandeira LM, Puga MAM, de Paula VS *et al*. Use of synthetic oligonucleotides for determination of HTLV-1 proviral load by real-time PCR: a helpful alternative approach in the clinical management. Journal of Applied Microbiology. 2020;129:768-774.
7. Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM *et al*. Oocyst-Transmitted Toxoplasmosis Associated with Ingestion of Contaminated Water. 1982; 307:666-669.
8. Bigot-Clivot A, Ladeiro MP, Lepoutre A *et al*. Bioaccumulation of *Toxoplasma* and *Cryptosporidium* by the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*: Involvement
9. in biomonitoring surveys and trophic transfer. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2016;133:188–194.
10. Borchardt MA, Bertz PD, Ware MW, Dubey JP, Lindquist HAD. Concentrating *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* from surface water and drinking water by continuous separation channel centrifugation. Journal of Applied Microbiology. 2009;1-9.
11. Bowie WR, King AS, Werker DH *et al*. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The Lancet. 1997; 350:173-177.
12. Bushkin GG, Motari E, Carpentieri A, Dubey JP, Costello CE, Robbins PW, Samuelson J. Evidence for a structural role for acid-fast lipids in oocyst walls of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, and *Eimeria*. MBio. 2013;4: e00387-00313.
13. Bushkin GG, Motari E, Magnelli P, Gubbels M-J, Dubey JP, Miska KB, Bullitt E, Costello CE, Robbins PW, Samuelson J. β-1,3-glucan, which can be targeted by drugs, forms a trabecular scaffold in the oocyst walls of *Toxoplasma* and *Eimeria*. MBio. 2012; https://doi.org/10.1128/mBio.00258-12.
14. Camilo LM, Pereira-Chioccola VL, Gava R et al. Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in São Paulo. Brazil. Braz J Infect Dis. 2017;2 1(6):638–647.
15. Castro PDJ, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* – the facts. The Veterinary Nurse. 2019;10 (4):182-188.
16. Cidade de São Paulo. Lei Nº 16.174, de 22 de abril de 2015. Estabelece regramento e medidas para fomento ao reúso de água para aplicações não potáveis, oriundas do

polimento do efluente final do tratamento de esgoto, de recuperação de água de chuva, da drenagem de recintos subterrâneos e de rebaixamento de lençol freático. Diário Oficial da Cidade de 23/04/2015 , p. 1

17. da Costa MA. Surto de toxoplasmose humana em Montes Claros de Goiás em Goiás, Brasil. Disponível em: https://www.saude.go.gov.br/images/imagens_migradas/uploads/2016/10/surto-de-toxoplasmose-humana-em-montes-claros-de-goias-em-goias-brasil.pdf.
18. Conte J, Potoczniak MJ, Tobe SS. Using synthetic oligonucleotides as standards in probe-based qPCR. BioTechniques. 2018;64:177-179.
19. Dabritiz HA, Conrad PA. Cats and *Toxoplasma*: Implications for Public Health. Zoonoses Public Health. 2010; 57:34-52.
20. Dardé ML, Ajzenberg D, Su C. Molecular Epidemiology and Population Structure of *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexam – Perspectives and methods. Louis M Weiss, Kami Kim. Academic Press. 2014.
21. De Moura L, Bahia-Oliveira LMG, Wada MY, JonesJL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RMT, SilvaAJ, Moura I, Dubey JP, Garrett DO. Waterborne Toxoplasmosis, Brazil, from Field to Gene. Emerg Infect Dis. 2006; 12(2): 326–329.
22. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM *et al*. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. Parasitol. 2012;139:1375-1424.
23. Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. International Journal for Parasitology. 2009;39:877–882.
24. Dumètre A, Aubert D, Puech PH, Hohweyer J, Azas N, Villena I. Interaction Forces Drive the Environmental Transmission of Pathogenic Protozoa. Applied and Environmental Microbiology. 2012;905-912.
25. Dumètre A, Dardé ML. Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. Parasitol Res. 2007;101:989–996.
26. Dumètre A, Dardé ML. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples?.FEMS Microbiology Reviews. 2003;27(5):651-661.
27. Dumètre A, Dardé. Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. Journal of Microbiological Methods. 2005; 209-217.
28. Dumètre A, Dubey JP, Ferguson DJP, Bongrand J, Azas N, Puech PH. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. PNAS. 2013;110(28):11535–11540.
29. Dutra LH, Saad E, de Souza Alves RJ *et al.* Investigação de surto de toxoplasmose transmitido pelo consumo de açaí em Rondônia, Brasil, 2011. In: 12ª Expoepi : mostra nacional de experiências bem-sucedidas em epidemiologia, prevenção e controle de doenças : anais. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2012.
30. Fayer R, Trout JM, Lewis EJ *et al*. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. Parasitol. Res. 2002;88:998–1003.
31. Fayer R, Trout JM, Lewis EJ *et al*. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. Parasitol. Res. 2003;89:141-145.
32. Feinmann J. The BMJ Appeal Christmas 2019: With WaterAid's help, cleaner clinics offer safer healthcare. BMJ. 2020;368:7082.
33. Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH (2014) Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. PLoS ONE. 2014; 9(3):e90203.

34. Frenkel, JK, Dubey, JP, Miller, NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science. 1970;167:893-896.
35. Frenkel, JK. *Toxoplasma* in and around us. BioScience. 1973;23:343–352.
36. Freppel W, Ferguson DJP, Shapiro K *et al*. Structure, composition, and roles of the *Toxoplasma gondii* oocyst and sporocyst walls. The Cell Surface 5. 2019;100016.
37. Galal L, Hamidović A, Dardé ML, Mercier M. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. Food and Waterborne Parasitology. 2019; 12: e00052.
38. Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Mahmoodi, M.R., Karanis, P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Acta Trop. 2013;125, 231e236.
39. Galvani AT; Christ APG; Padula A; Barbosa MRF; De Araújo RS; Sato MIZ; Razzolini MTP. Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in surface water samplesin São Paulo, Brazil. Parasitology Research. 2019. https://doi.org/10.1007/s00436-018-6185-z.
40. Giangaspero A, Molini U, Iorio R, Traversa D *et al*. 2005. *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater clams (*Chamelea gallina*) in Italy. Prev. Vet. Med. 2005;69:203–212.
41. Giangaspero A, Papini R, Marangi M, Koehler AV, Gasser RB. 2014. *Cryptosporidium parvum* genotype IIa and *Giardia duodenalis* assemblage A in *Mytilus galloprovincialis* on sale at local food markets. Int. J. Food Microbiol. 2014;171:62–67.
42. Governo do Estado de São Paulo. Resolução Conjunta SES/SMA/SSRH Nº 01 de 28 de junho de 2017. Disciplina o reúso direto não potável de água, para fins urbanos, proveniente de Estações de Tratamento de Esgoto Sanitário e dá providências correlatas. Diário Oficial Estadual 29-06- 2017 SEÇÃO I PÁG 41/42.
43. Governo do Estado do Rio Grande do Sul/Centro Estadual de Vigilância em Saúde/Superintendência de Vigilância em Saúde, 2018. Relatório de Atualização de Investigação de Surto. Rio Grande do Sul, Brasil. https://www.cevs.rs.gov.br/inicial.
44. Hosseini SA, Amouei A, Sharif M, Sarvi Sh, Galal L, Javidnia J, Pagheh AS, Gholami S, Mizani A, Daryani A. Human toxoplasmosis: a systematic review for genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in clinical samples. Epidemiology and Infection. 2019;147, e36, 1–9.
45. Howe DK, Sibley LD. Toxoplasma gondii Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. The Journal of Infectious Diseases 1995; 172:1561-6.
46. Inagaki ADM, Cardoso NP, Lopes RJPL, Alves JAB, Mesquita JRF, de Araújo KCGM, Katagri, S . Análise espacial da prevalência de toxoplasmose em gestantes de Aracaju, Sergipe, Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2014;36(12):535-540.
47. Instituto Trata Brasil (ITB). www.painelsaneamento.org.br. [Acesso em 06 de maio de 2019].
48. Isaac-Renton J, Bowie WR, King A, Irwin S et al. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in Drinking Water. Applied and Environmental Microbiology. 1998; 2278–2280
49. Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41(3):634-44.
50. Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis-recent developments. Exp Parasitol. 2010;124(1):10-25.

51. Karanis P, Aldeyarbi HM, Mirhashemi ME, Khalil KM. The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: An overview and update. Environ Sci Pollut Res Int. 2013;20(1):86–99.
52. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J Water Health. 2007;5(1): 1-38.
53. Kellis M, Kalavrouziotiz IK, Gikas P. Review of wastewater reuse in the Mediterranean countries focusinh on regulations and policies for municipal and industrial applications. Global NEST Journal. 2013; 3(15):333-350.
54. Khan A, Fux B, Su c, Dubey JP, Dardé ML, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. PNAS. 2007;104(37):14872-14877.
55. Khan A, Taylor S, SU C, Mackey AJ, et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. Nucleic Acids Research. 2005;33(9):2980–2992.
56. Kim K. Bradyzoite is a bradyzoite is a bradyzoite?. Trends in Parasitology. 2015;31:610-612.
57. Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suárez-Mutis M, Fernandes O, Britto C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. Parasitol Res. 2007;101(3):619–625.
58. Kourenti C, Karanis P. Development of a sensitive polymerase chain reaction method for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. Water Sci Technol. 2004;50(1):287-29.
59. Kourenti C, Karanis, P. Evaluation and applicability of a purification method coupled with nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. Lett Appl Microbiol. 2006;43(5):475–481.
60. Lima LRP, da Silva AP, Schmidt-Chanasit J, de Paula VS. Diagnosis of human herpes vírus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2): use of a synthetic standard curve for absolute quantification by real time polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017;112:220-223.
61. Lito D, Francisco T, Salva I, Tavares M, Oliveira R, Neto MT. TORCH serology and group B *Streptococcus* screening analysis in the population of a maternity. Acta Med Port. 2013; 26:549-554.
62. Magaldi C, Elkis H, Pattoli D et al. Surto de toxoplasmose em um seminário de Bragança Paulista (Estado de São Paulo). Aspectos clínicos, sorológicos e epidemiológicos. Revista de Saúde Pública. 1967; 1:141-171.
63. Magaldi C, Elkis H, Pattoli D, Coscina AL. Epidemic of toxoplasmosis at a University in São-José-dos-Campos, S.P. – Brazil. Ver. Lat-amer Microbiol. 1969; 11:5-13.
64. Marangi M; Giangaspero A; Lacasella V; Lonigro A; Gasser RB. Multiplex PCR for the detection and quantification of zoonotic taxa of *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* in wastewater and mussels. Molecular and Cellular Probes. 2015;29:122-125.
65. Marques CS, Sousa S, Castro A, da Costa JMC. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in fresh vegetables and berry fruits. Parasites Vectors. 2020;13:180.
66. Manore AJW, Harper SL, Aguilar B et al. Comparison of freeze-thaw cycles for nucleic acid extraction and molecular detection of *Cryptosporidium parvum* and *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental matrices. Journal of Microbiological Methods. 2019;156:1-4.
67. Meirelles LR, Ekman CCJ, Andrade Jr HF, Luna EJA. Human toxoplasmosis outbreaks and the agent infecting form. Findings from a systematic review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57(5):369-376.

68. Miller WA, Atwill ER, Gardner IA *et al*. Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwaterecosystems in California. Int. J. Parasitol. 2005a;35:673–684.
69. Miller WA, Miller MA, Gardner IA *et al*. New genotypes and factors associated with *Cryptosporidium* detection in mussels (*Mytilus* spp.) along the California coast. Int. J. Parasitol. 2005b;35:1103–1113.
70. Minuzzi CE, Portella LP, Bräunig P, *et al*. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from placental tissues of pregnant women who received toxoplasmosis treatment during an outbreak in southern Brazil. PLoS One. 2020;15(1):e0228442. Published 2020 Jan 30.
71. Minuzzi, CE, Fernandes, DF, Portella, LP, et al. Contaminated water confirmed as source of infection by bioassay in an outbreak of toxoplasmosis in South Brazil. Transbound Emerg Dis. 2020; 00: 1– 6.
72. Mizyed N, Mays D. Reuse of treated wastewater: from technical innovation to legitimization. World Environmental and Water Resources Congress 2020. 2020;16-30.
73. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004; 363: 1965–76.
74. Morais RAPB, Freire ABC, Barbosa DRLB *et al*. Surto de toxoplasmose aguda no Município de Ponta de Pedras, Arquipélago do Marajó, Estado do Pará, Brasil: características clínicas, laboratoriais e epidemiológicas. Rev Pan-Amaz Saude. 2016; 7:143-152.
75. Morrissete, NS, Ajioka, JW. The early years of *Toxoplasma* research: What's past is prologue. International Journal for Parasitology. 2009; 39: 865–869.
76. Moulin L, Richard F, Stefania S, Goulet M, Gosselin S, Gonçalves A, Rocher V, Paffoni C, Dumètre A. Contribution of treated wastewater to the microbiological quality of Seine River in Paris. Water Research. 2010; 44:522-5231.
77. Nicolle C, Manceaux LH. On a leishman body infection (or related organisms) of the gondi. International Journal for Parasitology. 2009;39:863–864.
78. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. Int J Parasitol. 2009;39(12):1385-94.
79. Prefeitura Municipal de Campinas. Investigação de Surto de Toxoplasmose – Colégio Notre Dame – Atualização. 2019.
80. Robert-Gangneux F. It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis. J Infect. 2014; 68:S125eS133.
81. Rouatib M, Amairia S, Amdouini Y *et al*. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in North Africa: a review. Parasite. 2019; 26:1-20.
82. Schwab KJ, McDevitt JJ. Development of a PCR-enzyme immunoassay oligoprobe detection method for *Toxoplasma gondii* oocysts, incorporating PCR controls. Appl Environ Microbiol. 2003 Oct;69(10):5819-25.
83. Shapiro K, Bahia-Oliveira L, Dixon B, Dumètre A, de Wit LA, VanWormer E, Villena I. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: oocysts in water, soil and food. Food and Waternorne Parasitology. 2019; 15:e00049.
84. Shapiro K, Mazet JAK, Schriewer A, Wuerts S, Fritz H, Miller WA, Largier J, Conrad PA. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres in water using ultrafiltration and capsule filtration. Water Research 2010;(44): 893–903.
85. Shapiro K, VanWormer E, Aguilar B, Conrad PA. Surveillance for *Toxoplasma gondii* in California mussels (*Mytilus californianus*) reveals transmission of atypical genotypes from land to sea. Environ Microbiol. 2014;17(11):4177–4188.

86. Sokol. *Toxoplasma gondii*: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer Science+Business Media. 2020.
87. Sorup HJD, Brudler S, Godskesen B, Dong Y, Lerer SM, Rygaard M, Arnbjerg-Nielsen K. Urban water management: Can UN SDG 6 be met within the Planetary Boundaries?. Environmental Science & Policy. 2020; 106:36-39.
88. 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). Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2008;62, 357-365.
89. Sousa S, Almeida A, Delgado l, Conceição A, Marques C, da Costa JMC, Castro A. rTgOWP1-f, a specific biomarker for *Toxoplasma gondii* oocysts. Sci Rep. 2020; 10(1):7947.
90. Splendor A. A new protozoan parasite in rabbits. International Journal for Parasitology 2009;39:861–862.
91. Staggs SE, Keely SP, Ware MW *et al*. The development and implementation of a method using blue mussels (*Mytilus* spp.) as biosentinels of *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* contamination in marine aquatic environments. Parasitol. Res. 2015;114:4655–4667.
92. Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. International Journal for Parasitology. 2006; 36:841-848.
93. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International Journal for Parasitology 2000;30:1217-1258.
94. Torreta V, Katsoyiannis I, Collivignarelli MC, Bertanza G, Xanthopoulou M. Water reuse as a secure pathway to deal witj water scarcity. MATEC Web of Conferences 305, 00090. 2020.
95. Tourinho RS, de Almeida CR, Lemos AS *et al*. Application of synthetic standard curves for absolute quantification of hepatites A and E by real-time PCR. J Genet Genome Res. 2015;2:1.
96. Tu V, Yakubu R, Weiss LM. Observations on bradyzoite biology. Microbes and Infection 2018;20: 466-476
97. United Nations Environment Programme and Global Environment Centre Foundation (UNEP). Water and wastewater reuse. An environmentally sound approach for sustainable urban water management. Japan; 2005.
98. United Natios. https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/
99. VanWormer E, Fritz F, Shapiro K, Mazet JAK, Conrad PA. Molecules to modeling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human–animal–environment interface. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2013; 36(3): 217–231.
100. Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferté H, Inglard JC, Denis-Bisiaux H, Dondon JM, Pisano E, Ortis N, Pinon JM. Evaluation of a Strategy for *Toxoplasma gondii* Oocyst Detection in Water. Appl Environ Microbiol. 2004;70(7):4035-4039.
101. Wana NM, Mohd Moklas MA, Watanabe M, *et al*. A Review on the Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Humans and Animals Reported in Malaysia from 2008-2018. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(13):4809.
102. Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma gondii* - The model Apicomplexan: Perspectivs and Methods. 2 Edição. Waltham: Elsevier; 2014.
103. Wells B, Shaw H, Innocent G, Guido S, Hotchkiss E, Parigi M, Opsteegh M, Green J, Gillespie S, Innes EA, Katzer F. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in water samples from Scotland and a comparison between the 529bp real-time PCR and ITS1 nested PCR. Water Res. 2015;15(87):175-81.

104. WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). 2017. The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource. Paris, UNESCO.
105. Yang W, Lindquist HAD, Cama V, Schaefer III FW, Villegas E, Fayer R, Lewis EJ, Feng Y, Xiao L. Detection of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Water Sample Concentrates by Real-Time PCR. Applied and Environmental Microbiology, 2009;3477–3483.
106. Zhang Q, Prouty C, Zimmerman JB, Mihelcic JR. More than Target 6.3: A Systems Approach to Rethinking Sustainable Development Goals in a Resource-Scarce World. Engineering. 2016;2: 481–489.

ANEXOS

ANEXO I

CURRÍCULO LATTES VERIDIANA KARMANN BASTOS

Veridiana Karmann Bastos

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/2794241488592212
ID Lattes: **2794241488592212**
Última atualização do currículo em 13/08/2020

Doutorado em andamento em Saúde Pública, pela Faculdade de Saúde Pública/USP (2015-2020). Mestrado em Saúde Ambiental pela Faculdade de Saúde Pública/USP (2012). Especialização em Saúde Ambiental pela Faculdade de Saúde Pública/USP (2008). Graduação em Biologia pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (2005). Possui experiência em Parasitologia e Microbiologia. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Veridiana Karmann Bastos
Nome em citações bibliográficas	BASTOS, V. K.;Bastos, Veridiana Karmann;BASTOS, V.K.
Lattes iD	http://lattes.cnpq.br/2794241488592212

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2015	Doutorado em andamento em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP, Brasil. com **período sanduíche** em Aix-Marseille Université (Orientador: Aurélien Dumètre). Título: Toxoplasma gondii em amostras de água de reuso: proposta de método de detecção e quantificação por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)., Orientador: Maria Tereza Pepe Razzolini. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Toxoplasma. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Protozoologia de Parasitos / Especialidade: Protozoologia Parasitária Humana.
2010 - 2012	Mestrado em Saúde Ambiental. Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP, Brasil. Título: Detecção e quantificação de ovos viáveis de Ascaris sp e ovos de outros helmintos em lodo de esgoto,Ano de Obtenção: 2012. Orientador: Maria Tereza Pepe Razzolini. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Lodo; Agricultura; Ascaris sp. Grande área: Ciências Biológicas Setores de atividade: Água, esgoto, atividades de gestão de resíduos e descontaminação.
2007 - 2008	Especialização em Saúde Ambiental. (Carga Horária: 530h). Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP, Brasil. Título: Importância da microbiologia aquática na qualidade da água para consumo humano.. Orientador: Dr.Alejandro Jorge Dorado/ Dra. Solange Martone Rocha.
1998 - 2005	Graduação em Biologia. Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Brasil. Título: Prevalência de Enteroparasitos em crianças da Escola Estadual Professora Marina Cintra (Ensino Fundamental - Ciclo I), situada no centro de São Paulo.. Orientador: Professora Doutora Ligia Beatriz Lopes Persoli.

ANEXO I

CURRÍCULO LATTES MARIA TEREZA PEPE RAZZOLINI

Maria Tereza Pepe Razzolini

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/8467049839493963
ID Lattes: **8467049839493963**
Última atualização do currículo em 07/08/2020

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
Lattes iD	http://lattes.cnpq.br/8467049839493963
Orcid iD	? https://orcid.org/0000-0003-3308-9550

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

Formação acadêmica/titulação

2000 - 2003	Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Avaliacao sanitaria de aguas residuarias provenientes de lagoas de estabilização para irrigacao de culturas agricolas no Estado de Sao Paulo., Ano de obtenção: 2003. Orientador: Wanda Maria Risso Gunther. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: Irrigacao agricola; Escherichia coli; reuso de esgoto; colifagos; helmintos; Salmonella. Grande área: Ciências Biológicas
1995 - 1998	Mestrado em Saneamento Ambiental. Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Brasil. Título: Ocorrencia de Aeromonas e suas toxinas em aguas de consumo humano provenientes de caixas d'agua e bebedouros.,Ano de Obtenção: 1998. Orientador: Petra Sanchez Sanchez. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: Aeromonas; Agua de consumo; Toxinas; Caixa de agua; Bebedouros. Grande área: Ciências Biológicas
1990 - 1991	Especialização em Tecnicos Del Agua. Universidad Politecnica de Cataluña, UPC, Espanha. Título: Microbiologia de filtros percoladores de industrIas de papel e celulose. Orientador: Francisco Gutierrez Lucena.
1983 - 1986	Graduação em Biologia. Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Brasil.